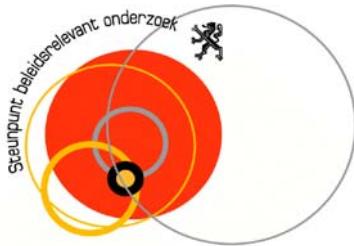




Provinciaal Instituut voor Hygiëne



Steunpunt Milieu en Gezondheid



Vlaamse Instelling vr. Technologisch Onderzoek



# Opvolgstudie: ASTMA EN ALLERGIE

## Samenvatting

Prof. Dr. K. Desager

Dr. V. Nelen

Dr. C. Vael

Dr. G. Koppen

**Met medewerking van:**

**Katrien Hendrickx (eindwerk Biomedische Wetenschappen 2004)**

**Riet Breesch (eindwerk ManaMa Jeugdgezondheidszorg 2006)**

**Rianne Terwijn (eindwerk ManaMa Jeugdgezondheidszorg 2007)**

**Liesbet VerHeirstraeten (eindwerk Biomedische Wetenschappen 2007)**

**Ann Walravens (eindwerk ManaMa Jeugdgezondheidszorg 2008)**

**Sylvie Verstrepen (eindwerk ManaMa Jeugdgezondheidszorg 2008)**

**Msc. L.Bruckers (UHasselt) en Dr.S. Verhulst (UAntwerpen) (statistische analyse)**

**Ann Colles (VITO) (geografische verwerking en statistiek nevenstudie)**

**Eva Govarts (VITO) (statistiek nevenstudie)**

**Karolien Bloemen en Heidi Dhondt (doctoraatstudenten VITO) (metingen nevenstudie)**

## Inleiding

Gezien het toenemende voorkomen van astma en allergie in de Westerse wereld werd in 2001, op vraag van de Vlaamse Overheid, aan de biomonitoringscampagne van het Steunpunt Milieu en Gezondheid een opvolgstudie gekoppeld met als doelstelling een duidelijker zicht te krijgen op astma en allergie en de factoren die een rol kunnen spelen in het ontstaan ervan.

Astma bij kinderen onder de 6 jaar is moeilijk te definiëren. Recidiverende episodes van piepen komen in deze leeftijdsgroep vaak voor: 25 tot 50 % van de kinderen maakt vóór de leeftijd van 6 jaar één of meerdere episodes van piepen door, maar de meesten zullen hun klachten ontgroeien. Op basis van epidemiologisch onderzoek werden astmafenotypes voorgesteld. Er zijn echter geen aangepaste middelen beschikbaar om een onderscheid te maken tussen kinderen met persisterend astma en kinderen die slechts voorbijgaand klachten zullen vertonen. De Astma Predictie Index kan hierbij een hulp zijn.

Over de relatie tussen darmflora en allergie zijn er wel heel wat gegevens beschikbaar. Meestal komt het erop neer dat men bij allergische kinderen meer Clostridia en minder Bifidobacteriën aantreft. Verschillende studies tonen een verband aan tussen de fecale *Bacteroides* concentratie en de serum IgE concentratie bij allergische kinderen, toevoeging van *Bifidobacteriën* aan de voeding kan de stijging van de *Bacteroides* concentratie voorkomen. Over de relatie tussen darmflora en optreden van astmatische klachten zijn er geen prospectieve studies beschikbaar.

Dichlorodiphenyltrichloroethaan (DDT) werd wereldwijd massaal gebruikt als insecticide in de periode van 1940 tot 1980. Omwille van zijn schadelijke effecten op de gezondheid bij mens en dier (o.a. hormoonverstoring, verstoring van het afweersysteem en mogelijk kankerverwekkend), is DDT momenteel verboden in de meeste landen, waaronder België. Kinderen kunnen worden blootgesteld aan dichlorodiphenyldichloroethaan (DDE), een metabool van DDT, tijdens de zwangerschap omdat DDE vanuit het bloed van de moeder de placenta kan passeren en via de moedermelk vermits DDE goed vetoplosbaar is. In een recente studie in Menorca, stelde Sunyer dat prenatale blootstelling aan DDE zou kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van astma. Piepen op 4-jarige leeftijd nam toe met stijgende DDE concentratie in het navelstrengbloed.

In de literatuur zijn er weinig gegevens over de effecten van PCB's, hexachloorbenzeen (HCB), DDE, dioxines, lood (Pb) en cadmium (Cd) op gastro-intestinale flora. Chung heeft in zijn in vitro onderzoek een inhiberende invloed gevonden van 2-, 3- en 4-aminobifenyl op de groei van *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae* en *Escherichia coli*.

Er zijn slechts een beperkt aantal studies naar de relatie blootstelling aan outdoor pollutanten bij aanvang van het leven en de ontwikkeling van luchtwegproblemen op jonge leeftijd. Miller et al. beschrijft een relatie tussen persoonlijke PAK's blootstelling (48h) gemeten bij de moeder in het derde trimester van de zwangerschap en hoger voorkomen van hoesten en piepen bij de kinderen op leeftijd van 1 jaar (n=303). In het kader van de TRAPCA studie (Traffic-Related Air Pollution on Childhood Asthma) werden in geboortecohorten van Nederland, Duitsland en Zweden de associatie onderzocht tussen gemodelleerde

concentraties van verkeersgerelateerde luchtpolluenten van de woonplaats en luchtwegproblemen op jonge leeftijd. Er werd een associatie beschreven tussen jaargemiddelde concentraties aan  $PM_{2.5}$ ,  $NO_2$  of roet en: (i) hoesten zonder infectie of droge hoest 's nachts op 1-jarige leeftijd - en in mindere mate op 2 jaar; (ii) piepen, doctor-diagnosed astma, luchtweginfecties en verkoudheden op 2 jaar en (iii) een positief niet-significant verband met astma symptomen.

## Doelstelling

Het opzet van dit onderzoek was om na te gaan of er een verband kon gelegd worden tussen de blootstelling aan polluenten, de darmflora en het optreden van piepen tijdens de eerste 3 levensjaren. In een nevenstudie werd de relatie onderzocht tussen omgevingspolluenten en luchtwegproblemen/allergie op leeftijd van 1, 2 en/of 3 jaar. Bijkomend werd nagegaan of er nieuwe biomerkers voor inflammatie en luchtwegproblemen in de ademluchtmonsters van deze kinderen konden worden geïdentificeerd.

## Methode

Het biomonitoringsprogramma van het steunpunt Milieu en Gezondheid (2002-2006) had als doelstelling gegevens te verzamelen over de blootstelling aan polluenten en hun mogelijke relatie met gezondheidseffecten. De campagne was onderverdeeld in drie leeftijdsgroepen: moeders/pasgeborenen, adolescenten (14-15 jarigen) en volwassenen (50-65 jarigen). In de meetcampagne van de pasgeborenen werd nagegaan of de gehalten aan polluenten in navelstrengbloed verschillen tussen gebieden met een verschillende milieubelasting, en of de blootstelling aanleiding gaf tot gezondheidseffecten. Er werden gegevens verzameld uit acht gebieden in Vlaanderen: Antwerpse agglomeratie, Gentse agglomeratie, Antwerpse en Gentse havenzone, fruitstreek, landelijk Vlaanderen, invloedsg gebied Olen, omgevingsgebied verbrandingsoven, en Albertkanaalzone. Samen met het biomonitoringsprogramma vonden ook 2 opvolgstudies plaats op een selectie van pasgeborenen, met als doel informatie te verzamelen over de effecten van polluenten op de cognitieve ontwikkeling enerzijds en op het optreden van astmatische en allergische problemen anderzijds. Deze samenvatting omvat deze deelstudie 'Astma en allergie'. De steekproeftrekking was gefaseerd: binnen elk aandachtsgebied werden materniteiten geselecteerd, binnen elke geselecteerde materniteit werden bevallingen geselecteerd. Verder werd de selectie gespreid over de vier seizoenen. De selectiecriteria voor de moeders waren: minstens vijf jaar wonen in die bepaalde regio, een Nederlandse vragenlijst kunnen invullen, toestemming geven voor deelname en bevallen in één van de geselecteerde kraamklinieken. De vragenlijsten bevatten naast algemene gezondheidsvragen, oa vragen over rookgewoonten, opleidingsniveau....

De volgende analyses werden uitgevoerd op navelstrengbloed. In het plasma van navelstrengbloed werden polychloorbifenylyls (PCB's), gechloroerde pesticiden (DDE en HCB), dioxines, cadmium (Cd) en lood (Pb) gemeten.

De faecesstalen werden getransporteerd in anaeroob milieu. Er werden 9 verschillende bacteriebodems geënt en zowel kwantitatief als kwalitatief geanalyseerd.

De darmflora bevat meer dan 400 verschillende bacteriële species waarvan tot ruim 50% niet kweekbaar is met conventionele cultuurmethoden. Daarom werd naast cultuur ook een moleculair biologische methode ontwikkeld om de darmflora te bestuderen: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). DGGE analyse gebeurde dmv polymerase chain reaction (PCR) met verschillende primersets gekozen uit het bacterieel 16S ribosomaal RNA gevolgd door scheiding van de amplicons op basis van verschillen in DNA sequentie d.m.v. elektroforese in een ureum gradient. De verschillende gels konden onderling vergeleken worden door gebruik van een merker die op iedere gel werd meegenomen. De gels werden vervolgens ingescand en gedigitaliseerd d.m.v. patroonherkenningssoftware. Significante banden geassocieerd met een positieve Astma Predictie Index werden geïdentificeerd d.m.v. logistische regressie analyse. Deze banden werden uitgeknipt gezuiverd en de DNA sequentie werd bepaald om een bacteriële identificatie te bekomen. Er werden 2 verschillende universele 16S rRNA primersets gebruikt in 2 geconserveerde regio's van het bacterieel 16S rRNA (resp. V6 en V8 regio). Daarnaast werden specifieke primersets gebruikt voor *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium* en *Lactobacillus*.

De kinderen werden opgevolgd met behulp van 6 maandelijks vragenlijsten tot de leeftijd van 3 jaar, er werden 3 stoelgangstalen verzameld (op 3w, 6m en 1j) en op 3 jaar werden de kinderen opgeroepen voor een onderzoek met longfunctie en allergietests. Er werd getracht inflammatie in de luchtwegen te meten met de stikstofoxide bepaling in de uitgeademde lucht dmv 'multiple breath'. Allergie werd bepaald aan de hand van huidtesten voor huisstofmijt, graspollen, ei-eiwit en melk. Bij de kinderen werd verder ofwel ademlucht-condensaat, ofwel de ademlucht-gasfase verzameld: (i) Voor collectie van condensaat werd gebruik gemaakt van de RTube (Respiratory Research, Inc). (ii) Voor collectie van de vluchtige organische stoffen (VOS) in de gasfase werd een Tedlar bag met inhoud van 7 L gebruikt.

De criteria van de Astma Predictie Index kunnen onderverdeeld worden in twee hoofdcriteria, drie majeure kenmerken en drie mineure kenmerken.

De hoofdcriteria moeten beide aanwezig zijn:

- anamnese van minstens vier episodes van piepen,
- waarvan minstens één bevestigd door een arts. Verder moet voor een positieve Astma Predictie Index één majeur kenmerk en twee of drie mineure kenmerken aanwezig zijn.

De majeure kenmerken zijn:

- één van de ouders heeft astma (diagnose door arts),
- persoonlijke antecedenten van diagnose van atopische dermatitis,
- sensibilisatie voor allergenen waarvan minstens één aëroallergeen.

De mineure kenmerken zijn:

- allergische sensibilisatie voor melk, eieren of pindanoten,
- piepen dat geen verband houdt met een respiratoire, virale aandoening en
- bloed eosinophilie van minstens vier procent

Omgevingsluchtconcentraties van PM<sub>10</sub> en NO<sub>2</sub> werden bepaald voor een 4x4 km gridcel van de woonplaats (Intergewestelijke Cel voor het Leefmilieu (IRCEL)) De concentraties werden gemiddeld over de eerste drie levensmaanden en het eerste levensjaar van de kinderen en voor de drie trimesters van de zwangerschap. Verder werden voor het eerste levensjaar, jaartotale emissiedrukken berekend voor benzeen en NO<sub>x</sub> met een ruimtelijke verdeling van 1 km x 1 km (VITO). Voor elk kind werd via GIS-verwerking de afstand van de woonplaats tot dichtstbij zijnde N-weg of autosnelweg berekend.

#### Statistische analyse

Aan de hand van de beschikbare gegevens uit de databank van de biomonitoringscampagne en uit de verschillende leeftijdsgebonden vragenlijsten, werden eerst via Excel frequentietabellen opgesteld om een beter zicht te krijgen op de populatie, de aanwezige risicofactoren en de outcome parameters. De mogelijke risicofactoren en parameters die in voldoende grote aantallen aanwezig waren, werden nadien via univariate logistische analyse verwerkt. Wat in de univariate analyse op het 0.1 niveau significant was, is vervolgens in een meervoudige logistische regressie verwerkt.

Bij de identificatie van merkers in uitgedemde lucht werd gebruik gemaakt van Support Vector Machines (SVM van Weka software). Dit classificatiemodel laat toe te bepalen welke subset van attributen (peptiden/gassen) van belang is voor de classificatie van de individuen (bv. in groep met al of niet luchtwegproblemen).

## Resultaten

Aan de biomonitoring bij pasgeborenen namen 1196 moeders en neonaten deel. De 214 deelnemers uit de Antwerpse agglomeratie en de helft (de andere helft was kandidaat voor een andere opvolgstudie) van de 205 deelnemers uit landelijk Vlaanderen werden gecontacteerd voor deelname aan de opvolgstudie astma en allergie. Er was gepland om 200 kinderen te rekruteren. Omwille van een beperkt aantal geboorten in de landelijke regio werd dit aantal niet gehaald: 158 moeder-kind paren gaven hun toestemming voor deelname aan de deelstudie astma en allergie. 120 hiervan hebben de studie voltooid tot drie jaar. Rekrutering voor deelname aan deze prospectieve deelstudie is in 2002 gestart en liep tot einde 2003. Voor de deelstudie beperkte de selectie zich tot de Antwerpse agglomeratie en de landelijke regio's: 100 moeder-kind paren uit de Antwerpse agglomeratie, en 58 uit het landelijke gebied namen deel. Op de leeftijd van 24 maanden werden nog 134 vragenlijsten ingevuld. Op de leeftijd van 3 jaar namen 120 kinderen deel aan het opvolgonderzoek.

Uit de bevraging kwam naar voor dat 68 moeders ooit hebben gerookt en 23 ook tijdens deze zwangerschap. In de 5 jaren voor de zwangerschap werden 107 moeders dagelijks aan tabaksrook blootgesteld, met een gemiddelde van 2,3 uur per dag. Tijdens de zwangerschap zakt dit slechts cijfer lichtjes naar 97 moeders, die gemiddeld 2,3 uur per dag aan tabaksrook werden blootgesteld.

Bij de geboorte kregen 109 kinderen borstvoeding, waarvan 103 kinderen exclusief en 6 in combinatie met flesvoeding. Op de leeftijd van 3 weken waren er nog 81 kinderen met exclusieve borstvoeding, hetgeen op 6 maanden zakte tot 16 kinderen. Slechts 19 kinderen hadden vast tapijt in de slaapkamer. De blootstelling

aan tabaksrook schommelde rond de 20 kinderen (13%). Op de leeftijd van 3 weken kwamen 46 kinderen regelmatig met een kat in contact. Dit aantal steeg naar 62 op de leeftijd van 24 maanden. Het aantal kinderen dat regelmatig in contact kwam met een hond varieerde tussen 24 en 42. Globaal genomen kwam slechts 15% van de kinderen met boerderijdieren in contact. In de eerste 6 levensmaanden hadden 94 kinderen een episode van koorts doorgemaakt. Op de leeftijd van 24 maanden hadden 85 kinderen ooit één of meerdere antibioticakuren gekregen. Van deze kinderen was het gemiddeld aantal dagen antibioticagebruik 17 in totaal, waarvan 3 dagen antibiotica het minimum was en 126 dagen het maximum. Tussen de leeftijd van 6 en 24 maanden gingen 100 kinderen naar een kinderopvang.

#### *Relatie darmflora - symptomen*

Er werden verschillen aangetoond in de samenstelling van de darmflora tussen kinderen met een positieve en kinderen met een negatieve Astma Predictie Index. De prevalentie van fecale *Bacteroides fragilis* kolonisatie was hoger op de leeftijd van 3 weken bij Astma Predictie Index positieve in vergelijking met Astma Predictie Index negatieve kinderen (64% versus 34%,  $p < 0,05$ ). De fecale concentraties van *Bacteroides fragilis* en Totaal Anaeroben op de leeftijd van 3 weken waren significant hoger bij kinderen met een positieve Astma Predictie Index. Na correctie voor confounders werd er een positieve associatie gevonden tussen *Bacteroides fragilis* kolonisatie en de Astma Predictie Index index. De intestinale kolonisatie met *Bacteroides fragilis* op de leeftijd van 3 weken lijkt dus een vroege indicator te zijn van astma op schoolleeftijd. De relatie tussen *Bacteroides fragilis* en de Astma Predictie Index werd bevestigd met een cultuuronafhankelijke methode, DGGE, waarbij gebruik werd gemaakt van een specifieke primerset voor *Bacteroides fragilis*. Er kon met DGGE geen verband aangetoond worden tussen *Lactobacillus* of *Bifidobacterium* en de Astma Predictie Index. Met de universele 16S rRNA primers werden 2 DGGE banden geïdentificeerd die een significante associatie vertonen met een positieve Astma Predictie Index. DNA sequentie bepaling van deze banden toont dat het gaat om bacteriële species die behoren tot de *Clostridium coccoides* cluster XIV. De bekomen DNA fragmenten zijn echter tekort om tot een betrouwbare identificatie tot op speciesniveau te komen.

#### *Relatie pollutanten in navelstrengbloed - symptomen*

Op basis van de vragenlijsten en de gegevens uit het navelstrengbloed werd de outcome 'piepen op 12 maanden' en 'piepen op 24 maanden' bekeken. Hieruit blijkt dat in deze studiepopulatie een positieve familiale anamnese van astma de kans op piepen op 24 maanden vergroot. Jongens hebben meer kans op piepen op 12 en 24 maanden dan meisjes. Verder was frequent antibioticagebruik ook nog een factor die de kans op piepen deed toenemen op zowel 12 als 24 maanden.

De gemiddelde kans op piepen tussen 0 en 3 jaar neemt licht toe met stijgende DDE-concentratie.

Als de moeder ooit en/of tijdens de zwangerschap gerookt heeft, is er 2,7x meer kans op piepen bij haar kind in vergelijking met een moeder die nooit gerookt heeft. Als de vader aan astma lijdt, heeft het kind bijna 3 x meer kans op piepen in vergelijking met een vader zonder astma. Antibioticagebruik van het kind geeft 3,5 x meer kans op piepen. Antibioticagebruik van de moeder tijdens de zwangerschap geeft, afhankelijk van de leeftijd van het kind, meer of minder kans op piepen. Bij de geboorte (0 jaar) is er een negatieve associatie tussen antibiotica tijdens de zwangerschap en piepen. Op 1-jarige leeftijd is de

associatie nog steeds negatief. Vanaf 2 jaar wordt het verband positief. Vóór 2 jaar geeft antibioticagebruik van de moeder tijdens de zwangerschap dus minder kans op piepen bij het kind, vanaf 2 jaar is er echter meer kans op piepen. Dit zou kunnen wijzen op een tijdelijk effect.

Antibioticagebruik bij het kind blijkt geassocieerd te zijn met een verhoogde kans op piepen tijdens het 1<sup>ste</sup> levensjaar. Om te onderzoeken of antibioticagebruik en oorzaak of gevolg was van het piepen werden secundaire analyses uitgevoerd. Hieruit bleek dat antibioticagebruik bij het kind niet geassocieerd was met piepen op latere leeftijd met piepen op het zelfde tijdstip (bijv. antibioticagebruik op 6 maand is enkel geassocieerd met piepen op 6 maand en niet met piepen op 1 jaar). Dit impliceert dat de associatie met antibioticagebruik toe te wijten is aan “reverse causation”. Het is waarschijnlijk zo dat de antibiotica werden voorgeschreven wegens astmatische klachten veroorzaakt door virale infecties.

Er werden geen significante relaties gevonden tussen Astma Predictie Index en de pollutiegehalten.

#### *Relatie pollutanten in navelstrengbloed – darmflora*

Voor PCB's en DDE in navelstrengbloed werd een inhiberende invloed teruggevonden op de kolonisatie van de stoelgang door *Bifidobacteria*, *Clostridium* (enkel PCB's en voor een leeftijd van de moeder tot 33 jaar), *Enterobacteriaceae* (enkel DDE) en *Staphylococci* bij zuigelingen van drie weken. Hoe ouder de moeder, hoe minder uitgesproken de inhiberende invloed van verhoogde PCB's op kolonisatie van de stoelgang op drie weken door *Clostridium*, met vanaf 33 jaar een omslag naar een bevorderende invloed. Er kunnen in het onderzoek geen significante relaties tussen Pb en Cd en kolonisatie van de stoelgang op drie weken weerhouden worden.

Wat andere invloeden betreft kan gesteld worden dat bij zuigelingen die antibiotica hadden kregen in de loop van de eerste drie weken het inhiberend effect van verhoogde DDE en PCB concentraties in het navelstrengbloed op de kolonisatie door *Bifidobacteriën* werd versterkt. Borstvoeding speelde een rol in de relatie tussen kolonisatie door *Clostridium* en verhoogde PCB concentraties: borstvoeding op drie weken ten op zichte van flesvoeding gaf minder kolonisatie van de stoelgang door *Clostridium* op drie weken.

#### *Relatie Omgevingsluchtpolluenten en symptomen*

Voor een stijging van de gemiddelde NO<sub>2</sub> concentratie (met 10 µg/m<sup>3</sup>) gedurende het derde trimester van de zwangerschap, verdubbelde de kans op het voorkomen van piepende ademhaling op 1 jaar. De blootstelling aan verkeerspolluenten op jonge leeftijd, gaf geen hogere kans op piepen op de leeftijd van 2 of 3 jaar. Dit geeft aan, dat dit effect vooral op kortere termijn van 1 jaar merkbaar is. De kinderen hadden meer kans op hoesten op de leeftijd van 3 jaar, indien ze de eerste drie levensmaanden aan hogere concentraties van fijn stof werden blootgesteld. De kans op een positieve allergietest op de leeftijd van 3 jaar nam ook toe indien het kind opgroeide in een verstedelijkt milieu (relatie met NO<sub>2</sub> en PM<sub>10</sub> in verschillende periodes van perinatale periode).

#### *Longfunctie en allergietesten:*

In 121 kinderen werd getracht een NO bepaling uit te voeren. Slechts in 38 kinderen werd een reproduceerbare en betrouwbare meting bekomen.

Dertien kinderen vertoonden een positieve huidtest tegen minstens 1 allergeen, meest frequent werd een huisstofmijtallergie gevonden.



De cut-off waarde voor NO voor de huidtest met de beste combinatie van sensitiviteit 80% en specificiteit 88% was 4,9 ppb. Kinderen met een positieve Astma Predictie Index konden onderscheiden worden van degenen met een negatieve Astma Predictie Index bij een NO waarde van 3,4 ppb, met een sensitiviteit van 65% en specificiteit van 76%.

Multiple logistische regressie analyse met correctie voor rookblootstelling in de zwangerschap toonde een significante associatie tussen NO (3,4 ppb) en astma predictie index. Na correctie voor rookblootstelling en doctor's diagnosed asthma bij de ouders werd een OR van 30,6 (2,4 – 380) gevonden tussen NO (4,9 ppb) en huidtesten.

#### *Nieuwe biomerkers in ademlucht*

Bij het onderzoek op 3 jaar werd genoeg condensaat verzameld van 34 kinderen uit de Antwerpse agglomeratie. De groep kinderen werd opgedeeld in individuen die positief of negatief scoorden op een aantal symptomen op de leeftijd van 3 jaar: Astma Predictie Index, piepen, hoesten en allergie. Via de support vector classificatietechniek was het mogelijk alle individuen (100%) juist te klasseren op basis van negen peptidenmassa's voor Astma Predictie Index en hoesten en op basis van vijf peptidenmassa's voor piepen. 97% van de personen konden in de juiste allergieklasse onderverdeeld worden op basis van drie peptiden aanwezig in het condensaat. Enkel op basis van een combinatie van de peptiden kan een goede classificatie worden gedaan. Momenteel wordt nog verder onderzocht, van welke eiwitten deze peptiden onderdeel zijn.

Bij 51 kinderen uit de landelijke gemeenten werd de gasfase van ademlucht verzameld. De support vector classificeerder was in staat 84% van de kinderen juist te klasseren als 'piepers' of 'niet-piepers' op basis van 11 VOS (sensitiviteit = 20%, specificiteit = 100%). Voor hoesten konden 84% van de kinderen in de juiste groep geklasseerd worden op basis van 21 VOS (sensitiviteit = 95%, specificiteit = 62%).

## **Discussie**

De resultaten van deze studie wijzen er op dat de bacteriële darmflora een belangrijke rol zou kunnen spelen in het ontstaan van astma.

#### *Relatie darmflora - symptomen*

Over de relatie tussen darmflora en allergie werden verschillende studies gepubliceerd. Björkstén toonde aan dat verschillen in intestinale microflora zeer vroeg optreden voor men klinische tekens van atopie kan vinden. Hij vond bij allergische kinderen (meestal aangetoond d.m.v. positieve huidtesten) een lagere prevalentie voor *Bifidobacteriën* gedurende het eerste levensjaar, een gestegen aantal *Clostridia* op 3 maanden en een gedaald aantal *Bacteroides* op 12 maanden. De aeroben vertonen een hogere prevalentie van *Staphylococcus aureus* op 6 maanden, en een lagere prevalentie van *Enterococci* op 1 maand. Kalliomaki bevestigde bepaalde bevindingen van Björkstén: hij vond ook verschillen in intestinale flora op drie weken onder de vorm van verschillende bacteriële vetzurenprofielen. Bij atopische individuen vond hij een gestegen aantal *Clostridia*, en een gedaald aantal *Bifidobacteriën*. Sepp bevestigde in 2005 dat bij allergische kinderen het relatief aandeel van *Clostridia* gestegen was, en dat van *Bifidobacteriën*

gedaald was. Zijn conclusie was dat de aanwezigheid van grote aantallen *Clostridia* geassocieerd was met atopie, en dat de aanwezigheid van *Bifidobacteriën* omgekeerd evenredig was met allergie op vijf jaar. In het huidige onderzoek werd geen relatie aangetoond met *Bifidobacteriën* en *Clostridium* omdat meer selectieve cultuurmedia werden gebruikt dan in vroegere studies en omdat astma en niet allergie als outcome parameter werd beschouwd. Bovendien werd dit onderzoek vooral toegespitst op de faecesstalen afgenomen op de leeftijd van 3 weken vermits antibioticagebruik op latere tijdstippen zeer frequent wordt en een belangrijke invloed heeft op de samenstelling van de darmflora. De relatie tussen darmflora en astma of allergie op latere tijdstippen is eerder een gevolg van het antibioticagebruik dan een oorzaak. In vroegere studies is onvoldoende of niet gecorrigeerd voor dit effect.

Recent voerden Celedon en collega's een prospectieve studie uit bij 448 kinderen van atopische ouders die werden opgevolgd vanaf de geboorte. Tot de kinderen 2 jaar werden, werd er om de 2 maanden een telefonische vragenlijst afgenomen bij de eerste hulpverlener van het kind (huisarts of kinderarts). Nadien werd de vragenlijst om de 6 maanden afgenomen totdat de kinderen 5 jaar oud waren. Als de kinderen antibiotica kregen voorgeschreven, werd telkens de indicatie hiervoor gevraagd. Om oorzaak en gevolg uit elkaar te kunnen houden (antibiotica als oorzaak van piepen of voorgeschreven ten gevolge van piepen), werd ook een analyse gemaakt na uitsluiting van 101 kinderen die antibiotica kregen toegediend wegens ziekten geassocieerd met piepen. De onderzoekers vonden geen significant verband tussen antibioticagebruik in het eerste levensjaar en het voorkomen van astma, allergische rhinitis of eczeem op de leeftijd van 5 jaar.

Over de relatie tussen darmflora en optreden van astmatische klachten zijn er geen prospectieve studies beschikbaar. Twee onderzoeken echter toonden een verband aan tussen *Bacteroides* en de IgE of IgG concentratie bij allergische kinderen. In een populatie schoolkinderen in Japan vond Fukuda een hogere IgG titer tegen *Bacteroides vulgatus* bij kinderen met allergische symptomen. Bij zuigelingen met ernstige koemelkallergie vond Kirjavainen een correlatie tussen de serum IgE concentratie en de fecale *Bacteroides* concentratie, toevoeging van *Bifidobacteriën* aan de zuigelingenvoeding kon de stijging van de *Bacteroides* concentratie tijdens de introductie van vaste voeding voorkomen. In een studie bij niet-allergische kinderen op de leeftijd van 5 jaar door Sepp bleek de fecale *Bacteroides* concentratie positief gecorreleerd met de serum IgE concentratie. In een model met 3 weken oude muizen toonde Sudo aan dat de serum IgE concentratie verder steeg door de introductie van *Bacteroides vulgatus* in de darmflora. In een onderzoek bij volwassenen met een pollenallergie tenslotte, vond Odamaki een gestegen ratio van de fecale concentraties van *Bacteroides fragilis* t.o.v. *Bifidobacterium* tijdens het pollenseizoen. Deze stijging kon voorkomen worden door toediening van *Bifidobacteriën*. In vitro toonde hij deze patiënten eveneens aan dat *Bacteroides fragilis* stammen meer Th2 en minder Th1 cytokines induceerden dan *Bifidobacterium* stammen. Ons onderzoek toonde inderdaad aan dat vroege (leeftijd 3 weken) intestinale kolonisatie van de zuigeling met *Bacteroides fragilis* geassocieerd is met een verhoogd risico op astma op de schoolleeftijd. Dit biedt een perspectief op preventieve interventie door toediening of stimulatie van de intestinale *Bifidobacteriën*. *Bacteroides fragilis* kan een effect hebben op het ontstaan van astma via stimulatie van het intestinale immuunsysteem bij de zuigeling. Darmbacteriën kunnen in contact komen met de toll-like receptoren (TLR) die aanwezig zijn op de dendritische cellen in de lamina propria van de darmmucosa. Door binding met deze receptoren worden de dendritische cellen geactiveerd en migreren zij naar de

mesenterische lymfeklieren. Daar zullen ze de T-Lymfocyten doen uitrijpen in de richting van een Th1 of Th2 cytokine productie. Het is aangetoond dat *Bacteroides fragilis* lipoproteïne preferentieel bindt aan TLR 2 receptoren die leiden tot een Th2 dominante cytokine productie door de T-lymfocyten, dit is het fundamenteel immuundefect dat leidt tot astma. De DGGE resultaten bevestigen de relatie die werd aangetoond d.m.v. cultuurmethoden tussen *Bacteroides fragilis* en een positieve ASTMA PREDICTIE INDEX index. Dit ondersteunt en versterkt de conclusie van dit onderzoek.

#### *Relatie pollutanten in navelstrengbloed - symptomen*

Sunyer en collega's onderzochten het verband tussen prenatale blootstelling aan DDE en andere gechloreerde verbindingen en het ontstaan van atopie en astma in de vroege kinderjaren. Over een periode van 12 maanden (vanaf midden 1997) werden alle zwangere vrouwen in Menorca uitgenodigd om deel te nemen aan een longitudinale studie. 482 moeder-kindparen werden opgenomen in de studie en 468 (97,1%) kinderen vervolledigden de studie tot hun 4 jaar. Prenatale blootstelling aan DDE, hexachloorbenzeen en PCB's werd gemeten in het navelstrengbloed bij de geboorte. Astma werd gedefinieerd op basis van piepen op 4-jarige leeftijd, persisterend piepen of doktergediagnosticeerde astma. Specifieke IgE's tegen huisstofmijt, kattenallergeen en graspollen werden bepaald in het serum op 4-jarige leeftijd. Atopie werd gedefinieerd als een positieve waarde voor tenminste één van deze allergenen. Atopische status van de ouders werd bepaald door middel van huidtesten voor huisstofmijt, kattenallergeen en graspollen. De moeders vulden een vragenlijst in tijdens de zwangerschap en op 1, 2, 3 en 4-jarige leeftijd van het kind. Piepen op 4-jarige leeftijd nam toe met stijgende DDE concentratie, vooral in het hoogste kwartiel (9% in het laagste kwartiel: < 0,57ng/mL versus 19% in het hoogste kwartiel: > 1,90 ng/mL). Het relatieve risico was 1,32 (95% betrouwbaarheidsinterval 1,13-1,54) en dit gecorrigeerd voor astma bij de moeder, roken van de moeder, pariteit, opleidingsniveau van de moeder, zwangerschapsduur, geslacht en borstvoeding. De associatie was onafhankelijk van specifiek IgE en trad met dezelfde sterkte op voor niet-atopische piepers en persisterende piepers of doktergediagnosticeerde astmapatiëntjes. Er was geen verband tussen de DDE concentratie en het optreden van atopie (specifiek IgE). De onderzoekers besluiten dat prenatale blootstelling aan DDE zou kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van astma.

Borstvoeding mobiliseert DDE dat opgeslagen is in het vetweefsel van de moeder en via de moedermelk neemt de accumulatie van DDE bij het kind toe. Het is nog niet helemaal duidelijk of deze DDE concentratie in moedermelk het beschermend effect van borstvoeding op het ontstaan van astma kan wijzigen. Stratificatie van borstvoeding op basis van de prenatale concentraties van DDE gaf in deze studie echter geen verandering in de negatieve associatie tussen borstvoeding en piepen. Dit suggereert dat de postnatale effecten van DDE waarschijnlijk minder relevant zijn dan de prenatale blootstelling.

In een vervolg van de studie van Sunyer werd de associatie nagegaan tussen DDE en astma op de leeftijd van 6 jaar en de invloed van DDE op het beschermend effect van borstvoeding op het ontstaan van astma. Hiertoe werden de kinderen verder opgevolgd tot de leeftijd van 6,5 jaar. Bij 285 kinderen werd op de leeftijd van 4 jaar DDE gemeten in het bloed en bij 308 kinderen werden op de leeftijd van 6,5 jaar huidtesten afgenomen om de atopische status te bepalen. Astma werd gedefinieerd als persisterend piepen op de leeftijd van 6 jaar of doktergediagnosticeerde astma.

Er was een duidelijk verband tussen de DDE concentratie op de leeftijd van 4 jaar en het al dan niet krijgen van borstvoeding. Van de geboorte tot de leeftijd van 4 jaar, nam bij kinderen die borstvoeding kregen, de gemiddelde DDE concentratie toe met 53 %. Bij kinderen die flesvoeding kregen, daalde de gemiddelde DDE concentratie echter met 72 %.

Doktergediagnosticeerd astma en persisterend piepen waren geassocieerd met de DDE concentratie bij de geboorte, maar niet met de DDE concentratie op 4-jarige leeftijd. Deze associaties werden niet gewijzigd door borstvoeding of atopie. Borstvoeding beschermde tegen doktergediagnosticeerd astma en tegen persisterend piepen bij kinderen met lage en met hoge DDE concentraties bij de geboorte.

Deze bevindingen versterken dus het argument voor een effect van de DDE concentratie bij de geboorte op het ontstaan van astma (gemeten op de leeftijd van 6 jaar). De afwezigheid van een effect met de DDE concentratie gemeten op de leeftijd van 4 jaar, suggereert dat de kritische periode van blootstelling zeer vroeg in het leven plaatsvindt. De hypothese dat DDE het beschermend effect van borstvoeding op het ontstaan van astma zou wijzigen, wordt door deze studie niet ondersteund.

Zoals eerder gevonden met specifiek IgE op de leeftijd van 4 jaar, werd nu ook geen verband gevonden tussen de DDE concentratie bij de geboorte en het optreden van atopie gemeten met huidtesten op de leeftijd van 6 jaar. Dit zou erop kunnen wijzen dat de associatie tussen DDE en het optreden van astma niet verloopt via immunologische cellen die gerelateerd zijn met specifieke IgE productie. Eerder werd reeds gewezen op het oestrogeeneffect van DDE waardoor DDE zou kunnen interfereren met mastcellen in de luchtwegen die oestrogeen/progesteron receptoren bevatten waarbij DDE de Th2-immuundifferentiatie bevordert.

De bevindingen van de opvolgstudie astma en allergie liggen in de lijn van deze bevindingen. Nochtans is het gemiddelde risico op piepen te wijten aan DDE veel kleiner dan in de Spaanse studie: de gemiddelde kans op piepen tussen 0 en 3 jaar neemt toe met stijgende DDE-concentratie. Dit betekent dat bij elke unit stijging in DDE (dus + 1 ng/g vet DDE erbij) de kans op piepen met 0,0014 % stijgt ofwel met elke keer 100 ng/g vet DDE erbij, een stijging in de kans op piepen van 0,14 %.

Als de moeder ooit en/of tijdens de zwangerschap gerookt heeft, is er 2,7x meer kans op piepen bij haar kind in vergelijking met een moeder die nooit gerookt heeft. Dit verband is duidelijk in overeenstemming met de literatuur. Roken tijdens de zwangerschap heeft immers een negatief effect op de foetale longontwikkeling en op de longfunctie van pasgeborenen en verhoogt de kans op het ontstaan van astma bij het kind. Kinderen die worden blootgesteld aan tabaksrook hebben nauwere luchtwegen die vroegtijdig piepen bevorderen (cfr. fenotypes van wheezing bij kinderen jonger dan 6 jaar (Martinez): transiënte vroege piepers). Dit geldt zowel voor kinderen van atopische als van niet-atopische ouders.

Als de vader aan astma lijdt, heeft het kind bijna 3 x meer kans op piepen in vergelijking met een vader zonder astma. De literatuurgegevens in verband met het ontstaan van astma en allergie tonen een grote invloed van een familiale atopische of astmatische voorgeschiedenis, maar dan voornamelijk in de groep van late atopische piepers en ook een deel in de groep van persisterende piepers. Bij de transiënte vroege piepers is de invloed van een positieve familiale anamnese veel minder duidelijk. De invloed van paternele atopie is waarschijnlijk minder groot dan die van maternele atopie. Zo is een hoog IgE gehalte bij de

moeder (niet bij de vader) gecorreleerd met een hoger IgE gehalte bij het kind en een grotere kans op het ontwikkelen van atopie.

Antibioticagebruik van het kind geeft 3,0 x meer kans geeft op piepen. Antibioticagebruik in de vroege kinderjaren zou geassocieerd kunnen zijn met de ontwikkeling van atopische aandoeningen door verstoring van de darmflora of door wijzigingen in het natuurlijk verloop van bacteriële infecties. In de Nederlandse prospectieve KOALA studie is vroegtijdig gebruik van antibiotica geassocieerd met het optreden van wheezing in de eerste 2 levensjaren. Zoals reeds hoger vermeld, is waarschijnlijk dat antibiotica gebruikt werden wegens ziekten geassocieerd met piepen.

Antibioticagebruik van de moeder tijdens de zwangerschap geeft, afhankelijk van de leeftijd van het kind, meer of minder kans op piepen. Bij de geboorte (0 jaar) is er een negatieve associatie tussen antibiotica tijdens de zwangerschap en piepen. Op 1-jarige leeftijd is de associatie nog steeds negatief. Vanaf 2 jaar wordt het verband positief. Vóór 2 jaar geeft antibioticagebruik van de moeder tijdens de zwangerschap dus minder kans op piepen bij het kind, vanaf 2 jaar is er echter meer kans op piepen. Dit zou kunnen wijzen op een tijdelijk effect.

#### *Relatie polluenten in navelstrengbloed - darmflora*

De bacteriën in dit onderzoek die inhibitie van de groei ondergaan onder invloed van DDE, zijn *Bifidobacteriën*, *Enterobacteriaceae* en *Staphylococcon*. PCB's hebben een inhiberende invloed op *Bifidobacteriën*, *Clostridium* en *Staphylococcon*. Voor *Clostridium* werd we een effectmodificatie van de relatie PCB's en kolonisatie gevonden door de leeftijd van moeder, met een omslag van een inhiberende naar een bevorderende invloed op drieëndertig jaar. In Chung's onderzoek werden *Bifidobacterium infantis*, en *Bifidobacterium bifidium*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* onderdrukt. De structuurformules van PCB en DDE lijken sterk op die van de polluenten 2-,3- en 4-aminobifenyyl waarvan Chung een effect op de kolonisatie heeft aangetoond. Zij bevatten allemaal een bifenyyl groep die van benzeen is afgeleid. De gelijkaardige resultaten in vitro en in vivo steunt de bevinding dat deze polluenten een inhiberende invloed blijken te hebben op enkele belangrijke darmcommensalen (*Enterobacteriaceae*, *Bifidobacteriën*, *Clostridia* en *Staphylococcon*). Bifenyyl op zich is niet antimicrobieel noch mutageen. Voor de 2-,3- en 4- aminobifenyyl groep geldt volgens Chung dat door de toevoeging van de aminogroep deze molecule wel antimicrobieel wordt. Mogelijk heeft DDE door de werking van de chloorgroepen en de dichlooretaangroep ook een antimicrobiële invloed.

De inhiberende werking van de polluenten in vitro zou bij lage concentraties te maken hebben met een inhibitie door de polluenten van het elektron transport systeem van bepaalde bacteriën, die voor de aerobe energieproductie van de bacteriën instaat. Aromatische amines zijn elektrontransporteurs en zouden met dit systeem interfereren. 4-aminobifenyyl en samenstellingen hiervan zouden op dezelfde manier werken.

Het is echter niet duidelijk waar in de elektrontransport keten deze interferentie gebeurt. Bij hoge concentraties, kon het inhiberend effect op de kolonisatie zowel in aerob als in anaerob milieu vastgesteld worden. Zowel bij aerobe als bij anaerobe bacteriën is er een systeem van reductie van co-enzymen (met vorming van ATP), waarbij bepaalde substraten geoxideerd worden. Bij aerobe bacteriën is zuurstof de oxydator, bij anaerobe bacteriën is dit nitraat, sulfaat of een organisch substraat (fermentatie of gisting). Bij deze reactie in de cytoplasmamembraan van de bacterie, worden tijdens deze oxydatie-

reductiereacties elektronen getransporteerd. Eigenlijk is dit energieproductiesysteem analoog aan dat van de mitochondriën.

#### *Relatie Omgevingsluchtpolluenten en symptomen*

Er werd een associatie aangetoond tussen omgevingspolluenten waaraan baby's blootgesteld worden in de perinatale periode, en de ontwikkeling van luchtwegklachten en allergie-symptomen in de eerste drie jaren van het leven. Dit geeft aan dat de timing van de blootstelling belangrijk kan zijn.

Miller et al. beschrijft een relatie tussen persoonlijke PAK's blootstelling (48h) gemeten bij de moeder in het derde trimester van de zwangerschap en hoger voorkomen van hoesten en piepen bij de kinderen op leeftijd van 1 jaar. De metingen werden postnataal niet herhaald. Het is daarom niet eenduidig te stellen of het effectief de blootstelling gedurende het derde trimester is, die van belang is, of dat het (ook) 'staat' voor de blootstelling aan PAK's gedurende het eerste levensjaar (welke mogelijk van dezelfde grootte is als deze prenataal gemeten). In het kader van de TRAPCA studie (Traffic-Related Air Pollution on Childhood Asthma) werden in geboortecohorten van Nederland, Duitsland en Zweden de associatie onderzocht tussen gemodelleerde concentraties van verkeersgerelateerde luchtpolluenten van de woonplaats en luchtwegproblemen op jonge leeftijd. Er werd een associatie beschreven tussen hoesten zonder infectie of droge hoest 's nachts op 1-jarige leeftijd - en in mindere mate op 2 jaar - en de jaargemiddelde concentraties aan PM<sub>2.5</sub>, NO<sub>2</sub> of roet in de Duitse cohorte. Er was een significante positieve associatie tussen deze polluenten en piepen, doctor-diagnosed astma, luchtweginfecties en verkoudheden op 2 jaar in de Nederlandse cohorte en een positief niet-significant verband met astmasymptomen voor de Zweedse cohorte. Gezien de jonge leeftijd van de kinderen in de huidige studie en de TRAPCA studies, is het te vroeg te besluiten dat deze kinderen effectief astma ontwikkelen. Om dit na te gaan, dient de associatie tussen lange-termijn blootstelling aan verkeersgerelateerde parameters (gedurende de vroege levensfase) en het optreden van respiratoire symptomen, verder opgevolgd te worden.

#### Longfunctie en huidtesten.

Longfunctie meten op de leeftijd van 3 jaar is moeilijk aangezien de coöperatie nog zeer beperkt is en maximale ademmaneuvers moeilijk zijn. Daarom kon een klassieke test zoals een spirometrie niet worden uitgevoerd. Er werd getracht toch een idee te krijgen over de inflammatie in de luchtwegen aan de hand van de bepaling van NO in de uitgeademde lucht. Maar slechts in minder dan 1/3 van de kinderen kon een betrouwbare meting bekomen worden. Significant meer kinderen met een verhoogde NO waarde hadden een positieve Astma Predictie Index of waren allergisch.

In de literatuur zijn geen data beschikbaar met multiple breath NO bij 2 en 3 jarige, wel bij oudere kinderen. In de PIAMA studie, waren de gemiddelde NO waarden, off line gemeten, hoger bij 4-jaar oude kinderen met een positief specifiek IgE tegenover een inhalatie allergeen en ook bij kinderen met doctors diagnosed asthma. Bij kinderen ouder dan 6 jaar vindt men vele data die deze gegevens bevestigen. Buchvald vergeleek verschillende methoden om NO te meten bij 2 tot 5 jarigen. Hij vond waarden (gemiddelde (95% confidence interval)) van 6 ppb (4–8 ppb) in jonge astmatische kinderen, 5 ppb (3–7 ppb) in jonge kinderen met regelmatig piepen en 3 ppb (2–4 ppb) bij gezonden.

In the German Multicentre Allergy Study vond men dat een familiale geschiedenis van atopie geassocieerd was met verhoogde NO waarden, onafhankelijk van de klachten van piepen. De resultaten uit de opvolgstudie liggen in deze lijn. Verdere opvolging van de kinderen zal toelaten om de longfunctie via klassieke metingen te evalueren.

#### *Nieuwe biomerkers in ademlucht*

Het opzet was 'biomerkers' te identificeren die toelaten luchtwegproblemen te objectiveren. Analyse van ademlucht is niet-invasief en daarom interessant bij onderzoek van kinderen. Deze studie toont aan dat analyse van biomerkers in uitgeademde lucht mogelijkheden biedt om een onderscheid te maken tussen kinderen die een verhoogd risico hebben op de latere ontwikkeling van astma. Dit is een eerste waarneming en gegevens moeten verder getoetst worden in andere studiepopulaties om de betrouwbaarheid van de analysetechniek aan te tonen.

## **Beleidsrelevantie van het onderzoek**

De opvolgstudie astma en allergie gebeurde met de bedoeling de rol van risicofactoren, waaronder polluenten, te bekijken in het ontstaan van astma en allergie. Verder was de bedoeling de rol van de darmflora te bekijken in dit proces. Dit alles met het oog op preventie.

-De relatie van DDE met het optreden van piepen werd bevestigd.

-De rol van de darmflora in het ontstaan van astma en allergie biedt de mogelijkheid deze toegangspoort actief te gebruiken in de preventie van astma, vooral bij familiaal belaste kinderen door gebruik van pre- en probiotica. Interventie onderzoek in dit verband is lopende.

-Verder kunnen op basis van het literatuuronderzoek wetenschappelijk onderbouwde aanbevelingen worden gedaan voor maatregelen die ouders kunnen nemen ter preventie van astma en allergie bij hun kind. Voorbeeld van een gestaafde primaire preventiemaatregel is het vermijden van blootstelling aan passief roken zowel tijdens de zwangerschap als in het latere leven en het langdurig toedienen van borstvoeding.

- De concentratie aan omgevingsluchtpolluenten in de vroege (perinatale) periode van het leven was gerelateerd met piepen op 1 jaar, hoesten op 3 jaar en het voorkomen van graspollen of huisstofmijtallergie op 3 jaar. Bij 14-15 jarige jongeren van de Vlaamse humane biomonitoringscampagne werd een gelijkaardige associatie vastgesteld tussen jaargemiddelde gemodelleerde NO<sub>2</sub> concentraties en astmasymptomen gerapporteerd voor dat jaar. In diezelfde biomonitoringscyclus werd astma significant meer gemeld in de stedelijke agglomeraties, door moeders en – zij het niet significant – ook meer bij jongeren en volwassenen uit die regio's. Uit dit alles blijkt, dat het belangrijk is de problematiek van luchtwegklachten in relatie met de omgevingsluchtkwaliteit blijvend op te volgen in Vlaanderen. Dit kan gebeuren door systematisch de data van de humane biomonitoringscampagnes te toetsen aan de beschikbare milieukwaliteitdata, zoals ze door IRCEL worden aangeleverd.

