

Niveles ambientales de aeroalergeno de soja en la ciudad de Barcelona



María Jesús Cruz Carmona

**Universidad Aut3noma de Barcelona
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina**

TESIS DOCTORAL

**Niveles ambientales de aeroalergeno de
soja en la ciudad de Barcelona**

Memoria presentada por **María Jes3s Cruz Carmona**
para acceder al grado de Doctor en la
Facultad de Medicina de la
Universidad Aut3noma de Barcelona

Directores de la tesis:

Dra. Mar3a Jos3 Rodrigo Anoro
Dr. Ferran Morell i Brotad
Hospital Vall d'Hebron.
Universidad Aut3noma de Barcelona

Barcelona, Octubre de 2004

A mis queridos padres por su
cariño incondicional y su apoyo.

A Silvia y Fernando

AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de muchas personas. Quiero dejar constancia de mi gratitud a todas ellas, especialmente:

A la **Dra María José Rodrigo** a quien admiro y estimo especialmente, por dedicarme su tiempo, por su apoyo y su gran capacidad de trabajo que han sido fundamentales para la realización de esta tesis.

Al **Dr Ferran Morell**, ejemplo para mí tanto a nivel profesional como personal. Le agradezco su confianza en mí, su apoyo y su contagioso entusiasmo sin los cuales no habría sido posible realizar esta tesis.

A la **Dra Maria del Mar García** y al **Dr Lluís Armadans** por su asesoramiento en el tratamiento estadístico de los datos.

A los **Dres María Dolores Carrascal, Jordi Vila y Merce Aceves** por su ayuda en la recogida de las muestras y por su colaboración en el trabajo.

Al **Dr Josep María Antó** por su imprescindible contribución científica en la investigación de las epidemias de asma por soja en Barcelona.

A **María Dolores Untoria, Susana Gomez, Leire Alcantara y Alex Roger**, mis compañeros del laboratorio, por las largas horas de trabajo compartidas, por su compañerismo y su amistad.

Al **Dr Xavier Muñoz** por brindarme su amistad y su cariño durante mis años de trabajo en el hospital.

A la **Dra Teresa Genover** por su imprescindible ayuda en los estudios de seguimiento de los pacientes, que han supuesto horas de trabajo.

A **Margarita Bastart, Carmen Besalú y Carmen Martinez**, por cuidarme y apoyarme durante mis primeros años de trabajo en el Hospital. Por todos los momentos entrañables vividos.

A **Rosa Lloria, Montse Murillo, Maite Valdeolivas** y a todos mis **compañeros del Servicio de Neumología** por su amistad y su compañerismo.

A **Marta Llagüerri** por ser mi amiga durante tantos años.

A todos los **pacientes que han colaborado** en el esclarecimiento de las epidemias de asma por soja en la ciudad de Barcelona.

ABREVIATURAS

ARIMA – (Auto-regresivos, Integrados y de Medias móviles).

CCI – Coeficiente de correlación intraclase.

CV – Coeficiente de variación.

ELISA – Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas.

HSP- Proteína hidrofóbica de soja.

IEF – Isoelectroenfoque

IgE – Inmunoglobulina E

KDa – Kilodaltons

MPS - *Micro Pore Size Bag Filters*

PI – Punto isoeléctrico

PM – Peso molecular

RAST – Prueba de radioalergosorbente

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes.

Soybean-LMM – Soybean Low Molecular Mass.

VLA – Valor límite ambiental

INDICE

	Pág.
Comunicaciones a congresos y subvenciones	1 - 2
Justificación de la presente tesis doctoral	3
Introducción	4
1.- Epidemias de asma en Barcelona.	5 - 7
1.1.- Identificación de las epidemias.	
1.2.- Otras epidemias de asma en el mundo.	
2.- Etiología de las epidemias de asma de Barcelona.....	8 - 12
2.1.- Investigación de la etiología.	
2.2.- Alergenicidad de la semilla de soja.	
3.- Intervención ambiental.....	13 – 17
3.1.- Reducción de las emisiones procedentes de las descargas.	
3.2.- Control de la concentración ambiental de aeroalergeno de soja.	
3.3.- Seguimiento de los pacientes asmáticos epidémicos.	
4.- Nuevos episodios de asma: Brotes de 1994 y 1996	18 - 19
5.- Incremento y mejora de las intervenciones ambientales.....	20 - 24
5.1.- Renovación de los sistemas de filtración de las emisiones.	
5.2.- Seguimiento meteorológico.	
5.3.- Monitorización diaria de la concentración de aeroalergeno de soja.	
Hipótesis de trabajo y objetivos	25 - 26

Publicaciones	27 - 43
----------------------------	----------------

1.- Cruz MJ, Rodrigo MJ, Antó JM, Morell F. An amplified ELISA-inhibition method for the measurement of airborne soybean allergens. Int Arch Allergy Clin Immunol 2000;122:42-8.

2.- Rodrigo MJ, Cruz MJ, Garcia M, Antó JM, Genover T, Morell F. Epidemic asthma in Barcelona. An evaluation of new strategies for the control of soybean dust emission. Int Arch Allergy Clin Immunol 2004;134:158-64

Discusión	44
------------------------	-----------

1.- Métodos de estimación de la concentración ambiental de aeroalergenos.....	45 - 50
---	---------

2.- Comparación de los métodos de RAST-inhibición y ELISA-inhibición.....	51 - 53
---	---------

3.- Efectividad de las medidas implantadas en 1998 para la descarga de soja	54 - 63
--	---------

3.1.- Niveles ambientales obtenidos.

3.2.- Estudio de seguimiento de los pacientes.

3.3.- Valor límite ambiental.

Conclusiones	64 - 65
---------------------------	----------------

Bibliografía	66 - 74
---------------------------	----------------

COMUNICACIONES A CONGRESOS Y SUBVENCIONES.

1.- Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han sido presentados de forma parcial en los siguientes congresos:

- Rodrigo MJ, Cruz MJ, Swanson M, Morell F. Quantification of airborne soybean allergens with an amplified ELISA-inhibition method. International Conference of the American Thoracic Society, Chicago 24 al 29 de abril, 1998.
- Rodrigo MJ, Cruz MJ, Garcia M, Lopez O, Morell F. Soybean aeroallergens levels in Barcelona: a 28 month prospective study. XX Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Berlin, Mayo 9-13, 2001.
- Cruz MJ, Rodrigo MJ, García M, Untoria MD, Morell F. Soybean aeroallergen levels in Barcelona in an intervention study. 7th International Symposium on Maritime Health. Tarragona, 22-26 de Abril de 2002.
- Untoria MD, Rodrigo MJ, Genover T, Cruz MJ, Morell F. Concentració d'aeroal.lergen de soja en la ciutat de Barcelona en funció del període horari. XXI Diada Pneumològica de la Societat Catalana de Pneumologia. Barcelona, 11-12 Abril de 2003.

2.- La presente tesis doctoral ha sido parcialmente subvencionada por las siguientes becas:

- Estudio de provocación bronquial para determinar la concentración mínima de polvo de soja causante de obstrucción bronquial. Fis 98/0332.
- Beca FUCAP 1997 para el estudio del asma por soja.
- Niveles atmosféricos puntuales de soja en la ciudad de Barcelona y su relación con los episodios de asma en individuos sensibilizados. Fis 01/1386.
- Red Respira (Instituto Carlos III. Fis RTYC-CO3/11)-SEPAR.

JUSTIFICACIÓN DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.

El trabajo está estructurado siguiendo las recomendaciones de la normativa para la presentación de tesis doctorales como compendio de publicaciones, aprobada por la Comisión de Doctorado de la Universidad Autónoma en noviembre de 1994 y modificada en febrero de 2003.

La presente memoria se basa en dos artículos originales siguiendo la misma línea de investigación: Control ambiental de la concentración de aeroalergeno de soja en la ciudad de Barcelona. Dichos artículos se presentan en su versión original en inglés.

Esta tesis supone una aportación desde el punto de vista ambiental y clínico a la búsqueda de medidas eficaces para el control de las epidemias de asma por soja. La monitorización diaria de la concentración ambiental del alergeno de soja permite, junto con la medida de determinadas condiciones atmosféricas, controlar el proceso de descarga de dicha leguminosa en el puerto de la ciudad de Barcelona. Esta monitorización ha ayudado además a demostrar la eficacia de las nuevas medidas adoptadas en las instalaciones del puerto para la descarga de soja, que han tenido como consecuencia una reducción importante de la concentración de este aeroalergeno en la atmósfera de la ciudad. Estos hechos hacen posible recomendar la implantación de estas medidas de control en otras ciudades donde se descarga y/o manipula soja.

INTRODUCCIÓN

1.- EPIDEMIAS DE ASMA EN BARCELONA.

1.1.- Identificación de las epidemias.

Durante los años 1981-1987 se detectaron en Barcelona 26 epidemias de asma, por aquel entonces de etiología desconocida, que tuvieron como consecuencia el ingreso de 1.155 personas en los Servicios de Urgencias de los Hospitales más grandes de la ciudad, generalmente con ataques agudos de asma, y 15 exitus debidos a crisis de asma agudo antes del ingreso de los enfermos en el hospital¹⁻³. En estas epidemias se observaba que en determinados días del año se producía en pocas horas una masiva afluencia de casos de asma agudo a los Servicios de Urgencias de los hospitales de la ciudad. Estos casos se caracterizaban por presentar una sintomatología de asma grave de inicio brusco que en un 8% de los casos precisaba intubación^{1,4}. Durante esos días se detectó un número medio de ingresos por asma de 44 pacientes/día (rango entre 12 y 96), siendo la media de admisiones habituales por esta patología de 1 a 9 pacientes/día¹. Estos ingresos suponían por tanto un incremento de hasta 7 veces respecto a los ingresos habituales y resultaban estadísticamente significativos. Los datos del número de admisiones por asma se obtenían de los libros de registro de los Servicios de Urgencias de los cuatro hospitales más grandes de la ciudad, que cubrían aproximadamente el 90% de las urgencias de Barcelona.

La mayoría de estos ingresos se producían entre el mediodía y las cuatro de la tarde y la distribución de las áreas geográficas en la que los pacientes asmáticos iniciaban la sintomatología, mostraba una agrupación en un área de la ciudad cercana a la zona industrial del puerto (Figura 1); además no había una estacionalidad, fuera

de un ligero predominio en verano y otoño. Por ello, se definieron los días epidémicos como aquellos días en los que el número de ingresos por asma en los Servicios de Urgencias de los hospitales de la ciudad era elevado y la concentración de casos se producía en un periodo de cuatro horas consecutivas y en un área restringida de la ciudad^{5,6}.

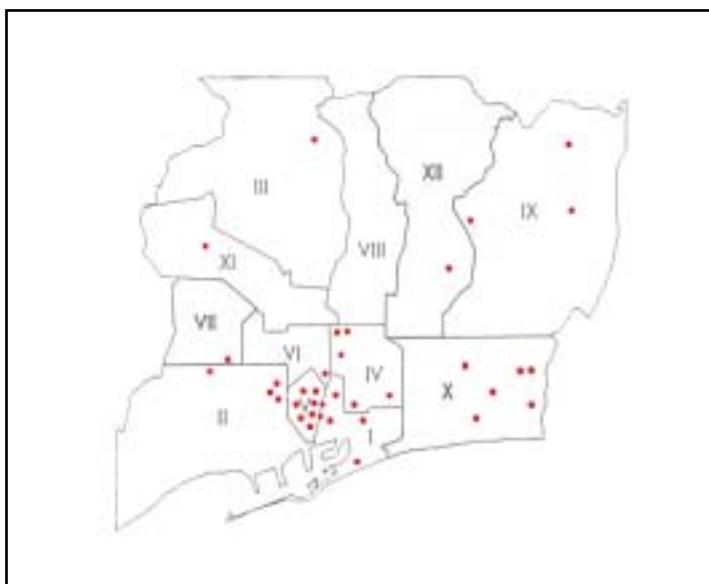


Figura 1: Distribución de las áreas geográficas donde los pacientes asmáticos iniciaban la sintomatología.

1.2.- Otras epidemias de asma en el mundo.

Estas epidemias de asma descritas en la ciudad de Barcelona no son un hecho aislado ya que, las epidemias de asma bronquial, llamadas también brotes de asma, son un fenómeno descrito en la literatura médica. Las primeras que se describieron, en las que se ha establecido claramente su etiología, fueron las detectadas en Ohio (USA), Sudáfrica, Francia y Brasil⁷⁻⁹. En todas ellas la causa fue la inhalación de polvo de ricino procedente de molinos de grano ubicados en el interior de las ciudades o

próximos a las mismas. Posteriormente, el fenómeno se ha descrito en *New Orleans* (USA), atribuyéndose la causa a diversos aeroalergenos naturales, en especial el polen de ambrosía, diversas esporas fúngicas y partículas amorfas parecidas a detritos vegetales¹⁰. También se han descrito en *New York* (USA) y *Birmingham* (UK), y aunque en ambas se descartó su relación con agentes químicos ambientales, no se ha podido establecer la causa^{2,11}.

En el caso del asma por soja, con anterioridad a las epidemias acontecidas en la ciudad de Barcelona, se habían publicado casos de asma inducido por inhalación de polvo de soja en escasos estudios. Este tipo de asma es conocido desde la descripción de los 5 primeros casos por Duke y cols. en 1934¹². En 1973, se publicaron los primeros casos de asma ocurridos en el puerto de *Saint Nazaire*, después de la instalación de una fábrica transformadora¹³. Posteriormente, se han identificado casos de asma por soja, o bien niveles altos de este alergeno en la atmósfera, en *New Orleans* (USA)¹⁴, Nápoles (Italia)¹⁵, y varias ciudades en España como Barcelona, Cartagena, Tarragona, Valencia, y A Coruña^{1,16-18}.

2.- ETIOLOGÍA DE LAS EPIDEMIAS DE ASMA DE BARCELONA.

2.1.- Investigación de la etiología.

El hecho de que hubiera un área de la ciudad cercana al puerto en la que se producían con mayor frecuencia estos ataques de asma^{5,6}, orientó la investigación etiológica a un agente biológico o químico procedente del puerto de la ciudad. Además, las condiciones atmosféricas que se habían producido en la zona durante los brotes, favorecerían la dispersión del posible agente responsable de las epidemias desde algún foco de emisión del puerto.

Tras descartarse diversos agentes, la investigación de las actividades de descarga del puerto de Barcelona demostró que existía una coincidencia entre las descargas de soja y estos brotes de asma^{1,5}. Para corroborar este hecho se realizaron dos estudios; el primero dirigido a estudiar la asociación entre días epidémicos y descarga de diferentes productos en el puerto y el segundo, un estudio caso-control inmunológico con la finalidad de evaluar la relación entre episodio de asma y descarga de soja^{2,5,19}.

En el primer estudio epidemiológico², se analizaron todas las sustancias que habían sido manipuladas en el puerto en alguna de las 26 epidemias detectadas desde 1981. El análisis de los registros de descarga de las empresas manipuladoras de soja, ubicadas en el puerto de la ciudad, demostró que en todos los brotes de asma identificados desde 1981 había existido la presencia de un barco descargando soja.

Además, se identificó que en 25 de los 26 brotes, el barco había descargado en uno de los silos del puerto (silo A), de los dos silos de descarga existentes. Este hallazgo resultó consistente con la observación de que en este silo A, la descarga de soja daba lugar a la emisión a la atmósfera de grandes cantidades de polvo que aparecía como una nube visible. Este estudio concluyó que había una relación directa entre descarga de soja y brotes de asma, y permitió identificar el foco emisor.

El estudio caso-control¹⁹ tenía por objetivo analizar la relación existente entre niveles elevados de anticuerpos IgE específicos a la soja en el suero de los pacientes y el hecho de padecer asma epidémico. Para ello, se determinaron los niveles de IgE total e IgE específica a soja y a un panel de neumoaergenos en dos grupos de pacientes: 86 asmáticos epidémicos y 86 asmáticos no epidémicos, entendiendo por no epidémicos los pacientes que ingresaban en los servicios de urgencias en días no epidémicos.

Los resultados obtenidos demostraron que el 74% de los asmáticos atendidos en urgencias en los días epidémicos tenían niveles elevados de anticuerpos IgE específicos a soja, frente a un 4.6% de los enfermos atendidos en días no epidémicos¹⁹, y por lo tanto había una sólida relación causal entre los niveles de IgE específica de los pacientes y la descarga de soja en el puerto de la ciudad. La demostración de esta asociación permitió: 1) confirmar la relación entre inhalación de polvo de soja procedente de la descarga de los barcos del puerto y el asma epidémico, y 2) demostrar la hipótesis de que estos brotes de asma epidémico estaban producidos por un mecanismo de hipersensibilidad inmediata mediada por anticuerpos IgE.

2.2.- Alergenicidad de la semilla de soja.

Una vez confirmada la presencia de anticuerpos IgE específicos a la soja en los pacientes asmáticos epidémicos, se iniciaron varios trabajos encaminados a identificar y caracterizar los alergenios de la semilla de soja responsables de estas epidemias. En un trabajo publicado en 1990, Rodrigo y cols.²⁰ estudiaron diferentes partes de la semilla de soja con la finalidad de identificar cual de ellas era la más alergénica y determinar que proteínas eran reconocidas por los anticuerpos IgE específicos de los pacientes. Este estudio se realizó utilizando diversas técnicas inmunoquímicas: 1) preparación de extractos alergénicos de las diferentes partes de la semilla de soja, 2) determinación de los niveles séricos de anticuerpos IgE específicos frente a los diferentes extractos, y 3) identificación y caracterización de estas fuentes alergénicas mediante técnicas electroforéticas de SDS-PAGE, IEF y *Western blot*. Los experimentos demostraron que los extractos alergénicos realizados a partir de las diferentes partes de la semilla de soja, compartían alergenios comunes aunque la cáscara de soja contenía una concentración mayor de proteínas de bajo PM. Los anticuerpos IgE específicos del suero de los pacientes se unían principalmente a dos bandas proteicas con PMs inferiores a 14.4 kDa y pI inferior a 6.5 (Figura 2) y por lo tanto era la cáscara de soja la más alergénica. Este hallazgo corroboró los hechos descritos en la literatura de que las proteínas que causan atopia son característicamente de bajo peso molecular y pH ácido²¹.

Posteriormente, otros trabajos²²⁻²³ han confirmado que los anticuerpos IgE específicos del suero de los pacientes asmáticos epidémicos reconocen principalmente a dos isoalergenios glicoproteicos (Gly m 1a y Gly m 1b), que están relacionados en cuanto a sus propiedades físico-químicas e inmuno-químicas y que tienen PMs de 7 y 7.5 kDa y pIs de 6.1 y 6.8, respectivamente. Ambos isoalergenios

muestran en su composición aminoacídica un elevado porcentaje de residuos hidrofóbicos, principalmente leucina e isoleucina. El estudio de la secuencia de los 42 aminoácidos del extremo N-terminal de los dos isoalergenos demostró que la secuencia de Gly m 1a era idéntica a la de Gly m 1b excepto en el tripéptido amino-terminal ausente en esta última.

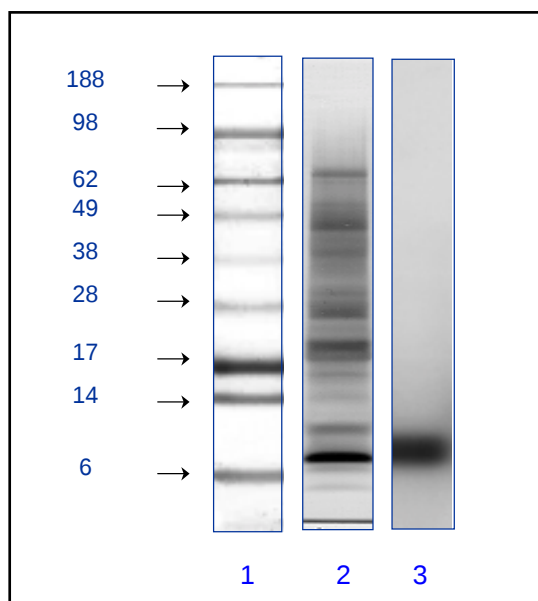


Figura 2: Carril 1 → Marcadores de PM. Carril 2 → SDS-PAGE de la cáscara de soja. Carril 3 → *Western blott* del suero humano con anticuerpos IgE específicos a las proteínas de bajo PM de la cáscara de soja.

El estudio de la reactividad alérgica concluye que ambas proteínas son reconocidas por la IgE específica del 95% de los pacientes que sufrieron asma epidémico, lo que demuestra que es el alérgeno mayor de estas epidemias. Estos trabajos han descrito también que las secuencias N-terminales de estas glicoproteínas tiene una elevada homología con la proteína hidrofóbica de soja (HSP) descrita por Odani y cols en 1987²⁴.

La HSP es un miembro de la familia de proteínas ricas en residuos de cisteína²⁵, y al igual que Gly m I consiste en dos isoformas, una de las cuales también carece del tripeptido aminoterminal, que Odani y cols. atribuyen a la actividad proteolítica de las proteínas de la semilla de soja. Estas características sugieren que Gly m I y la HSP son esencialmente la misma proteína pero presentan un diferente proceso post-traducciona.

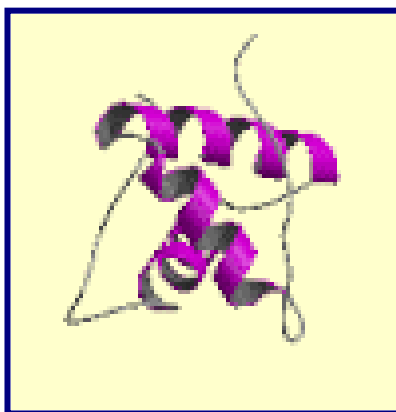


Figura 3: Estructura tridimensional de la HSP

Los miembros de esta familia contienen 8 cisteínas que forman entre sí 4 puentes disulfuro. Su estructura tridimensional, determinada por métodos de difracción de rayos X, es la de una molécula con una cuádruple hélice, formando dos hélices antiparalelas que junto con los puentes de conexión forman una espiral, por lo que la superficie final es similar a la encontrada en proteínas de mucha más baja hidrofobicidad (figura 3). Esto podría explicar porqué la proteína se libera fácilmente de la cáscara de soja y por tanto, puede penetrar en las membranas mucosas del tracto respiratorio produciendo las reacciones asmáticas²⁶.

3.- INTERVENCIÓN AMBIENTAL.

3.1.- Reducción de las emisiones procedentes de las descargas.

En España existen plantas molturadoras de soja en Barcelona, Tarragona, Valencia, Cartagena. A Coruña, Santander y Bilbao. Los principales productores son Estados Unidos, China, Brasil y Argentina. En el puerto de Barcelona, tres empresas almacenan y procesan parcialmente aproximadamente el 80% de la soja consumida en esta área. Dicha leguminosa se transporta hasta el puerto por barco y la descarga se realiza actualmente mediante aspiración neumática, que transporta la semilla desde la bodega del barco hasta unos transportadores mecánicos que la distribuyen al lugar de almacenamiento. Estas actividades resultan importantes ya que la soja es una leguminosa cuya producción mundial ha crecido de forma exponencial en los últimos años, debido a su riqueza en lípidos (20%) y proteínas de alta calidad nutricional (35%). España, importa anualmente 1.5 millones de toneladas métricas, y por lo tanto, cuando se comprobó la relación causal entre las epidemias de asma en la ciudad y la descarga de soja, se consideró importante adoptar medidas en esta descarga para evitar que se produjera una dispersión de polvo de soja a la atmósfera, ya que diariamente se manipulan grandes cantidades de esta leguminosa en el puerto.

Como ya se ha comentado, cuando se estudió la descarga de soja durante las primeras epidemias, se observó que este proceso producía una emisión a la atmósfera de grandes cantidades de polvo, que podía explicar las elevadas concentraciones de este aeroalergeno detectadas en la atmósfera en los estudios ambientales que se habían realizado (ver apartado 3.2). Esto era debido a que los silos no disponían de un

sistema de absorción de polvo y este se liberaba cuando la soja caía desde lo alto del silo para ser almacenada. El vertido de polvo a la atmósfera se realizaba a 70 metros de altura, y los focos de emisión estaban situados de tal forma que favorecían el transporte del polvo por el viento hacia el núcleo urbano.

Como consecuencia de este hallazgo se implantaron unos sistemas de filtración de las emisiones (filtros de manga) a través de los cuales pasa el grano de soja cuando se descarga y que están situados en los puntos críticos de producción de polvo en los silos. Esto ocasionó una importante reducción en la concentración atmosférica de soja y una disminución del número de asmáticos atendidos en los Servicios de Urgencias de los diferentes hospitales⁶.

Un análisis del impacto de las medidas correctoras introducidas demostró que durante los 838 días consecutivos posteriores a la instalación de estos filtros de manga no se produjo ningún brote de asma. La importancia de este hecho se pone de manifiesto si se tiene en cuenta que en los 973 días anteriores se identificaron hasta 20 días con brotes de asma^{4,6}.

3.2.- Control de la concentración ambiental de aeroalergeno de soja.

Además de esta evidencia visual ya comentada de la dispersión de polvo de soja a la atmósfera durante los procesos de descarga, en los años de estudio de las epidemias de asma por soja en Barcelona, se han realizado diversos análisis ambientales encaminados a cuantificar estas emisiones de aeroalergeno de soja^{2,6,27}. Uno de los primeros trabajos realizados en este sentido², demostró mediante microscopía óptica y electrónica la existencia de partículas de soja en muestras de aire recogidas en la ciudad durante los años 1986-87, aunque en esta ocasión no se cuantificó la concentración ambiental de este aeroalergeno.

Posteriormente, en un estudio publicado en 1991²⁷ se recogieron muestras de aire urbano en dos estaciones de control atmosférico cercanas a la zona de descarga del puerto que, como ya se ha comentado, son zonas muy pobladas de la ciudad y en las que se identificaron muchos casos epidémicos. Las muestras recogidas fueron sometidas a análisis de alcoholes, esteroides y se midió la concentración de aeroalergeno de soja en la *Mayo Clinic* (Rochester, Minn, USA) mediante un inmunoensayo específico (método de RAST-inhibición) desarrollado en este centro. En este periodo, los niveles más elevados de aeroalergeno de soja oscilaron entre 1.500 y 10.500 U/m³ en días epidémicos. Estos niveles contrastaban con los valores muy inferiores obtenidos en días en los que no se registraron epidemias (0.3 a 320 U/m³).

Un estudio posterior⁶ realizó análisis ambientales en muestras de aire recogidas tras la instalación de los filtros de manga en el puerto para minimizar las emisiones de polvo a la atmósfera. En este caso las muestras fueron analizadas nuevamente en la *Mayo Clinic* y los resultados obtenidos mostraron que la concentración de aeroalergeno había descendido significativamente tras la instalación de estos filtros de manga. Así, se obtuvo un rango de concentraciones que osciló entre 5 y 165 U/m³ en 22 muestras recogidas en días de descarga, después de la implantación de estas medidas. Estos resultados ponían en evidencia la eficacia de esta medidas implantadas que hacían descender drásticamente el nivel ambiental de aeroalergeno.

3.3.- Seguimiento de los pacientes asmáticos epidémicos.

Durante los años de estudio de estas epidemias de asma por soja se han realizado también diversos estudios de seguimiento de los pacientes asmáticos que habían acudido a los servicios de urgencias de los distintos hospitales de la ciudad²⁸⁻³⁰.

Un estudio realizado en 1987 tras las epidemias²⁸ concluyó que entre los factores de riesgo de estos pacientes se encontraban la reactividad cutánea frente a otros alérgenos ambientales comunes, una edad superior a 64 años, hábito tabáquico y nivel de IgE superior a 100 IU/ml.

Dos años después de las epidemias de asma se realizó un estudio caso-control para estudiar las características clínicas, funcionales e inmunológicas de estos pacientes asmáticos²⁹, como una continuación del estudio caso-control realizado en 1987. Este estudio incluía: 1) administración de un cuestionario respiratorio estandarizado, 2) evaluación de atopia mediante pruebas cutáneas frente a una batería de alérgenos comunes, 3) cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos IgE totales, y 4) pruebas de broncoprovocación con metacolina. Los resultados obtenidos corroboraron que los pacientes tenían una evolución favorable, que contrastaba con el elevado riesgo de sufrir episodios de asma e incluso muerte durante los días epidémicos. Sin embargo, a pesar de esta evolución favorable, los resultados de las pruebas cutáneas y los niveles de IgE totales fueron significativamente más elevados en los pacientes que en el grupo control, por lo que el estudio demostró que los individuos afectados estaban aún sensibilizados a pesar de que se encontraban asintomáticos, lo que hacía pensar en la existencia de estímulos antigénicos que mantenían los niveles de IgE específica a la soja.

Posteriormente, en 1995 se realizó otro estudio de seguimiento³⁰⁻³¹ en una población de asmáticos epidémicos y no epidémicos previamente estudiados en 1989. Se utilizó para este estudio el mismo protocolo de cuestionario, pruebas cutáneas, niveles de IgE totales y pruebas funcionales respiratorias. Se realizó también un control ambiental de los niveles de aeroalérgeno de soja durante 39 días de descarga en el puerto en los cuales el rango de concentración obtenido osciló entre 31 – 269 U/m³, nivel muy inferior al mínimo valor de 1.500 U/m³ encontrado durante un día

epidémico. La conclusión del estudio fue que 8 años después del último estudio de seguimiento se había producido una importante reducción en los niveles ambientales de soja aunque aproximadamente la mitad de los pacientes asmáticos epidémicos (55%) presentaban aún sensibilización a este alérgeno frente a un 6% de los pacientes asmáticos no epidémicos, lo que hacía pensar nuevamente que estos niveles eran suficientes para producir un estímulo antigénico en estos pacientes.

4.- NUEVOS EPISODIOS DE ASMA: BROTOS DE 1994 Y 1996.

Como ya se ha comentado, la instalación de los filtros de manga en los silos para la descarga de grano de soja, tuvo como consecuencia una importante reducción de la concentración atmosférica de esta leguminosa y una disminución del número de asmáticos atendidos en los servicios de urgencias⁶. Sin embargo, los estudios de seguimiento realizados después de las intervenciones, demostraron que un número considerable de asmáticos epidémicos seguían sensibilizados a la soja²⁹⁻³² lo que hacía sospechar de la existencia de niveles de soja en la atmósfera que producían estímulos antigénicos suficientes para mantener niveles de IgE específica a la soja en estos pacientes.

Efectivamente, tras unos años sin incidentes, en 1994, se detectó otro brote epidémico de menor magnitud que los observados durante los años 80 y en el que resultaron afectados 7 pacientes asmáticos repetidores³³. En total se registraron 12 ingresos, que aunque no suponían un incremento de casos en la ciudad, lo que sí que resultaba anormal era el hecho de que 7 de estos 12 casos correspondían a asmáticos repetidores, es decir pacientes que habían ingresado en los hospitales de la ciudad en días epidémicos anteriores.

Un estudio ambiental realizado posteriormente en filtros que se recogían diariamente de forma rutinaria para analizar la contaminación ambiental, permitió cuantificar los niveles de aeroalergeno de soja existentes durante esos días. Este estudio comprobó que, el día anterior a estos ingresos los niveles ambientales de soja se situaron en 1.122 U/m³, contrastando con un nivel máximo de 165 U/m³ medido en

un día no epidémico en este periodo³³. Este valor de 1.122 U/m³ estaba cercano al valor de 1.500 U/m³, considerado empíricamente como nivel umbral para la aparición de las epidemias. Tras diversos estudios se concluyó que durante las actividades relacionadas con la descarga de soja en el puerto en esos días, se produjo una emisión de polvo de soja superior al habitual^{31,33}. Este hecho hizo que se llevaran a cabo controles en las instalaciones de las empresas manipuladoras de soja en el puerto, aunque no pudo ser identificada ninguna incidencia durante la descarga y tampoco se pudo encontrar ninguna relación con las condiciones meteorológicas existentes en esos días³³.

En Junio de 1996, se detectó un nuevo brote de asma epidémico que afectó a 27 asmáticos, de los cuales 10 casos habían sido atendidos en anteriores brotes de asma. Durante esos días los registros relativos a las operaciones de descarga de soja por parte de las empresas tampoco permitieron identificar incidencias especiales⁴. A pesar de ello, se paralizaron las actividades de descarga de soja de dos buques cargados con 48.000 toneladas de soja que se habían iniciado durante esos días. En los días siguientes se procedió a la descarga controlada de esos buques, con importantes limitaciones de hora, ritmo y flujo, y sin simultaneidad entre los dos barcos. En este periodo ya se disponía de muestreadores ambientales que recogían diariamente muestras de aire urbano durante 24 horas en diversos puntos de la ciudad, aunque estas muestras eran conservadas y no se analizaban si no se producía ninguna incidencia. La existencia de estas muestras permitió un análisis retrospectivo que determinó que los niveles de soja durante estos días se situaban en un valor cercano a 1.500 U/m³.

5.- INCREMENTO Y MEJORA DE LAS INTERVENCIONES AMBIENTALES.

Hasta 1996 la descarga de soja en el puerto se realizaba sin restricciones, pero a partir del brote ocurrido en esa fecha, las operaciones de descarga fueron suspendidas cautelarmente hasta que se revisaron las instalaciones de las empresas del puerto y estas operaciones de descarga. Posteriormente, como ya se ha comentado, se autorizó la descarga de barcos no simultáneos con unas condiciones especiales (menor velocidad de descarga, restricciones horarias y restricciones relacionadas con las condiciones meteorológicas).

En Noviembre de 1997 se inició la sustitución de los sistemas de filtración de polvo a la atmósfera (filtros de manga) por unos sistemas más efectivos en la reducción de estas emisiones, y se empezó a controlar diariamente la concentración ambiental de aeroalergeno de soja.

5.1.- Renovación de los sistemas de filtración de las emisiones.

Para reducir las emisiones de polvo de soja a la atmósfera se instalaron nuevos filtros de manga con una mayor capacidad de retención, que sustitúan a los filtros de manga de poliéster instalados en 1987. Estos nuevos filtros, denominados MPS (*Micro Pore Size Bag Filters*) están fabricados con poliéster y fibras de acero inoxidable (BHA Purifilter, SL) y su instalación progresiva se inició para todas las empresas del puerto en Octubre de 1997, finalizándose su instalación completa en Marzo de 1998. También fueron instalados en estos nuevos filtros de manga detectores de ruptura con el propósito de minimizar las emisiones.

Estos nuevos filtros fueron instalados mientras se mantenía un régimen especial de descargas en el cual no se permitía la descarga simultánea de dos barcos y se restringían determinadas operaciones en función de las condiciones atmosféricas. Estas restricciones finalizaron en verano de 1998, aunque se mantenía una vigilancia extrema por si se debían poner de nuevo en funcionamiento si se producía un incremento de la concentración ambiental de aeroalergeno de soja³⁴.

5.2.- Seguimiento meteorológico.

La dispersión del polvo de soja a la atmósfera durante las actividades de descarga esta influenciada por fenómenos físicos muy determinados como son la velocidad del viento, la altitud de la capa de mezcla del aire y las turbulencias verticales de esta capa. Durante los días epidémicos había una situación anticiclónica con una baja altitud de la capa de mezcla y viento ligero. Estas condiciones facilitan la dispersión del polvo y ocasionan que una emisión estable de soja a la atmósfera se comporte de forma diferente en función de las condiciones atmosféricas de ese momento³⁴.

Estas características han hecho posible establecer un modelo para predecir los niveles de inmisión del polvo de soja que se utiliza de forma preventiva ya que se conoce que unas condiciones meteorológicas determinadas están asociadas a unos niveles elevados de aeroalergeno de soja. Mediante esta modelización se han podido establecer unas condiciones meteorológicas de seguridad y unas condiciones de riesgo, bajo las cuales se pueden alcanzar niveles elevados de aeroalergeno de soja en la atmósfera. Estas valoraciones se incorporaron a las medidas de control, de forma que se consideran como una segunda barrera de seguridad después del control apropiado de las emisiones. Por ello, en aquellos casos en los que las condiciones

meteorológicas entran dentro del área considerada de riesgo, se informa al Ayuntamiento y a las empresas, y bajo determinadas condiciones extremas, la descarga de soja es suspendida para evitar incrementos puntuales en la atmósfera³⁴.

5.3.- Monitorización diaria de la concentración de aeroalergeno de soja.

Los primeros estudios de estimación de los niveles ambientales de aeroalergeno de soja se iniciaron, como ya se ha comentado, en 1986. Estos niveles de aeroalergeno se obtienen a partir del análisis de muestras de aire recogidas en unos filtros colocados en muestreadores de aire que están distribuidos en diversas zonas de la ciudad. Estos filtros se recogen en periodos de muestreo de 24 horas y son conservados hasta el momento de su análisis.

Como ya se ha comentado en el apartado 3.2, en los primeros estudios ambientales que se realizaron durante las epidemias, estas muestras eran enviadas a la *Mayo Clinic* donde eran analizadas mediante un inmunoensayo específico (técnica de RAST-inhibición)³⁵. Con este método se han realizado diversos estudios ambientales, pero a consecuencia de los brotes epidémicos ocurridos en 1996, el Ayuntamiento reforzó la red de muestreadores ambientales, y se decidió realizar un seguimiento diario de los niveles de inmisión de soja a la atmósfera, para evitar que se alcanzaran nuevamente niveles que produjeran nuevos brotes de asma. Sin embargo, el tiempo necesario para disponer de los resultados de los análisis ambientales realizados en la *Mayo Clinic* era superior a 15 días, lo que planteó la necesidad de disponer de un laboratorio más cercano para que estos análisis fueran más rápidos⁴.

Por este motivo se inició un trabajo en el *Hospital Vall d'Hebron* que consistió en la estandarización de un método de ELISA-inhibición que fuera sensible y reproducible y que fuera comparable con el método desarrollado en la *Mayo Clinic*. El

poder realizar los análisis en la misma ciudad, reducía el tiempo de obtención de los resultados y por ello, este fue uno de los objetivos del primer trabajo presentado en esta tesis doctoral. Puesto que los estudios ambientales previos se habían realizado con el método desarrollado en la *Mayo Clinic*, era importante que el nuevo método tuviera las mismas características que el anterior con el fin de que los resultados obtenidos en ambos laboratorios fueran comparables.

La diferencia entre los métodos de ELISA y RAST es que estos últimos utilizan materiales radioactivos para obtener los resultados. Al iniciar la estandarización del nuevo método en el *Hospital Vall d'Hebron* se tomó la decisión de utilizar una técnica de ELISA que tiene una sensibilidad similar y no presenta los problemas asociados a la utilización de materiales radioactivos. A pesar de esta variación, y por lo comentado anteriormente, las características del método debían ser similares a las del ensayo desarrollado en la *Mayo Clinic* y por ello, y con la colaboración de dicho centro, se realizó un estudio de concordancia de ambos métodos para conocer si los resultados eran transferibles entre laboratorios, lo que supuso otro de los objetivos del primer trabajo presentado en esta tesis doctoral.

Una vez estandarizado el ensayo, a partir de noviembre de 1997 se comenzaron a efectuar medidas de concentración de aeroalergeno de soja en la ciudad cada 24 horas utilizando este método de ELISA-inhibición. Estas medidas diarias han permitido disponer de un amplio registro de valores que aportan datos sobre comportamiento del aeroalergeno de soja en función de diversas variables como la descarga de soja en el puerto o las condiciones meteorológicas; y han permitido la realización del segundo trabajo incluido en la presente tesis doctoral que esta encaminado a comprobar, mediante la monitorización de la concentración del alérgeno de soja ambiental, la efectividad de las medidas de control implantadas para la descarga. En este trabajo se ha estudiado además el impacto de estas medidas

mediante el registro del número de pacientes asmáticos admitidos en los hospitales de la ciudad durante un periodo determinado y el estudio de la sensibilización de estos pacientes al alérgeno de soja. Estos datos pueden ser de ayuda en otras ciudades donde se descarga y/o manipula semilla de soja para iniciar medidas preventivas encaminadas a minimizar la exposición de la población sensibilizada a dicho alérgeno.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los objetivos de los estudios presentados en esta Tesis Doctoral son los descritos a continuación:

Estudio 1:

Cruz MJ, Rodrigo MJ, Antó JM, Morell F. An amplified ELISA-inhibition method for the measurement of airborne soybean allergens. Int Arch Allergy Clin Immunol 2000;122:42-8.

Los objetivos específicos del primer estudio fueron:

1. Estandarizar un método de ELISA-inhibición amplificado para la estimación de la concentración ambiental de aeroalergeno de soja.
2. Comparar este método con un método de RAST-inhibición previamente descrito.

Estudio 2:

Rodrigo MJ, Cruz MJ, Garcia M, Antó JM, Genover T, Morell F. Epidemic asthma in Barcelona. An evaluation of new strategies for the control of soybean dust emission. Int Arch Allergy Clin Immunol (2004;134: 158-64).

Los objetivos específicos del segundo estudio fueron:

3. Analizar el efecto de las medidas protectoras implantadas en el puerto de la ciudad de Barcelona para la descarga de soja.
4. Estudiar el efecto de las descargas de la semilla de soja tras la implantación de estas nuevas medidas en:
 - 4.1. El incremento de la concentración ambiental de este aeroalergeno.
 - 4.2. El desarrollo de síntomas en los pacientes asmáticos sensibilizados.

PUBLICACIONES

International Archives of Allergy and Immunology

**An amplified ELISA inhibition method for the measurement
of airborne soybean allergens**

Cruz MJ, Rodrigo MJ, Antó JM, Morell F

Int Arch Allergy Immunol 2000;122:42-8

An Amplified ELISA Inhibition Method for the Measurement of Airborne Soybean Allergens

Maria-Jesús Cruz^a Maria-José Rodrigo^b Josep-Maria Antó^c
Ferran Morell^a

Serveis de ^aPneumologia i ^bBioquímica (U. Immunología) Hospital General Vall d'Hebrón, i

^cDepartament d'Epidemiologia i Salut Pública, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques i
Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

Key Words

ELISA · Inhibition · Soybean · Aeroallergen

Abstract

Background: Measurement of the soybean aeroallergen in Barcelona and other cities where soybean is unloaded is of increasing importance in controlling population exposure and evaluating the influence of such exposure on the persistence of asthma symptoms. **Objective:** The aims of the study were: (1) to standardize an amplified ELISA inhibition method for the quantification of soybean aeroallergen and (2) to compare this method to a previously described RAST inhibition method. **Methods and Results:** An amplified competitive ELISA inhibition method with a biotin-streptavidin system was carried out using a pool of sera from soybean-sensitized patients. The results were expressed as U/ml using a low-molecular-mass soybean allergen as reference standard. Reproducibility was calculated by statistically comparing the slope of the regression lines of the standard curve of 4 consecutive assays and by determining the coefficient of variation (CV) of the percent inhibition data for each

point of several independent standard curves, each from the same assay (intra-assay) and also from a separate assay (inter-assay). No significant differences in the slopes were obtained by analysis of covariance (ANCOVA) $F = 1.04$. The CV between assays varied between 4 and 22% (for the assay range used in the reference standard) and was greater than the CV within assays (5–10%). Only values with a CV(%) smaller than 20% were considered acceptable. 78.5% of the samples satisfied this criterion. The RAST inhibition and ELISA inhibition methods were compared by difference plots from the values of 338 air filter eluates. The intraclass correlation coefficient was 0.456 ($p < 0.001$). After the results of both methods were classified as lower and higher than 165 U/m³, the kappa index was 0.46 ($p < 0.001$). **Conclusions:** The data obtained in the present study are comparable to those reported from other similar immunoassays. Moreover, despite the difficulty in comparing air-sampling values from different laboratories, the kappa index may be taken to represent fairly good agreement beyond chance between both methods. All these data demonstrate that the present immunoassay is useful for measuring airborne soybean aeroallergens and can also be applied to evaluate the relationship between exposure and the development of asthma symptoms.

The first two authors have contributed equally to the design of the study and the writing of the manuscript.

Copyright © 2000 S. Karger AG, Basel

KARGER

Fax + 41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2000 S. Karger AG, Basel
1018–2438/00/1221–0042\$17.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/journals/iaa

Correspondence to: Dr. Maria-José Rodrigo
Servei de Bioquímica (Immunology Unit)
Hospital General Vall d'Hebrón, Passeig Vall d'Hebrón, 119-129
E-08035 Barcelona (Spain)
Tel./Fax +34 93 4894049, E-Mail mrodrigo@hg.vhebron.es

Introduction

From 1981 to 1987, 26 asthma outbreaks occurred in Barcelona. Epidemic days of acute asthma accounted for 958 emergency room admissions for unusually severe asthma exacerbations, resulting in 20 deaths and frequent admissions to the intensive care unit. Investigation of these epidemics revealed that the outbreaks were caused by soybean dust generated by unloading of soybeans in Barcelona harbor on days when the wind carried the soybean dust over the city [1–3]. Rodrigo et al. [2] demonstrated that during an epidemic the serum of patients with asthma reacted specifically to an acidic, low-molecular mass (LMM) protein (<14 kD) located principally in hulls and dust of soybeans unloaded in the harbor. Two proteins located in soybean hulls were later shown to be the main allergens responsible for this asthma epidemic [4]. Both proteins are isoallergens (Gly m 1a and Gly m 1b) with molecular weights of 7.0 and 7.5 kD, respectively, and are highly homologous with the hydrophobic soybean protein (HSP) described by Odani et al. [5].

In 1987, measures were taken to avoid the release of large amounts of soybean dust into the atmosphere during unloading. These measures consisted of fitting the silos with bag filters and regularly following up dust emissions during the soybean unloading process. This drastically reduced the spread of the dust into the atmosphere. This action produced a significant decrease in the atmospheric concentration of the dust and, as a consequence, the asthma epidemics disappeared [6]. However, low concentrations of soybean dust still persist in the atmosphere at detectable levels and despite the disappearance of the epidemics, a large number of the individuals affected were still sensitive to soybean [6].

Soybean epidemic asthma has been well documented in New Orleans, La. (USA) [7], Naples (Italy) [8] and some cities in Spain [9–11]. These studies have demonstrated the importance of reducing the emissions of soybean dust during unloading operations. Therefore it is very useful to have systems to monitor airborne soybean allergen. Measurement of soybean aeroallergen concentration is currently achieved by automated air samplers in the city [12]. The allergen is extracted from the filters in these air samplers and immunochemically assayed for its contents of soybean proteins [13, 14]. These measurements are used to assess the effectiveness of the interventions aimed at reducing allergen exposure and to examine exposure-response relationships in the asthmatic population [15].

Several different immunological methods have been used to measure occupational allergens, with the RAST and ELISA inhibition being the most used. However, ELISA methods have replaced the radioimmunoassays in many laboratories, as they offer comparable sensitivity without the problems of disposal and the short half-life associated with radioactive materials [16].

Although inhibition methods are used by the FDA to quantify skin test extracts [17] – also with other immunochemical techniques – in most cases these methods are considered semiquantitative assays with potential long-term reproducibility problems because of the use of heterogeneous antibody pools [18]. As a consequence, the comparison of absolute measurements of airborne allergens among different studies is difficult. For each antigen, therefore, assessment of the efficacy of each of these techniques is essential for the quantification of exposure data [19].

The aims of the present study were: (1) to standardize an amplified ELISA inhibition method for the measurement of soybean aeroallergen; (2) to compare this method with a previously described RAST inhibition assay [13].

Materials and Methods

Air Sampling

According to previous studies [12], large-volume automated air samplers (CAV-A/HF, MCV, SA, Barcelona, Spain) containing glass microfiber filters with a pore size of 1 µm (Whatman International Ltd., UK), installed in three districts of the city close to the harbor and changed daily facilitate the collection of samples of airborne soybean dust. The air volume used for dust collection was 55 m³/h.

Glass Microfiber Filter Elution

Soybean aeroallergens were extracted from the filters in 5 ml PBS/0.2% BSA/0.1% Tween 20, pH 7.4 overnight at 4°C, after which the filter was discarded and the eluates analyzed.

Validation of Allergen Extract

A soybean LMM allergen (soybean-LMM) containing proteins with a molecular weight lower than 10 kD was used as reference preparation for soybean aeroallergen measurement. This reference preparation was prepared following the protocol of Swanson et al. [13].

A soluble protein extraction with 0.1 M NH₄ (HCO₃) buffer, pH 7.9, was done. The eluate was subjected to double dialysis with 10- and 3.5-kD pore size membranes (Spectrapor, Iberlabo, Los Angeles, Calif., USA). Briefly, a solution of 100 ml of the soybean extract was added to the 10-kD pore size dialysis membrane. The membrane was placed posteriorly inside another 3.5-kD pore size membrane, together with 300 ml of H₂O. The extract was dialyzed against H₂O at 4°C and shaken. The fraction containing the proteins with molecular weights between 10 and 3.5 kD was later concentrated to a final volume of 2 ml.

The following studies were conducted to assess the properties of the soybean-LMM:

Protein Composition (Electrophoresis of the Extract). The extract was loaded onto a 5–17% SDS-polyacrylamide gradient gel. Antigen extract containing 20 and 25 µg of protein was treated with 5% mercaptoethanol and applied to a 3% stacking gel. Electrophoresis was carried out at 20 mA per gel until the tracing dye reached the bottom of the gel. After electrophoresis, gels were stained with Coomassie brilliant blue (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., USA).

Specificity of the Reference Preparation. In order to confirm whether this soybean-LMM maintains its allergenic properties, 32 samples from asthmatic patients with a known concentration of IgE to soybean (*Glycine max*, f14, UniCAP 100, Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) were assayed by ELISA using the soybean-LMM standard and HSP [5] as antigens. Correlation coefficients between soybean-LMM and HSP were analyzed by the Spearman rank test.

ELISA Inhibition Assay

The soybean allergen was determined by an amplified competitive ELISA inhibition assay based on the method described by Swanson et al. [13] and modified as follows: wells of high-binding microtiter plates (Costar, Cambridge, Mass., USA) were incubated overnight at room temperature with the LMM allergen (1:1,000 v/v) in 0.2 M Na₂CO₃/NaHCO₃ buffer, pH 9.2. After three washes (0.1 M phosphate buffer/0.1% Tween 20, pH 7.4), the plates were incubated overnight at room temperature with 50 µl/well of either air sample extract or the soybean-LMM reference preparation (with an assigned value of 10⁶ U/ml) and 50 µl/well of an undiluted pool of sera from 12 allergic patients (mean age 44 years) with 19 kU/l specific IgE to soybean (UniCAP 100, Pharmacia AB, Uppsala, Sweden). The OD at this antigen concentration at 450 nm was not higher than 1.20. It should be noted that the pool of sera was obtained in large quantities prior to starting the study to ensure the availability of this reagent. After three washes, 100 µl/well of biotinylated anti-human IgE (0.5 µg/ml, clone B3102E8; SBA, Ala., USA) were incubated for 1 h at 37°C and then rinsed. Thereafter, the plates were incubated with 100 µl/well of streptavidin-peroxidase (1 µg/ml; SBA) for 1 h at 37°C and then rinsed. Thereafter, the reaction was allowed to develop with 3% H₂O₂, 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine for 20 min at room temperature in the dark. The reaction was stopped with 2 M H₂SO₄ and read at 450 nm with a plate reader (Titertek Multiskan Plus MKII). The standard curve was constructed from six data points using a four-parameter logistic curve fit, and the percentage inhibition was calculated by comparison with the uninhibited serum pool. The soybean concentration of the air samples was calculated as:

$$[\text{soybean}] \text{ (U/m}^3\text{)} = \frac{(\text{U/well}) \times \text{filter elution volume (ml)}}{\text{volume of air sampled (m}^3\text{)}}.$$

The minimum amount of allergen detectable with this assay was calculated as the percentage of the maximum inhibition from which the curve is no longer linear. This limit varied in each assay and is expressed as U/ml. In the assays carried out in this study, the detection limit oscillated between 300 and 1,860 U/ml, 1 U was indirectly estimated to contain approximately 1 ng of allergen [12]. These limits were used to calculate the detection limits for a mean sampled volume of 150 m³. These limits oscillated between 10 and 62 U.

Reproducibility

The reproducibility of the assay was assessed in two ways: (1) by comparing the slope of the standard curve of four consecutive assays. The percent inhibition data for each of the curves were plotted against log concentration. The regression line in each case was con-

structed from at least six points. Significant differences in the slopes of the lines were then tested by analysis of covariance (ANCOVA); and (2) by calculating the coefficient of variation (CV) within and between assays. The CV of the assay was calculated by determining the CV of the percent inhibition data for each point of several independent standard curves each from the same assay (intra-assay) and from a separate assay (inter-assay). The standard curves of the same assay were independently diluted.

Comparison between the RAST and ELISA Inhibition Methods

The values for 338 air samples collected in glass microfiber filters of automated air samplers were analyzed by the method described in this paper and compared with the RAST inhibition method described by Swanson et al. [13]. The two assays used the same elution method and the soybean-LMM extract previously described as antigen and reference preparation. Agreement between both methods was assessed after classifying the results as lower and higher than 165 U/m³, since this value was the highest value recorded in 22 days after the interventions [6].

Statistical Analysis

ANCOVA was used in the reproducibility study when comparing the slopes of the regression lines obtained for the standard curves. The significance of the test was then obtained from F tables. Correlation coefficients between soybean-LMM and HSP were subjected to the Spearman rank test. The 'difference plot' statistical procedure recommended by Bland and Altman [20] was used to compare the soybean concentration obtained by the ELISA inhibition and the RAST inhibition methods; after logit transformation of the data, the difference between the paired measurements was plotted against the mean of the measurements. The 95% confidence interval for the differences was used to assess the differences between both methods. The limits of this interval were given by the mean difference ± 1.96 SD. The kappa index and intraclass correlation coefficient were used to assess the agreement between the two methods.

Results

Validation of Allergen Extract

Protein Composition. Figure 1 shows the Coomassie brilliant blue stain of 5–17% SDS-PAGE gel of soybean-LMM extract. The extract demonstrated predominant bands <14.4-kD MW markers.

Specificity of the Reference Preparation. For the 32 values of specific IgE (A_{450 nm}) against soybean-LMM and HSP in asthmatic patients, the medians (ranges) were 0.187 (0.092–0.887) for soybean-LMM and 0.274 (0.109–1.068) for HSP. No significant differences were found between them (r = 0.939, p < 0.0001).

Variation in Sample Duplicates and Criteria for Result Acceptance

Owing to the variability of these methods, specific criteria for result acceptance were established. Figure 2 shows the variation in duplicates of 84 samples used to

1

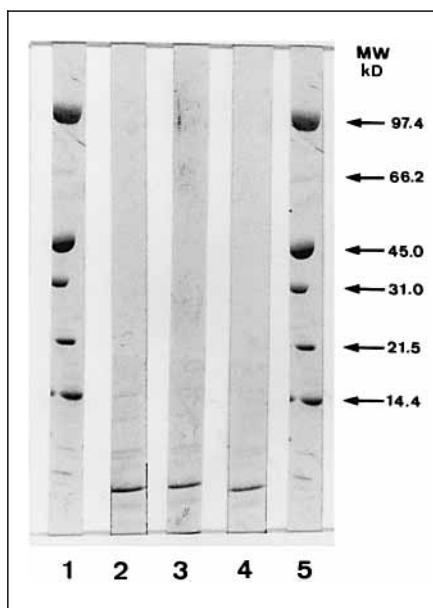
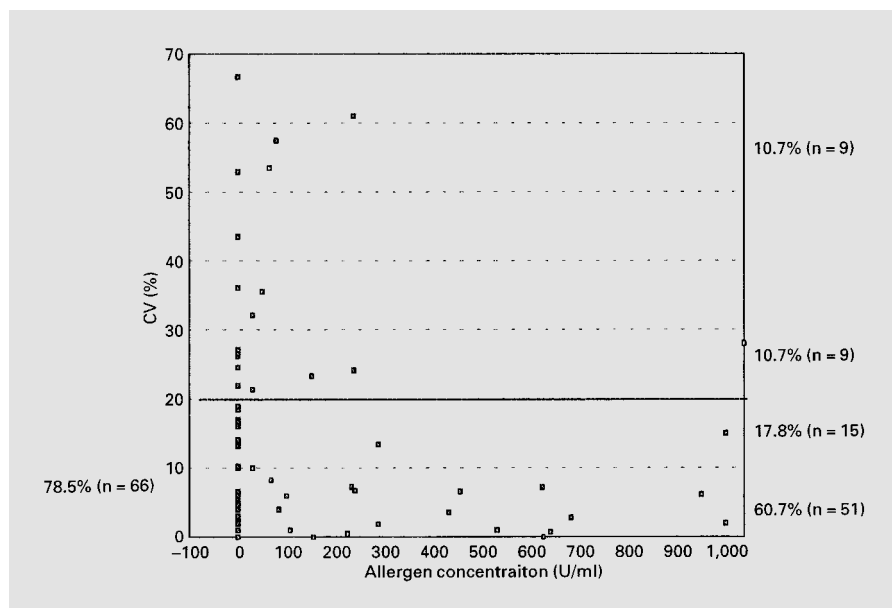


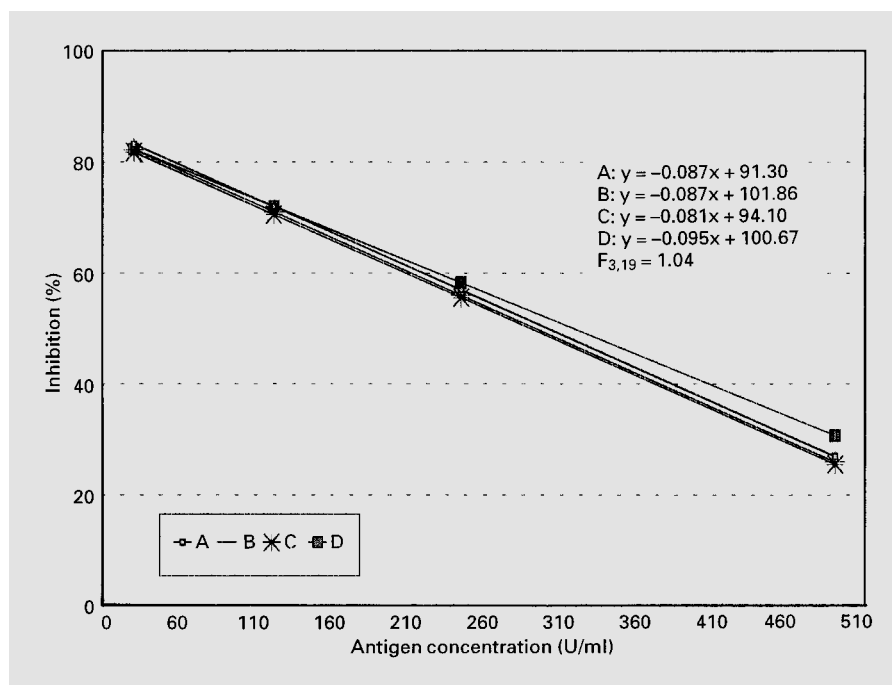
Fig. 1. Coomassie brilliant blue stain of 5–17% SDS-PAGE gel of soybean-LMM standard. Lanes 1 and 5: MW markers; lanes 2–4: soybean-LMM (20, 20 and 25 μ g). The extract demonstrated predominant bands <14.4-kD MW markers.

Fig. 2. Variation in duplicates of 84 samples. We consider only values with a CV(%) of less than 20% as a criterion for acceptance of results. 78.5% of the samples were within this criterion.

Fig. 3. No significant difference was found between the slopes of the four standard curves (ANCOVA) performed consecutively. These results show that the assays are comparable.



2



3

standardize the method. Only values with a CV(%) less than 20% were considered acceptable. 78.5% of the samples satisfied this criterion. All tested samples were repeated until this criterion was met.

Reproducibility

The regression lines derived from the standard curves of four consecutive assays are shown in figure 3. No sig-

nificant differences were found among the slopes of the four standard curves plotted consecutively. These results show that the assays are comparable. The CV between assays varied between 4 and 22% (for the assay range used in the reference standard) and was greater than the CV within assays, which ranged from 5 to 10%.

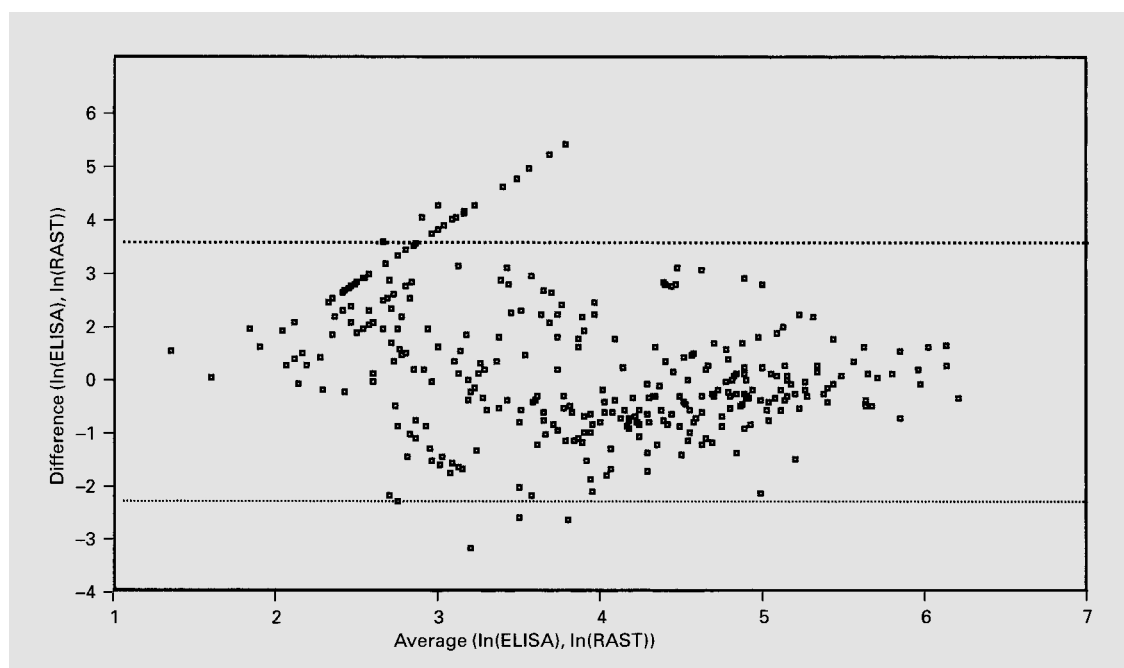


Fig. 4. log difference plot of 336 samples measured by the two immunoassays with limits of agreement (dashed lines).

Comparison between the RAST and ELISA Inhibition Methods

Median concentrations of soybean allergens were calculated as the distributions were not normal. The median (range) values of the 338 air samples were 50 U/m³ (0–636) for the ELISA inhibition method and 54 U/m³ (0–610) for the RAST inhibition method. Figure 4 shows the difference plot analysis of the concentrations (U/m³) of the 338 air filter eluates. The differences between logarithms were –2.24 and 2.6 in approximately 95% of the cases. The intraclass correlation coefficient was 0.456 ($p < 0.001$). After classifying the results of both methods as lower than or equal to 165 U/m³ and higher than 165 U/m³, the value of the kappa index was 0.46 ($p < 0.001$).

Discussion

Both the epidemiological studies and the studies on specific IgE to soybean carried out following the asthma epidemics in Barcelona attributed their cause to the unloading of soybean in the harbor [1, 3]. The environmental intervention in September 1987 with the installation of bag filters in a silo led to a decrease in airborne soybean concentrations and the subsequent disappear-

ance of the epidemics [6]. The 1,555 U/m³ level of soybean allergen detected during a determined asthma epidemic day [12, 21] was substantially higher than the highest value (165 U/m³) recorded in 22 unloading days after the interventions [6]. These data show that the measurement of soybean aeroallergen levels in harbors loading and unloading soybean is of increasing importance in controlling the efficiency of the environmental interventions in order to prevent new asthma outbreaks in these areas.

The present study reports the assessment of a new amplified ELISA inhibition method for the measurement of this airborne soybean allergen, with a biotin-streptavidin system which increases the sensitivity of this assay. Several techniques have been used to measure the allergens in the air [18, 22–24]. The direct ELISA or RIA methods are used for the measurement of allergens for which there are specific monoclonal antibodies and purified antigen for use as a reference standard. Rapid advances have been made in the last few years in allergen characterization and sequence determination using chemical and molecular biological approaches. However, in many cases neither specific monoclonal antibodies nor purified antigen are available. In these cases, the other alternatives are competitive immunoassays. The principle of these methods is the comparison of specific immu-

noglobulin binding by the soluble material extracted from the filters with a reference allergen source.

Competitive inhibition assays are considered to be semiquantitative methods [19], and accurate measurement requires assessment of the efficacy of these techniques. One of the limitations is the absence of standards, which are currently unavailable for quantifying soybean aeroallergen. The results of the present study refer to a reference preparation (soybean-LMM) with an assigned value of 10^6 U/ml. The soybean-LMM reference proved to be a suitable reference preparation for the measurement of soybean exposure, as shown by the results of the SDS-PAGE gel (fig. 1) and the correlation study of specific IgE to HSP. These studies demonstrated that this standard is composed of the LMM proteins responsible for the asthma epidemics and contains most of the soybean allergenic activity [2].

A further disadvantage of these methods is their poor reproducibility. In our study, the results of intra- and interassay CVs and the slope of the inhibition curves (fig. 3) show them to be comparable to those reported for similar immunoassays [18, 25]. However, in order to improve the quality of the method, it is necessary to establish a specific criterion for result acceptance. Only values with a CV(%) in duplicates less than 20% were considered as acceptable. This seems to be a valid criterion considering that these are semiquantitative methods and are similar to those adopted by other authors. Gordon et al. [25], in a study of measurement of airborne rat urinary allergens, allowed more than 30% variation in duplicates. On the other hand, another factor which decreases the variability of the method is the use of PBS/0.2% BSA/0.1% Tween 20 as elution buffer, as the addition of Tween 20 to the elution buffer is known to be the simplest, most sensitive and reproducible method for aeroallergen elution.

In the absence of a 'gold standard' for measuring soybean allergen in airborne dust samples, the present study compared the two methods currently available for the measurement of this aeroallergen. This study showed that results obtained by the two methods gave similar relative values but that individual concentrations showed differences. It is common practice to use correlation coefficients and regression lines when comparing two methods. This approach, however, does not give the measure of agreement between the methods. An alternative method is the use of difference plots [20, 26], which was that used in this study. The intraclass correlation coefficient was $r = 0.456$, $p < 0.001$, but once the results were classified as lower and higher than 165 U/m^3 , the kappa index of 0.46,

$p < 0.001$ may be taken as presenting fair to good agreement beyond chance [27].

Differences between these immunoassays could theoretically be due to the dust-sampling method and filter elution or to the immunoassays used [28, 29]. Given that the dust-sampling method and filter elution are the same for both assays, in this case differences could be due to the immunoassay used. Other comparative studies for the measurement of airborne rat allergen levels have shown that identical air samples would yield different results depending on the assay technology used, with the most important factors being the source and type of antibodies employed [30, 31]. In this study, the different sources of antibodies used could explain some of the differences obtained in the individual concentrations, as demonstrated by Swanson et al. [32], in a study of airborne mite allergens using monoclonal antibodies, rabbit polyclonals and human sera as detection antibodies.

This study shows that the ELISA inhibition assay described is a useful tool for the measurement of soybean aeroallergen. The practical significance of the results of this assay is that the allergen can be measured with a competitive ELISA method, since although monoclonal assays had high sensitivity, specificity and reproducibility, they were limited in that they do not detect other allergens present that may cause symptoms. This method is a marker of allergen load and, together with the measurement of meteorological atmospheric conditions, permits a control during the unloading of soybean in Barcelona to be established. This assay also informs on the concentration of this allergen in the atmosphere and facilitates the monitoring of the impact of environmental intervention controls used, e.g. unloading with a system of pumps that reduces the quantity of dust in the atmosphere, thereby avoiding excessive levels of soybean allergen.

In conclusion, the amplified ELISA inhibition method described appears to be an effective and reproducible method to be used for the measurement of soybean allergen in the environment where this bean is manipulated.

Acknowledgments

We thank Dr. Lluís Armadans (Hospital Vall d'Hebron) for his helpful recommendations in the statistical analysis, Merce Aceves (Entitat Metropolitana, Servei Medi Ambient) for her technical collaboration in the air sampling, Jordi Vila and Dolors Carrascal (Servei Medi Ambient, Port de Barcelona) for their valuable support, and Cristina O'Hara for her help with the English translation of the manuscript. This research was supported in part by a grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias (Fis 98/0332) and FUCAP 1997.

References

- Antó JM, Sunyer J, Rodríguez-Roisin R, Suarez M, Vazquez L: Asthma epidemics associated with soybean dust relevant during harbor activities. *N Engl J Med* 1989;320:1097-1102.
- Rodrigo MJ, Morell F, Helm RM, Swanson M, Greife A, Antó JM, et al: Identification and partial characterization of the soybean-dust allergens involved in the Barcelona asthma epidemic. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:778-784.
- Sunyer J, Antó JM, Rodrigo MJ, Morell F: Epidemic asthma and soybean IgE antibodies. *Lancet* 1989;i:179-182.
- Gonzalez R, Varela J, Carreira J, Polo F: Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* 1995;346:48-49.
- Odani S, Koide T, Ono T, Seto I, Tanaka T: Soybean hydrophobic protein: Isolation, partial characterization and the complete primary structure. *Eur J Biochem* 1987;162:485-491.
- Antó JM, Sunyer J, Reed CE, Sabria J, Martinez F, Morell F, et al: Preventing asthma epidemics due to soybean by dust-control measures. *N Engl J Med* 1993;329:1760-1763.
- White MC, Etzel RA, Olson DR, Goldstein IF: Reexamination of epidemic asthma in New Orleans, Louisiana, in relation to the presence of soy at the harbour. *Am J Epidemiol* 1997;145:1-7.
- Cocco G, Schiano M, Sacerdoti G: Functional characteristics in soybean asthma (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:469.
- Navarro C, Marquez M, Hernando L, Galvan F, Zapatero L, Caravaca F: Epidemic asthma in Cartagena, Spain, and its association with soybean sensitivity. *Epidemiology* 1993;4:76-79.
- Garcia-Ortega P, Rovira E, Mora E: Epidemias de asma alérgica a semilla de soja en ciudades pequeñas. *Med Clin (Barc)* 1997;108:677.
- Ballester F, Soriano JB, Otero I, Rivera ML, Sunyer J, Merelles A, et al: Asthma visits to emergency rooms and soybean unloading in the harbours of Valencia and A Coruña, Spain. *Am J Epidemiol* 1999;149:315-322.
- Aceves M, Grimalt JO, Sunyer J, Antó JM, Reed CE: Identification of soybean dust as an epidemic asthma agent in urban areas by molecular marker and RAST analysis of aerosols. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:124-134.
- Swanson MC, Li J, Wentz-Murtha PE, Trudeau WL, Fernandez-Caldas E, Greife A, et al: Source of the aeroallergen of soybean dust: A low molecular mass from the soybean tela. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:783-788.
- Li JT, Swanson MC, Rando RJ, Wentz-Murtha P, Ovsyannikova IG, Morell F, et al: Soybean aeroallergen around the port of New Orleans: A potential cause of asthma. *Aerobiologia* 1996;12:173-176.
- Newman-Taylor A, Tee RD: Environmental and occupational asthma. Exposure assessment. *Chest* 1990;5:209S-211S.
- Carpenter AB: Enzyme-linked immunoassays; in Rose NR, Folds JD, Nakamura RM (eds): *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, ed 5. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1997, pp 908-915.
- American Academy of Allergy, Asthma and Immunology (AAAAI). The use of standardized allergen extracts. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:583-586.
- Renström A, Gordon S, Larsson PH, Tee RD, Newman-Taylor AJ, Malmberg P: Comparison of a radioallergosorbent (RAST) inhibition method and a monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for aeroallergen measurement. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1314-1321.
- Gordon S, Kiernan LA, Nieuwenhuijsen MJ, Cook AD, Rosemary RD, Newman-Taylor AJ: Measurement of exposure to mouse urinary proteins in an epidemiological study. *Occup Environ Med* 1997;54:135-140.
- Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307-310.
- Soriano JB, Antó JM, Plasencia A, and the Barcelona Soybean-Asthma Group: Repeaters count: A sentinel method for asthma outbreaks. *Thorax* 1995;50:1101-1103.
- Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TAE, Miller JD, Lopez M, Chapman MD: A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantitation of the major *Dermatophagoides* spp. allergens, *Der p* 1, *Der f* 1. *J Immunol Methods* 1989;118:227-235.
- Bollinger ME, Wood RA, Chen P, Eggleston PA: Measurement of cat allergen levels in the home by use of an amplified ELISA. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:124-125.
- Houba R, Van Run P, Doekes G, Heederik D, Spithoven J: Airborne levels of α -amylase allergens in bakeries. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:286-292.
- Gordon S, Tee RD, Nieuwenhuijsen MJ, Lowson D, Harris J, Newman-Taylor AJ: Measurement of airborne rat urinary allergen in an epidemiological study. *Clin Exp Allergy* 1994;24:1070-1077.
- Holls S: Analysis of method comparison studies. *JIFCC* 1997;9(1).
- The measure of interrater agreement; in Fleiss JL: *Statistical methods for rates and proportions*. New York, Wiley, 1981, pp 212-236.
- Vaughan NP, Chalmers CP, Botham RA: Field comparison of personal samplers for inhalable dust. *Ann Occup Hyg* 1990;34:553-573.
- Kenny LC, Aitken R, Chalmers C, Fabries JF, Gonzalez-Fernandez E, Kromhout H, et al: A collaborative European study of personal inhalable aerosol samplers performance. *Ann Occup Hyg* 1997;41:135-153.
- Hollander A, Gordon S, Renström A, Thissen J, Doekes G, Larsson PH, et al: Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels. I. Analysis of air samples. *Allergy* 1999;54:142-149.
- Renström A, Gordon S, Hollander A, Spithoven J, Larsson PH, Venables KM, et al: Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels. II. Factors influencing antigen detection. *Allergy* 1999;54:150-157.
- Swanson MC, Campbell AR, Klauck MJ, Reed CE: Correlation between levels of mite and cat allergens in settled and airborne dust. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:776-783.

International Archives of Allergy and Immunology

Epidemic asthma in Barcelona. An evaluation of new strategies for the control of soybean dust emission.

Rodrigo MJ, Cruz MJ, García M, Antó JM, Morell F

Int Arch Allergy Immunol, 2004; 134: 158-64.

Epidemic Asthma in Barcelona: An Evaluation of New Strategies for the Control of Soybean Dust Emission

María-José Rodrigo^a María-Jesús Cruz^a María-del-Mar García^b
Josep-María Antó^c Teresa Genover^d Ferran Morell^a

^aUnitat de Recerca en Neumologia i Unitat Immunologia, Servei de Pneumologia, Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, ^bDivisió de Medicina Preventiva i Salut Pública, Facultat de Medicina, ^cDepartament d'Epidemiologia i Salut Pública, Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques i Universitat Pompeu Fabra, i ^dCentre d'Atenció Primària Turó, Barcelona, Espanya

Key Words

ELISA-inhibition · Soybean · Aeroallergen

Abstract

Background: Asthma attacks and mortality due to inhalation of soybean antigens in Barcelona have been well documented. Strict protective measures in the unloading process were established in 1998 to avoid the release of soybean dust into the atmosphere. The present study was undertaken to assess the effectiveness of these latest environmental measures, and, if effective, to recommend their implementation in the many harbours where soybean is unloaded. **Methods:** Levels of soybean aeroallergen were analysed daily during a period of 5 years and 2 months in a total of 1,854 samples, 125 from the pre-intervention period and 1,729 from the postintervention period. Additionally, the number of asthma admissions to the emergency rooms of the city's three largest hospitals was recorded. Asthma patients attended at home by the public home emergency service and judicial autopsies registering asthma deaths were also investi-

gated. **Results:** The mean concentration of soybean aeroallergen was 159 U/m³ in the pre-intervention period and 39 U/m³ in the postintervention period ($p < 0.0001$). Significant differences in postintervention aeroallergen concentrations were found between days of soybean unloading (42 U/m³) and days of no unloading (33 U/m³), with $p < 0.0001$. No significant relationship was found between concentrations of environmental soybean aeroallergens and the number of emergency room admissions for asthma. **Conclusions:** Implementation of stricter protective measures in silos for the soybean unloading process has reduced the concentration of soybean dust in the atmosphere and evidences the effectiveness of the measures adopted.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

The first two authors have contributed equally to the design of the study and the writing of the manuscript.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2004 S. Karger AG, Basel
1018–2438/04/1342–0158\$21.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/iaa

Correspondence to: Dr. M^a José Rodrigo
Unitat de Recerca en Neumologia i Unitat Immunologia
Hospital General Vall d'Hebrón, Passeig Vall d'Hebrón, 119–129
ES–08035 Barcelona (Spain)
Tel./Fax +34 93 4894049, E-Mail mjrodrigo@vhebron.net

Introduction

From 1981 to 1987, 26 asthma outbreaks occurred in Barcelona. During that time, acute asthma accounted for 958 emergency hospital admissions, mostly due to unusually severe asthma exacerbation, as well as a high rate of admissions to the intensive-care unit and 20 deaths. Investigation into these epidemics revealed that the asthma outbreaks were caused by soybean dust generated by soybean unloading in the harbour when certain wind conditions carried the soybean dust over the city [1–3].

In 1987, measures were taken to avoid emission of large amounts of soybean dust into the atmosphere during unloading. These measures, based on emission channeling and the use of bag filters for unloading, drastically reduced the spread of dust into the atmosphere and, for many years, prevented new outbreaks [4]. In 1994 and 1996, however, new asthma outbreaks were recorded, even though no changes had been made in port or industrial facilities. Furthermore, evidence of occasional increases in environmental allergen levels, documented persistence of soybean sensitivity in affected patients and sporadic admissions of sensitised patients with acute asthma supported the hypothesis that significant leakage of soybean dust into the atmosphere still occurred during unloading [5, 6].

Consequently, in 1998, new environmental measures were adopted based on the recommendations of the Catalan health authorities. These involved fitting the silos with greater particle-retention capacity bag filters in order to avoid the release of soybean dust into the atmosphere and daily soybean monitoring in a district close to the harbour using a large-volume automated air sample, as a means of determining exposure risk in the asthmatic population.

Soybean is loaded and unloaded in many harbours around the world, and epidemic asthma has also been documented in the ports of Saint-Nazaire (France) [7], New Orleans (USA) [8], Naples (Italy) [9] and other cities in Spain [10–12], but there are no published studies on the use of daily soybean allergen monitoring as a means of prevention in these or other cities. As a result of this daily monitoring in Barcelona, an ample registry of aeroallergen concentration data has been compiled for the first time and has formed the basis of an environmental model that may serve as a reference for atmospheric studies elsewhere. Taking into account these considerations, the aims of the present study were: (1) to analyse the effect of the latest protective measures on the atmospheric soybean aeroallergen concentration and (2) to study the consequences of current concentrations of soy aeroallergens on

the number of asthma admissions in the city's hospitals. The results of this study could encourage other cities to control their atmospheric levels of soybean allergen and, if these levels are elevated, to initiate preventive measures to avoid exposure of the soybean-sensitised population to allergen levels that might provoke asthma symptoms and even induce severe asthma attacks.

Material and Methods

Intervention Measures

The protective measures adopted in the port of Barcelona consisted of the installation of micropore size bag filters (polyester with inox fibres, BHA Purifilter, SL) in the silos for the unloading process and sleeve rupture detectors on all filters, in order to minimise channelled emissions.

Air Sampling

As described in previous studies [13], a large-volume automated air sampler (CAV-A/HF, MCV, SA, Barcelona) containing 1-µm pore size glass microfibre filters (Whatman International Ltd., UK) was installed at 0.5 km from the harbour area. The filter was changed daily. The measurements were obtained on successive days over the study period, and there was one measurement per day. A 55 m³/h air volume was used for dust collection, and the sampler was active 24 h a day. Over a period of 5 years and 2 months, 1,854 samples were analysed, including 125 initial samples collected before protective measures were implemented (pre-intervention period, up to March 1998), and 1,729 samples collected after (postintervention period, April 1998 to December 2002). Soybean unloading data in the harbour were recorded during these periods. Daily average temperature, relative humidity, rainfall, barometric pressure and wind conditions were recorded daily from the Barcelona harbour weather station.

ELISA Inhibition Assay

Soybean aeroallergens were extracted from the filters in 5 ml PBS/0.2% BSA/0.5% Tween 20, overnight at 4 °C, after which the filter was discarded and the eluates were analysed.

Soybean concentration was determined by an amplified ELISA inhibition assay based on a method described previously [14], using a serum pool with specific IgE antibodies of subjects allergic to soybean from the city of Barcelona. In the new batches of the human pool of sera a level of specific IgE to soybean of 19 kU/l (UniCAP 100, Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) was maintained. A low-molecular-mass soybean allergen (soybean-LMM) standard, containing proteins with a molecular weight below 10,000 daltons, was used [15]. The following studies were conducted to assess the properties of the new batches of soybean-LMM: (1) protein concentration measurement (BCA method, Pierce, Rockford, Ill., USA), (2) protein composition (electrophoresis of the extract), (3) specificity of the reference preparation (samples from asthmatic patients with a known concentration of IgE to soybean were assayed by ELISA using the soybean-LMM allergen as antigen) [15].

Asthma Admissions and Home-Attended Acute Asthma Exacerbations

The number of admissions for asthma in the emergency rooms and intensive-care units of the three largest urban hospitals during 68 days (November 2001 to February 2002) of the postintervention period were recorded and compared with results obtained in previous intervention studies. Asthma patients attended at home during the same period by the public home emergency service were also recorded. Judicial autopsies during these days were studied to detect asthma deaths.

Patients who went to the emergency rooms were classified with respect to their asthma symptoms into 4 groups according to the GINA guidelines [16]: mild, moderate, severe and near fatal asthma.

Sensitisation to Soybean Allergens

A subgroup of patients agreed to visit a central office where a blood sample was taken to determine specific IgE to soybean by a previously described ELISA method [17]. Results were expressed as U A_{450 nm}. Values above the mean +2 standard deviations of the results obtained in a control population of 30 healthy individuals previously studied in our laboratory were considered positive. This cut-off was established at 0.330 U A_{450 nm}.

Contact with the patients was made as soon as possible after their admission (no more than 1 month after) with the aim of reliably collecting clinical data and obtaining the blood sample without implicating the time factor.

Statistical Analysis

Mean and standard deviation were used as descriptive measures to describe the aeroallergen series in the pre- and postintervention periods as well as unloading in the postintervention series.

The soybean aeroallergen level is a time-ordered sequence of observations. This characteristic determines that its values are not independent, i.e. they are autocorrelated. Many traditional statistical techniques may not be adequate for the analysis in this context. Hence, a time series model according to Box-Jenkins methodology was proposed to explain the evolution of aeroallergen levels [18]. With this approach the time series is assumed to be a linear model known as an autoregressive integrated moving average (ARIMA) [19–21]. This statistical method is considered to be more suitable than treating the time series with techniques in which independence of the observations is assumed [22–24]. The model can incorporate the statistical effects of variables such as protective measures or unloading. The analysis and interpretation of changes in the model structure due to the protective measures or unloading is similar to the use of dummy variables in regression analyses. The variable that accounted for the effect of the protective measures (Ft) had a value of zero prior to their implementation (in March 1998) and a value of 1 after the measures had been adopted. In the case of unloading, we defined the indicator variable (Ut) as having a value of 1 on unloading days and a value of zero for no unloading. The effect of unloading was assessed only in the postintervention period due to the low number of no-unloading days in the pre-intervention period. The correlation coefficients between weather recordings, as well as asthma events, and the concentration of the allergen were computed over a range of time lags. The SPSS 8.0 computer program for Windows was used for the analysis.

Table 1. Soybean aeroallergen levels (U/m³) in the 1,854 days studied

	Pre-intervention period (n = 125 days)	Postintervention period (n = 1,729 days)
Mean ± SD	159 ± 114*	39 ± 48*
Median	134	23
Range	10–561	10–636
Number of unloading days	121 (97%)	1,137 (66%)
Mean ± SD on unloading days	162 ± 119*	42 ± 50*
Mean ± SD on no-unloading days	–	33 ± 44**
Level >165 U/m ³	42 (34%)*	40 (3%)*

* p < 0.0001, ** p < 0.001, mean differences between unloading and no-unloading days in the postintervention period; level: number of days with levels higher than 165 U/m³.

Results

Soybean Aeroallergen Levels

The daily levels of soybean aeroallergen obtained in the 5 years and 2 months studied (n = 1,854, daily record) are shown in table 1. The mean soybean aeroallergen levels in the pre-intervention period were significantly higher (159 U/m³) than in the postintervention period (39 U/m³; p < 0.0001). Moreover, the pre-intervention period showed a more unstable pattern of aeroallergen concentration values than the postintervention period (fig. 1). With regard to unloading days exclusively, significant differences were also found in mean soybean aeroallergen levels between the pre-intervention (162 U/m³) and postintervention (42 U/m³) periods (p < 0.0001). In the postintervention period, significant differences were also found between unloading and no-unloading days (mean ± SD = 42 ± 50 and 33 ± 44 U/m³, respectively; p < 0.0001). In the pre-intervention period, only 4 days without unloading were observed. Using 165 U/m³ as the cut-off (highest value recorded in 22 unloading days in a previous study during which no asthma episodes were observed) [4], we found a significant decrease in the number of peaks (over the cut-off value) in the postintervention period (3% of the total daily levels) as compared with the number in the pre-intervention period (34%; p < 0.0001; table 1).

According to time series analysis, the best model proposed for the series was an integrated mixed model, whose notation was ARIMA (1, 1, 1). Indicators of the protective measures adopted according to the ARIMA (1, 1, 1)

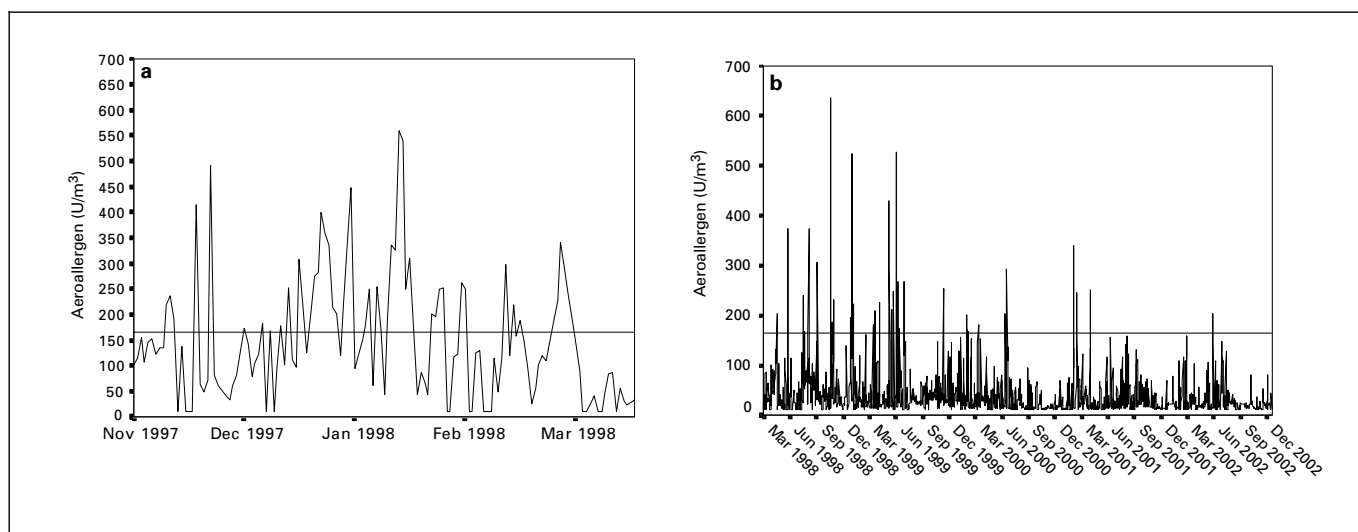


Fig. 1. Values of soybean aeroallergen concentrations obtained in the period studied. **a** Pre-intervention series (daily data from November 1997 to March 1998). **b** Postintervention series (daily data from April 1998 to December 2002). The baseline level is 165 U/m³.

Table 2. Effect of the protective measures adopted on the complete series and effect of the unloading on the postintervention period

	Effect on soybean level	Standard error	p
Complete series			
ARIMA components (1, 1, 1)			
Protective measures (F_t)	-1.25 ¹	0.22	<0.0001
Postintervention period			
ARIMA components (1, 0, 1) (1, 0, 0)			
Unloading (U_t)	-0.20 ²	0.04	<0.0001

ARIMA (1, 1, 1): integrated and first-order autoregressive and moving average component; ARIMA (1, 0, 1) (1, 0, 0): first-order autoregressive and moving average component and first-order seasonal autoregressive component; protective measures: variable that accounts for the effect of the greater capacity retention bag filter; unloading: variable that accounts for the effect of unloading.

¹ Decrease in 1.25 U/m³ in logarithmic scale.

² Increase in 0.20 U/m³ in logarithmic scale.

model are summarised in table 2. The model showed that the protective measures are effective, as evidenced by the decreased mean soybean aeroallergen level in the postintervention series.

The complete series presented no type of periodicity or cyclic variations. However, assessment of the changes in the series before and after adoption of the protective measures disclosed different behaviour. The postintervention series showed a seasonal first-order autoregressive com-

ponent, whose notation was ARIMA (1, 0, 1) (1, 0, 0). This seasonal component showed a 7- to 8-day periodicity, which may be interpreted as weekly behaviour. Moreover, the unloading variable proved significant as shown by an increasing effect on the mean level of soybean aeroallergen concentration in the series (table 2). No significant differences were observed in soybean aeroallergen concentration according to the meteorological variables recorded.

Asthma Admissions and Home-Attended Acute Asthma Exacerbations

A total of 279 cases of asthma were attended in the emergency services of the three hospitals during the 68 days studied, giving a mean of 4.1 patients per day. In the group that agreed to visit a central office in order to take a blood sample ($n = 106$), the distribution of the 4 groups with respect to their asthma symptoms were: mild (36%), moderate (40%), severe (21%) and near fatal asthma (3%). In the group that did not visit this central office, the percentage was: mild (45%), moderate (39%), severe (14%) and near fatal asthma (2%). No significant differences were observed between the 2 groups of patients with respect to their asthma symptoms.

Additionally, the public home emergency service attended 116 patients during this time, giving a mean of 1.7 patients per day. Two non-sensitised asthma patients had to be attended in the intensive-care units of one of the hospitals studied, and no asthma deaths were recorded in the hospitals or judicial autopsy registries during the days studied. No significant relationship was found between concentrations of environmental soybean aeroallergens and the number of emergency room admissions for asthma and the number of home emergency services attended.

Sensitisation to Soybean Allergens

After discharge from the emergency service, 106 patients agreed to participate in a determination of soybean-specific IgE. The mean of values in this group was 0.204 (range 0.034–0.719) U $A_{450\text{ nm}}$. Among the patients analysed, 9 presented positive IgE values above the previously established cut-off value (8%).

Discussion

The present study demonstrates that the latest protective measures adopted for the unloading of soybean in the harbour have been effective in decreasing the mean environmental soybean aeroallergen concentrations in our area.

Soybean is an important source of proteins used in the food industry for humans and for enriching animal feed. World-wide soybean production is around 120 million tons per year. Leading producers are the USA, Brazil and Argentina, and from these countries soybeans are shipped to, and unloaded in, many harbours around the world. As in other harbours, two milling plants located in the Barcelona facilities produce close to 80% of the soybean con-

sumed in the area. Owing to successive asthma epidemics caused by soybean in the city of Barcelona since the 1980s resulting from the unloading of this legume in the port, soybean aeroallergen emission levels within the city have been evaluated in several studies [4, 13, 14, 25]. In the 1980s, high aeroallergen values ranging from 1,600 to 10,600 U/m³ were recorded on epidemic days. These levels contrast with the low values observed on non-epidemic days (0.3–320 U/m³) [13]. In response to these findings, measures directed towards reducing the emission of soy dust were adopted in 1987, and a subsequent study demonstrated their efficacy in drastically reducing the levels of soy dust in the environment and in avoiding a large number of admissions for asthma in the emergency services [4]. Nevertheless, a new asthma outbreak was detected in 1994, in which environmental soybean aeroallergen levels reached 1,122 U/m³ [6], contrasting with 165 U/m³ recorded in the last study on days with no asthma episodes [4]. As a consequence of that latest outbreak, soybean aeroallergen levels were measured daily in our laboratory and high levels were still observed on certain days. Thus, to assure that asthmatic sensitised patients were not exposed to elevated levels of aeroallergen, new protective measures were recommended by the health authorities in 1998. These consisted of bag filters with greater retention capacity installed in the harbour facilities for the unloading process.

The latest protective measures adopted for the unloading of soybean demonstrated a decrease in mean environmental soybean aeroallergen concentrations on unloading days to a level of 42 U/m³, which contrasts with the 162 U/m³ obtained in the pre-intervention period (table 1). The protective measures adopted have led to a significant decrease in the number of values above the established cut-off (3 vs. 34% in the pre-intervention period). Additionally, the mean number of asthmatic patients admitted per day in the present study, 4.1 patients/day [4], is similar to the number obtained during non-epidemic days in pre-intervention studies (6 patients/day) [1], taking into account that in the present study only 3 of the 4 hospitals checked in previous studies were considered. The hospital which is not included in this study receives a reduced number of casualty admissions daily, therefore it is unlikely that the possible admissions to this centre would increase the overall number of daily admissions to more than 6. Moreover, only 2 of the patients had to be attended in intensive-care units, in contrast to the situation before these measures were adopted [4]. A case-control study performed during the pre-intervention period [3] showed that soybean-specific IgE in asthmatic patients who at-

tended in the emergency rooms on non-epidemic days was present in 6%, a value similar to the 8% found in the population studied in the present work. On the basis of the results, recommendations for maintaining environmental control on the concentration of this allergen by detecting levels exceeding certain amounts can be established, and this will facilitate prevention policies by the public health authorities of Barcelona and other cities.

The ultimate goal in Barcelona is not only to eliminate severe asthma attacks due to soybean inhalation, but also to eliminate asthma symptoms and bronchial inflammation from this cause. Unfortunately, establishment of an exposure limit is difficult since an adequately standardised assay for quantifying exposure and consequent symptoms is not yet available [26–29]. The lower limit of 165 U/m³, obtained on 22 unloading non-epidemic days in a previous work has been assumed provisionally as the desirable limit under which soybean allergen should be maintained [4]. Nevertheless, this threshold may have to be changed in the future in view of the results of the bronchial provocation test studies currently under way in our laboratory and the data from other clinical studies. Though differences between unloading and no unloading days in the postintervention period were found in the present study, these were not clinically significant, as evidenced by the fact that there were no increases in asthma hospital admissions or home emergencies. Nevertheless, we do not know whether this level might produce some degree of bronchial mucosa inflammation that would not require a visit to the emergency room.

In any case, the most important consequence of these new adopted measures is the reduction in the average aeroallergen concentration in the postintervention period and in the number of peaks during this period. Moreover, despite the fact that there are differences in the postintervention period in the unloading and non-unloading days (table 1), the level of soybean aeroallergen concentration is lower than in the pre-intervention period, so this are important reasons to recommend these measures to other cities where soybean is unloaded.

Taking advantage of the large number of atmospheric determinations performed, we used time series analysis with application of the ARIMA model to evaluate the results. This is the most suitable statistical test in intervention studies that evaluate the impact of a specific action [30]. The ARIMA model showed that the latest protective measures significantly decreased the mean atmospheric soybean level of the postintervention series, which corroborates the protective effect of the measures taken. The reasons for the weekly cyclic variation in the

postintervention series are likely to be complex and probably include an interplay of related factors such as air pollution, soybean unloading processes and meteorological variables. With respect to these meteorological variables, no relationship with concentration of the allergen was found in the present study, probably because these variables correspond to the mean of a 24-hour period. Future investigations should be aimed at carrying out measurements during shorter sampling periods of both soybean aeroallergen concentrations and meteorological conditions to be able to detect possible specific increases in concentrations of the allergen and their possible relationship with certain atmospheric conditions, and thus be able to construct a predictive model of the concentration of the allergen.

In conclusion, this is the first study that has used time series analysis to describe the changes in soybean environmental concentrations, in this case recorded in the city of Barcelona over a period of 5 years and 2 months. The results show the importance of adopting stricter protective measures during soybean unloading for decreasing the atmospheric levels of soybean allergen and asthma admissions in emergency room services. This policy can be recommended in all the cities where soybean is loaded or unloaded in order to prevent soybean-related bronchial mucosa inflammation and attacks of severe acute asthma in patients sensitised to this antigen.

Acknowledgements

We thank Merce Aceves (Entitat Metropolitana, Servei Medi Ambient) for her technical collaboration in the air sampling, Jordi Vila and Dolors Carrascal (Servei Medi Ambient, Port de Barcelona) for their valuable support, Maria Dolores Untoria (member of the Nursing Staff) for her help in the laboratory analysis, Oswaldo López (IN.NOVA Oceanografía Litoral) for his helpful recommendations in the statistical analysis and Celine Cavallo for English language advice. This study was financed in part by grant FISS 01/1386 and Red Respira (Instituto Carlos III. Fis RTYC-CO3/11) – SEPAR.

References

- 1 Antó JM, Sunyer J, Rodriguez-Roisin, et al: Asthma epidemics associated with soybean dust relevant during harbour activities. *N Engl J Med* 1989;320:1097-1102.
- 2 Rodrigo MJ, Morell F, Helm RM, et al: Identification and partial characterization of the soybean-dust allergens involved in the Barcelona asthma epidemic. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:778-784.
- 3 Sunyer J, Antó JM, Rodrigo MJ, et al: Case-control study of serum immunoglobulin-E antibodies reactive with soybean in epidemic asthma. *Lancet* 1989;1:179-182.
- 4 Antó JM, Sunyer J, Reed CE, et al: Preventing asthma epidemics due to soybean by dust-control measures. *N Engl J Med* 1993;329:1760-1763.
- 5 Manzanera R, Armengol R, Villalbí JR, et al: Public Health and Soybean-Related Asthma in Barcelona. Barcelona, Ajuntament de Barcelona, 1999.
- 6 Soriano JB, Antó JM, Plasència A, et al: Repeaters count: A sentinel method for asthma outbreaks. *Thorax* 1995;50:1101-1103.
- 7 Albert R: A propos de douze cas de sensibilisation au groupe des légumineuses comestibles. *Rev Fr Allergol* 1973;13:399-410.
- 8 White MC, Etzel RA, Olson DR, et al: Re-examination of epidemic asthma in New Orleans, Louisiana, in relation to the presence of soy at the harbour. *Am J Epidemiol* 1997;145:1-7.
- 9 Cocco G, Schiano M, Sacerdoti G: Functional characteristics in soybean asthma (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:469.
- 10 Navarro C, Marquez M, Hernando L, et al: Epidemic asthma in Cartagena, Spain, and its association with soybean sensitivity. *Epidemiology* 1993;4:76-79.
- 11 Garcia-Ortega P, Rovira E, Mora E: Epidemias de asma alérgica a semilla de soja en ciudades pequeñas. *Med Clin (Barc)* 1997;108:677.
- 12 Ballester F, Soriano JB, Otero I, et al: Asthma visits to emergency rooms and soybean unloading in the harbours of Valencia and A Coruña, Spain. *Am J Epidemiol* 1999;149:315-322.
- 13 Aceves M, Grimalt JO, Sunyer J, et al: Identification of soybean dust as an epidemic asthma agent in urban areas by molecular marker and RAST analysis of aerosols. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88:124-134.
- 14 Cruz MJ, Rodrigo MJ, Antó JM, et al: An amplified ELISA inhibition method for the measurement of airborne soybean allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;122:42-48.
- 15 Swanson MC, Li J, Wentz-Murtha PE, Trudeau WL, et al: Source of the aeroallergen of soybean dust: A low molecular mass from the soybean tela. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:783-788.
- 16 Global Initiative for Asthma: Global Strategy for Asthma Management and Prevention NHLBI/WHO Workshop Report. NIH Publ No 96-3659B. Bethesda, Md., National Institute of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, 1998.
- 17 Morell F, Codina R, Rodrigo MJ, et al: Diagnosis of soybean-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1995;96:320-324.
- 18 Box GE, Jenkins GM: Time Series Analysis: Forecasting and Control. San Francisco, Holden-Day, 1976.
- 19 Diggle P: Time Series: A Biostatistical Introduction. New York, Oxford Science Publications, Oxford University Press, 1992.
- 20 Chatfield C: The Analysis of Time Series: An Introduction, ed 5. London, Chapman & Hall, 1996.
- 21 Murillo C: Métodos estadísticos de series temporales. Aplicaciones sanitarias. Barcelona, SG Editores SA, 1994.
- 22 Schnell D, Zaidi A, Reynolds G: A time series analysis of gonorrhea surveillance data. *Stat Med* 1989;8:343-352.
- 23 Helfenstein U, Ackermann-Liebrich U, Braun-Fahrlander C, et al: The environmental accident at 'Schweizerhalle' and respiratory diseases in children: A time series analysis. *Stat Med* 1991;10:1481-1492.
- 24 Fernandez-Perez C, Tejada J, Carrasco M: Multivariate time series analysis in nosocomial infection surveillance system: A case study. *Int J Epidemiol* 1998;27:282-288.
- 25 Antó JM, Soriano JB, Sunyer J, et al: Soybean sensitization in epidemic asthma patients 8 years after an intervention. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:A515.
- 26 Platts-Mills TAE, de Weck AL (chairmen): Dust mite allergens and asthma: A worldwide problem. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:416-427.
- 27 Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC, et al: Dust mite allergens and asthma: Report of a 2nd international workshop. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1046-1060.
- 28 Hollander A, Gordon S, Renström A, et al: Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels. I. Analysis of air samples. *Allergy* 1999;54:142-149.
- 29 Renström A, Gordon S, Hollander A, et al: Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels. II. Factors influencing antigen detection. *Allergy* 1999;54:150-157.
- 30 Antó JM, Murillo C: Aplicaciones sanitarias del análisis de series temporales (editorial). *Gac Sanit* 1991;22:3-4.

DISCUSIÓN

1.- MÉTODOS DE ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN AMBIENTAL DE AEROALERGENOS:

Como ya se ha comentado en la introducción, los estudios epidemiológicos e inmunológicos realizados a consecuencia de las epidemias de asma de la ciudad de Barcelona atribuyeron la causa de las mismas a la descarga de soja en el puerto de la ciudad^{2,6,19}. La intervención ambiental que se realizó en Diciembre de 1987⁶ y que consistió en la instalación de sistemas de filtración de las emisiones en los silos para la descarga, fue efectiva al producir un descenso en los niveles ambientales de soja y la desaparición de las epidemias, así como del número de días en los cuales había un número de ingresos inusual en los Servicios de Urgencias de los hospitales de la ciudad⁶. Los niveles de 1.500 U/m³ detectados durante un determinado día epidémico eran sustancialmente mayores que el mayor valor (165 U/m³) registrado en 22 días de descarga en un estudio post-intervención^{6,33}. Estos datos corroboraron los estudios previamente realizados y pusieron de relevancia la importancia de medir la concentración ambiental del alergeno de soja para controlar la eficiencia de las medidas ambientales adoptadas en la ciudad y para prevenir nuevas epidemias de asma.

En este sentido, la cuantificación de alergenitos ambientales tiene diversas aplicaciones como son: a) monitorizar los niveles de determinados alergenitos en el lugar de trabajo o en el medio ambiente; b) confirmar la exposición a un determinado alergeno como causa de patología; c) prevenir nuevas epidemias, como en el caso de las epidemias de asma por soja de Barcelona y/o d) establecer los niveles de riesgo a un determinado alergeno³⁶.

Para medir la concentración ambiental de los aeroalergenos se utilizan diversas técnicas. La cuantificación de algunos pólenes en el aire, que presentan una morfología característica, puede realizarse mediante técnicas de microscopía utilizando criterios morfológicos. Estas técnicas, junto con las de cultivo, son las utilizadas también para la cuantificación ambiental de microorganismos; son métodos muy sensibles y tienen la ventaja de que también permiten clasificaciones taxonómicas³⁶. Sin embargo, en la mayoría de los casos las muestras de aire están compuestas por mezclas complejas que contienen, entre otras sustancias, proteínas alergénicas amorfas que no pueden ser identificadas visualmente, como ocurre con los alergenos de la semilla de soja. En este caso se debe recurrir a inmunoensayos específicos (técnicas de RIA o ELISA) que pueden ser de captura (también llamados métodos en *sandwich*), o competitivos (ELISA-inhibición y RAST-inhibición).

En 1981 Agarwall y cols.³⁷ estimaron por primera vez la concentración de algunos aeroalergenos amorfos como *Alternaria* spp, mediante una técnica de RAST-inhibición. Esta y otras técnicas inmunoquímicas para la medida de aeroalergenos fueron descritas y revisadas por Platts-Mills y cols. en 1989³⁸ lo que significó un avance en este campo. Actualmente, se valoran muchos aeroalergenos mediante estos métodos como: ácaros del polvo³⁹⁻⁴⁰ (*Dermatophagoides pteronyssinus*), gato (*Felis domesticus*)^{39,41}, animales de laboratorio⁴²⁻⁴³, enzimas como la α -amilasa⁴⁴⁻⁴⁵ y látex⁴⁶⁻⁴⁷. Entre los más recientemente descritos se encuentran inmunoensayos como el desarrollado para valorar la concentración ambiental de fitasa, enzima utilizado como aditivo en los piensos animales⁴⁸.

Los inmunoensayos de captura tienen una reproducibilidad aceptable y una sensibilidad entre 2 y 20 veces mayor que los inmunoensayos competitivos, pudiendo detectar concentraciones de proteínas entre 100 pg/ml y 1 ng/ml, y por lo tanto, pueden ser utilizados para detectar los niveles ambientales relativos de la mayoría de

los aeroalergenos proteicos, que en muchos casos se encuentran en una baja concentración, sobre todo cuando se trata de medir alergenios en la atmósfera. Estos métodos se basan en la unión de la proteína alergénica a un anticuerpo detector adherido a un soporte sólido, esta proteína es posteriormente reconocida por un segundo anticuerpo marcado. Dicho marcaje se puede realizar mediante un isótopo radioactivo, un enzima o un fluorógeno⁴⁹, aunque estos dos últimos han sustituido a los isótopos radioactivos en muchos laboratorios puesto que tienen una sensibilidad similar y no presentan los problemas asociados a la utilización de materiales radioactivos⁵⁰. Estos ensayos de captura requieren de dos anticuerpos monoclonales específicos que reconozcan dos epítomos diferentes del alergenio, o bien de anticuerpos policlonales purificados. Los ensayos que utilizan anticuerpos monoclonales tienen importantes ventajas: elevada especificidad, reproducibilidad y se pueden obtener ilimitadamente si se mantiene la línea celular productora⁵¹. Sin embargo, presentan desventajas cuando se trata de valorar muestras complejas, como es el caso de las muestras ambientales, porque al estar diseñados para detectar exclusivamente un componente de la mezcla, no reconocen todos los alergenios presentes⁵². Esto puede repercutir en una infra-valoración de la muestra y en una baja sensibilidad. Los inmunoensayos de captura que utilizan anticuerpos policlonales tienen la ventaja de que estos anticuerpos pueden ser preparados a partir de diversas especies animales y son más fáciles de obtener. Además, son particularmente útiles para el análisis de formas desnaturalizadas de la proteína puesto que reconocen diferentes epítomos⁵¹.

Cuando no se dispone de anticuerpos monoclonales y/o policlonales purificados, como ocurre en el caso de los alergenios de la soja, los ensayos recomendados para cuantificar alergenios ambientales son los ensayos de competición o de inhibición. La etapa básica en estos ensayos consiste en la comparación de la unión de inmunoglobulinas específicas al material soluble extraído de los filtros que

contienen las muestras de aire y a una fuente de alérgeno de referencia inmovilizada en la superficie de los pocillos de una placa de microtitulación y utilizada a su vez como estándar de referencia. Los alérgenos contenidos en la muestra reaccionan con los anticuerpos específicos contra el alérgeno testado (fase líquida). El exceso de anticuerpos reacciona con los alérgenos covalentemente acoplados a la placa de microtitulación (fase sólida) (Figura 4); por lo tanto, en este caso la concentración del alérgeno contenida en la muestra es inversamente proporcional a la señal obtenida.

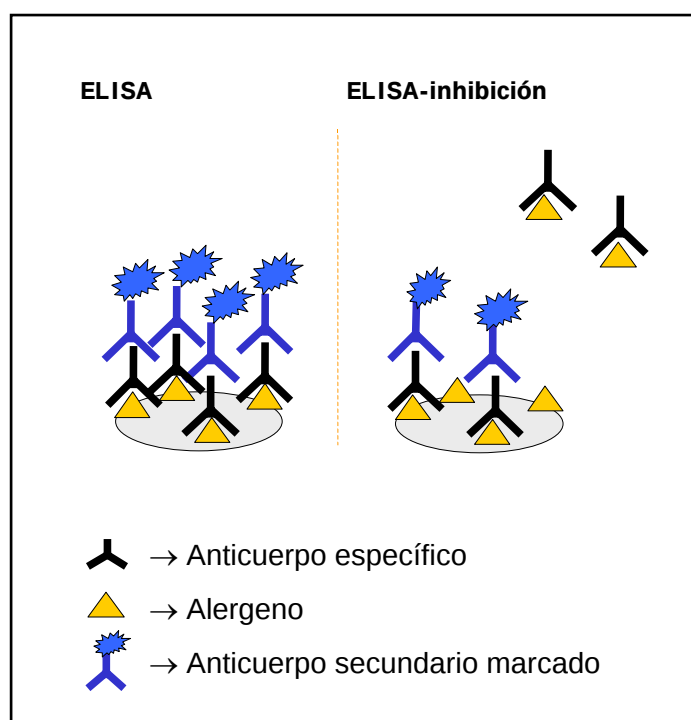


Figura 4: Diferencias entre la etapa básica de un método de ELISA directo y un método de ELISA-inhibición.

Un inconveniente de los métodos de inhibición es que son considerados semicuantitativos, con problemas potenciales de reproducibilidad a largo término ocasionados por el uso de mezclas heterogéneas de anticuerpos⁵³ (ej: anticuerpos humanos). Esto dificulta la comparación de medidas absolutas entre diferentes estudios, siendo necesario establecer la eficacia de la técnica para cada alérgeno⁵⁴.

Los antisueros utilizados en estos métodos compuestos por anticuerpos IgG de origen animal presentan ventajas frente a los compuestos por IgE humana ya que se utilizan diluidos entre 10 y 1000 veces. Sin embargo, la utilización de anticuerpos IgE humanos asegura que se está midiendo la sustancia causal de la enfermedad, es decir los alérgenos con relevancia clínica, sobre todo cuando se desconoce la identidad de las moléculas alérgicas o se trabaja con polvos que contienen mezclas complejas de alérgenos³⁶. Las fuentes de anticuerpos procedentes de animales, requieren una validación más exhaustiva ya que provienen de inmunizaciones experimentales, y por lo tanto es necesario comprobar que los anticuerpos producidos presentan esta relevancia clínica⁵⁵.

Los métodos de inhibición más comunes son el RAST y ELISA-inhibición^{53,56-58}. Las curvas de inhibición obtenidas en estos ensayos son considerablemente más pronunciadas que las de los inmunoensayos de captura, es decir pequeñas diferencias en el porcentaje de inhibición representan una gran diferencia en los niveles de alérgeno lo que las hace más sensibles a pequeñas variaciones de la concentración de alérgeno. Además, otra de las limitaciones de este tipo de ensayos es que, en la mayoría de los casos, no existen estándares de referencia internacionales.

Cuando se planteó la necesidad de realizar diariamente las determinaciones de los niveles de aeroalérgeno de soja en la ciudad de Barcelona, se tomó la decisión de estandarizar en el *Hospital Vall d'Hebron* un ELISA-inhibición con unas características similares a las del RAST-inhibición utilizado en la *Mayo Clinic*, con el objetivo de que los resultados fueran comparables con los obtenidos en este último centro en los estudios ambientales realizados previamente. Debido a la variabilidad de este tipo de métodos, anteriormente comentada, se utilizó la misma fuente de anticuerpos IgE específicos como antisuero y el mismo estándar de referencia (*soybean-LMM*) que los utilizados en la *Mayo Clinic*. El estándar está compuesto por proteínas con PMs

inferiores a 10 kDa, ya que estas proteínas de bajo PM son las responsables de las epidemias de asma en la ciudad (Figura 1, primer trabajo).

Para la estandarización del método desarrollado en el *Hospital Vall d'Hebron* se realizaron los siguientes experimentos: 1) Estudio de variabilidad intra-ensayo; para lo cual se analizaron 84 muestras ambientales observándose que el 78% de estas presentaban un CV entre duplicados inferior al 20% (Figura 2, primer trabajo). Según estos resultados se estableció un criterio específico que se basaba en aceptar como válidos únicamente los resultados que presentaban un CV (%) de duplicados inferior al 20%. Teniendo en cuenta que se trata de métodos semicuantitativos, este es un criterio aceptado, y es similar al adoptado por Gordon y cols.⁵⁸ en un trabajo en el que aceptaban hasta un 30% de variación entre duplicados, en un estudio de cuantificación de aeroalergeno de orina de rata. 2) Estudio de reproducibilidad del método; para ello se analizaron las líneas de regresión derivadas de las curvas de referencia obtenidas en 4 ensayos consecutivos (Figura 3, primer trabajo), demostrándose que no había diferencias significativas entre las pendientes de estas curvas. El CV entre ensayos varió entre un 4-22% (para el rango de valores utilizado en el estándar), valores aceptables por tratarse de un método competitivo³⁷⁻³⁹. Todos estos datos indicaban que se trataba de un inmunoensayo adecuado para medir la concentración ambiental de aeroalergeno de soja.

2.- COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE RAST-INHIBICIÓN Y ELISA-INHIBICIÓN.

Puesto que no existe un método de referencia para medir la concentración ambiental de aeroalergeno de soja y con el objetivo de conocer si los resultados eran transferibles entre laboratorios, se analizaron en paralelo 338 muestras mediante los métodos de ELISA-inhibición (Hospital Vall d'Hebron) y RAST-inhibición (*Mayo Clinic*), comparándose los resultados obtenidos. Se observó que los resultados determinados con ambos métodos presentaban valores relativos similares (media: 50 y 54 U/m³, para el ELISA-inhibición y RAST-inhibición, respectivamente), aunque había diferencias entre las concentraciones individuales.

La medida de alérgenos ambientales comprende diferentes etapas que pueden aportar variabilidad a los resultados obtenidos. En primer lugar es necesaria la captura de las partículas presentes en el aire, en filtros colocados en muestreadores ambientales. La segunda etapa, consiste en la extracción de los alérgenos solubles del filtro con soluciones acuosas tamponadas³⁶. Estas etapas son críticas y aportan variabilidad a los resultados cuando se trata de comparar ensayos ambientales realizados en diferentes laboratorios. Sin embargo, en el presente estudio los métodos de muestreo y elución fueron los mismos para ambos centros, por lo que las diferencias obtenidas en los resultados únicamente pueden ser debidas al tipo de inmunoensayo utilizado. Estudios que comparan la medida de la concentración ambiental de aeroalérgenos observan que muestras idénticas pueden proporcionar resultados diferentes dependiendo del ensayo utilizado para la medida^{52,53,55}. En el presente estudio, las diferencias obtenidas en las concentraciones individuales podrían deberse en parte al distinto marcaje de los anticuerpos secundarios utilizados en

ambos ensayos o al hecho de que los anticuerpos humanos IgE específicos de ambos métodos provengan de diferentes pacientes asmáticos epidémicos. En este sentido, Swanson et al⁵⁹ en un estudio de medida de la concentración ambiental de alérgenos de ácaros utilizando como anticuerpos detectores anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales de conejo y suero humano observaron que los valores obtenidos presentaban niveles 20 veces superiores cuando se utilizaba como anticuerpo detector el suero humano. Esta variabilidad puede ser debida a la heterogeneidad del suero humano.

Para los estudios de comparación se utilizó el método estadístico de Bland y Altman⁶⁰⁻⁶², ya que a pesar de que es habitual utilizar los coeficientes de correlación y las rectas de regresión para comparar dos métodos, esta aproximación no proporciona información acerca de la concordancia entre los métodos. El método propuesto por Bland y Altman consiste en representar gráficamente las diferencias entre dos mediciones frente a su media; este método proporciona además unos límites de concordancia a partir del cálculo del intervalo de confianza para la diferencia de dos mediciones. En este caso los límites de concordancia de los métodos se encontraban entre -2.24 y 2.6 para el 95% de los casos (figura 4, primer trabajo).

El coeficiente de correlación intraclase (CCI) se utilizó como índice de concordancia. Como toda proporción, el CCI puede oscilar entre 0 y 1, de modo que la máxima concordancia posible corresponde a un valor de CCI = 1. En este estudio se obtuvo un CCI de 0.456, $p < 0.001$, sin embargo una vez que los resultados fueron divididos y clasificados como mayores y menores de 165 U/m³, el índice *kappa* utilizado para medir la concordancia entre las variables fue de 0.46, $p < 0.001$. Estos datos indican que entre ambos métodos existe una concordancia aceptable, no atribuible al azar, teniendo en cuenta que se trata de métodos semicuantitativos⁶⁰, ya

que un índice *kappa* comprendido entre 0.4 y 0.75 se considera indicador de buena reproducibilidad⁶³.

En definitiva, los resultados obtenidos en el estudio de comparación están en concordancia con los publicados en otros estudios^{37-39,52-53} e indican que el ensayo de ELISA-inhibición amplificado descrito es útil para la medida de la concentración ambiental de aeroalergeno de soja. El significado práctico de los resultados obtenidos en el primer trabajo es que el alergeno puede ser medido con un ensayo de inhibición que presenta una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad aceptables, a pesar de tratarse de un ensayo competitivo. Por ello, y tras el estudio de concordancia entre ambos métodos, finalmente, en Noviembre de 1997, se decidió realizar la medida diaria de la concentración ambiental de alergeno de soja de la ciudad de Barcelona en el *Hospital Vall d'Hebron*.

3.- EFECTIVIDAD DE LAS MEDIDAS IMPLANTADAS EN 1998 PARA LA DESCARGA DE SEMILLA DE SOJA.

3.1- Niveles ambientales obtenidos.

Como ya se ha comentado en la introducción, los nuevos brotes de asma detectados durante los años 1994 y 1996, plantearon la necesidad de realizar controles ambientales diarios de la concentración de alérgeno de soja en la ciudad, para lo cual se estandarizó en el *Hospital Vall d'Hebron* el método de ELISA-inhibición previamente comentado. Esto ha hecho posible disponer de un registro amplio de valores de los cuales, según nuestro conocimiento, no se dispone en otras ciudades, y que ha permitido junto con la medida de determinados datos meteorológicos, un control efectivo de la descarga de soja en la ciudad de Barcelona. Además, las nuevas medidas ambientales adoptadas en 1998, han puesto en evidencia la importancia de estos métodos para monitorizar el impacto de las intervenciones de control utilizadas para la descarga, encaminadas a reducir la concentración de polvo de soja en la atmósfera.

En el segundo trabajo presentado en esta tesis doctoral, se disponía de un registro diario de concentración de aeroalérgeno de soja en la ciudad durante un periodo de 5 años y dos meses. Para estudiar el comportamiento de esta serie temporal de valores se ha utilizado el modelo ARIMA propuesto por Box y Jenkins, ya que esta aplicación es una de las más adecuadas para evaluar el impacto de una acción específica⁶⁴⁻⁶⁷. Una serie temporal es una colección ordenada y periódica en el tiempo de observaciones de una variable. En las series temporales las observaciones no se consideran independientes sino que están correlacionadas. Esta es la razón por

la cual no son adecuados los métodos estadísticos clásicos para el análisis de estos datos ambientales, puesto que estos se basan en la asunción de la independencia de los valores, y en nuestro caso la concentración de soja de un día determinado es dependiente de la concentración del día anterior, puesto que puede haber efectos acumulativos en función de condiciones meteorológicas y de variables como la descarga. En general, el objetivo del análisis de una serie temporal consiste en la descripción de su comportamiento histórico, la predicción de su evolución futura y la corroboración de la existencia de relaciones causales. Además, este modelo puede evaluar el efecto de una intervención específica. Es en este contexto en el que se ha aplicado este método, considerando los niveles de aeroalergeno de soja como una serie temporal con el objetivo de conocer la efectividad de las medidas implantadas para la descarga en las instalaciones del puerto y para describir el comportamiento de esta serie de valores ambientales.

La aproximación realizada para analizar los resultados asume que la serie temporal es un modelo lineal constituido por tres componentes básicos: el “autoregresivo” (p), el “integrado” (d) y el de “media móvil” (q) (ARIMA (p, d q)). El componente autoregresivo describe el comportamiento de las observaciones en un tiempo determinado en relación a las observaciones anteriores, el componente integrado describe la tendencia (si la hay) de la serie y el componente de media móvil describe el comportamiento de los errores en un tiempo determinado en relación a los errores anteriores. Este componente ARIMA puede incorporar ciclos y estacionalidades. La notación de los componentes estacionales se añadiría a la previamente mencionada de la siguiente manera: ARIMA (p, d, q) (P,D,Q). A este modelo se le pueden incorporar los efectos de variables, como las medidas protectoras implantadas para la descarga, como si de variables *dummy* se tratara. De esta manera, una notación simplificada sería la siguiente:

$$A_t = F_t + U_t + W_t$$

A_t : nivel de aeroalergeno

F_t : medidas protectoras (filtros de manga)

$F_t = 0$ antes de la intervención

$F_t = 1$ antes de la intervención

U_t : descarga

$U_t = 0$ días sin descarga

$U_t = 1$ días con descarga

W_t : componente ARIMA

Previamente al análisis de la intervención es necesario encontrar una estructura adecuada para el componente ARIMA. El proceso es iterativo y toma como punto de partida la distribución de los errores que se visualizan en las funciones de autocorrelación (FAC) y autocorrelación parcial (FAS) de la serie original (Figura 5a y 5b). La distribución de errores del modelo final, una vez incorporada la estructura ARIMA y el resto de componentes que se quieran evaluar, ha de ser aleatoria (ruido blanco) (Figura 5c y 5d).

El modelo final propuesto del componente ARIMA de la serie total con el efecto de intervención fue ARIMA (1,1,1) (ver distribución de errores en Figura 5c y 5d). La serie completa no presenta ningún tipo de periodicidad o variaciones cíclicas. Los indicadores de las medidas protectoras adoptadas de acuerdo con este modelo ARIMA (1,1,1) se encuentran resumidos en la tabla 2 del segundo trabajo presentado en esta tesis doctoral. La instalación de nuevos filtros de manga para la descarga con una mayor capacidad de retención de partículas en 1998 producen un descenso significativo de los niveles de aeroalergeno de soja en la ciudad. Adicionalmente, la descripción del nivel medio de 42 U/m³, que contrasta con el nivel de 162 U/m³

obtenido durante el periodo pre-intervención (Tabla 1, segundo trabajo) corrobora el efecto protector de las nuevas medidas adoptadas para la descarga.

Los cambios producidos antes y después de las medidas implantadas para la descarga producen un comportamiento diferente de la serie post-intervención en relación a la serie completa. Así, la serie post-intervención no presenta tendencia y muestra un componente estacional autoregresivo de primer orden, cuya notación es $ARIMA(1\ 0\ 1)(1\ 0\ 0)$. Este componente estacional muestra una periodicidad de 7 a 8 días que podría ser interpretado como una oscilación semanal. La explicación de esta periodicidad cíclica es difícil y probablemente incluye diversos factores como la contaminación ambiental, los procesos de descarga, el mantenimiento de los filtros y variables meteorológicas que son difíciles de controlar. Las figuras 6 a y 6b muestran el patrón de los errores de la serie post-intervención antes de definir la estructura $ARIMA$ y las figuras 6c y 6d el patrón aleatorio de los errores una vez definida la estructura $ARIMA$. En cualquier caso, como ya se ha comentado, los valores alcanzados durante estos procesos de descarga en el periodo post-intervención, son inferiores a los hallados en el periodo pre-intervención. Esto justificaría la implantación de estas medidas de control citadas en otras ciudades donde se descargue o manipule soja.

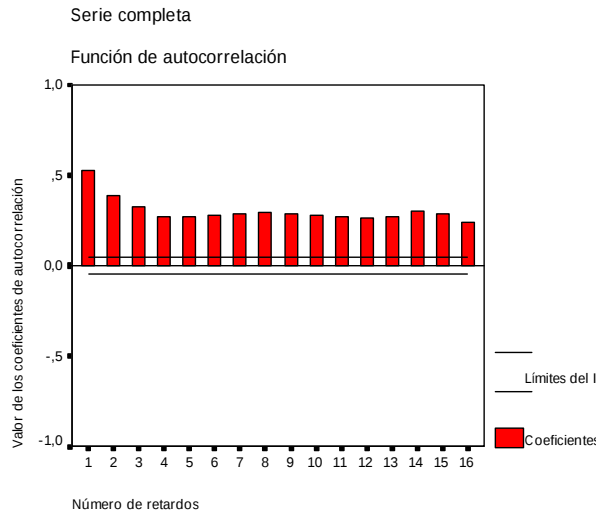


Figura 5a

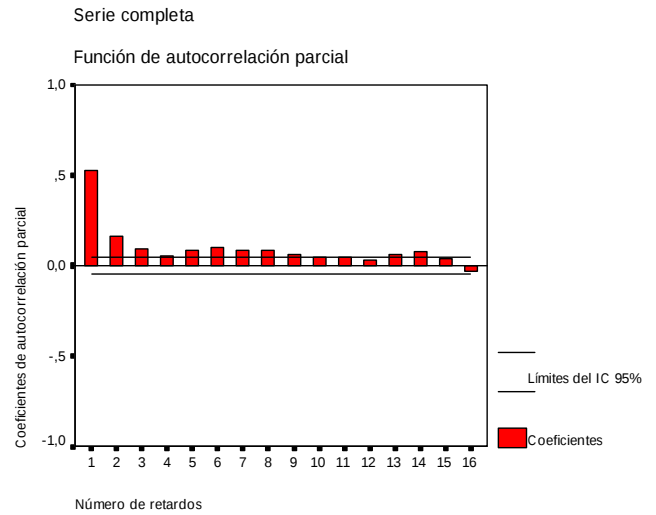


Figura 5b

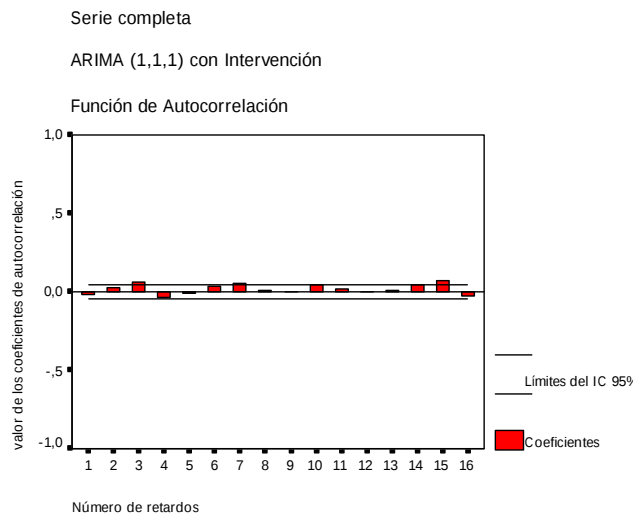


Figura 5c

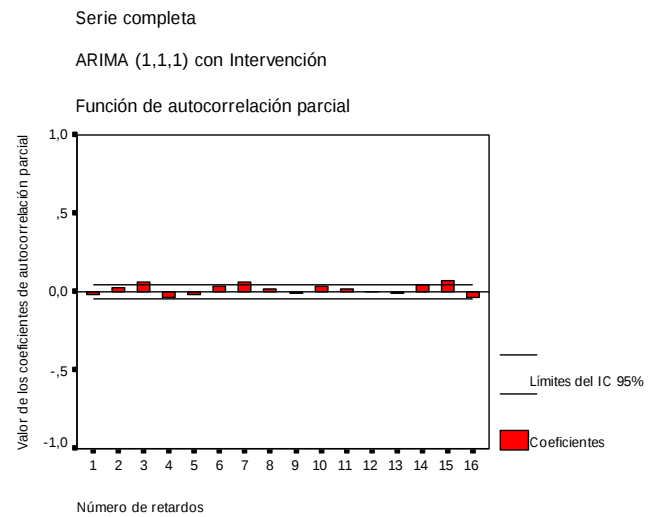


Figura 5d

Figura 5: Modelo final propuesto para la serie completa: Modelo mixto, con componentes autoregresivos y de media móvil de primer orden.

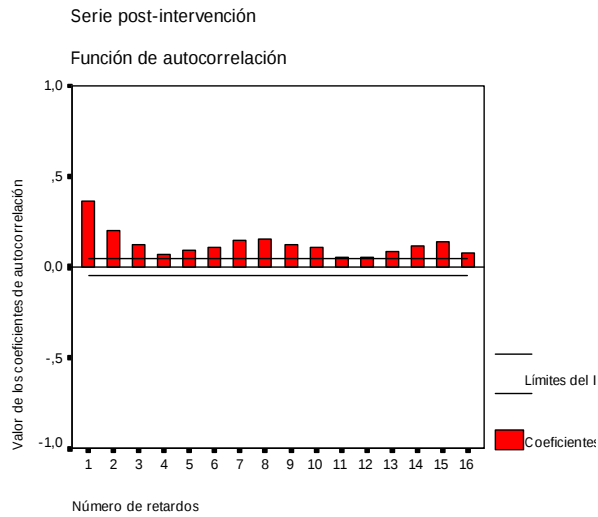


Figura 6a

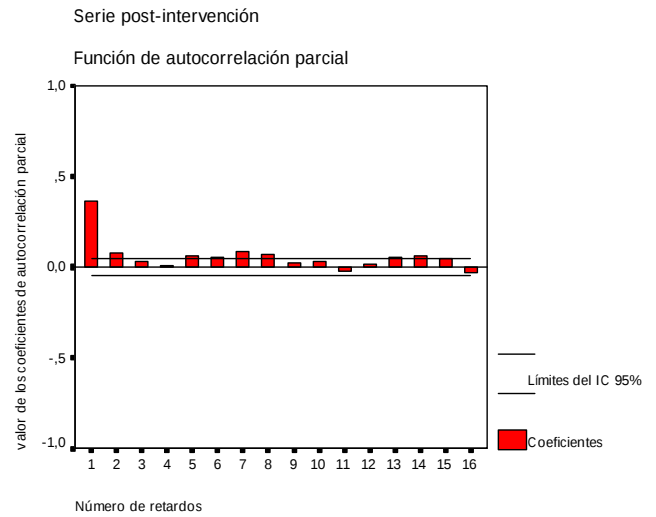


Figura 6b

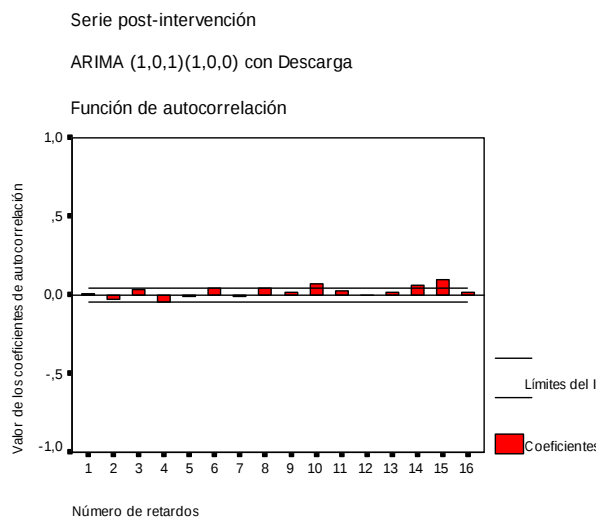


Figura 6c

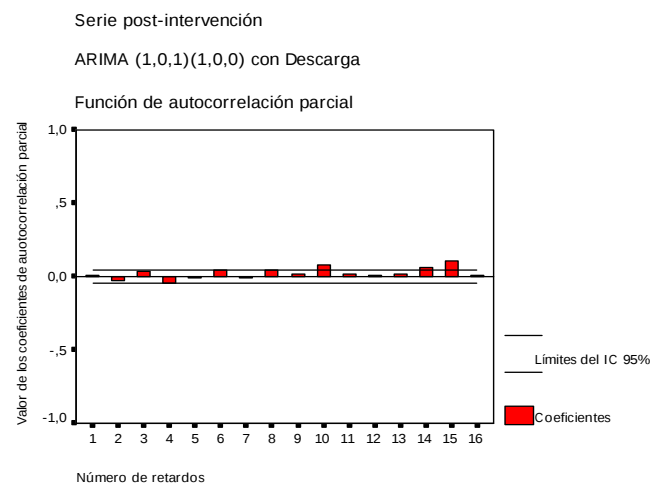


Figura 6d

**Figura 6: Modelo final propuesto para la serie post-intervención.
Modelo sin tendencia y con un componente estacional**

3.2.- Estudio de seguimiento de los pacientes

La disponibilidad de un registro que incluye todos los pacientes asmáticos atendidos en los brotes de asma detectados desde 1981 hasta la actualidad, ha permitido identificar la población de pacientes susceptible de ser afectados durante estos brotes de asma (lo que denominamos asmáticos repetidores) y ha permitido también conocer la cifra de pacientes atendidos en la ciudad de Barcelona durante los días epidémicos y no epidémicos.

Durante este último estudio de intervención se realizó un seguimiento de los pacientes que acudían a los Servicios de Urgencias de los hospitales de la ciudad con el fin de comprobar si las concentraciones de aeroalergeno de soja que existían en la ciudad en ese momento, producían el ingreso de estos pacientes sensibilizados en los Servicios de Urgencias.

En el segundo estudio presentado en esta tesis doctoral se comprobó que el número de pacientes atendidos en los servicios de urgencias de los hospitales de la ciudad se situaba, en el periodo estudiado, en 4 pacientes/día y entre estos pacientes no se encontraba ningún asmático repetidor. Este número es similar al obtenido en un estudio previo realizado en un periodo de días no epidémicos en los que el número de pacientes ingresados fue de 6 pacientes/día², mientras que, como ya se ha comentado, el número de ingresos en un día epidémico era de 44 pacientes/día¹.

En un subgrupo de los pacientes incluidos en este estudio se han analizado también los niveles de anticuerpos IgE específicos a la soja, observándose que estos niveles estaban elevados en un 8% de los casos, valor similar al obtenido en estudios

previos en poblaciones de asmáticos generales en los que este nivel se sitúa, como ya se ha comentado, en un 4.6%¹⁹.

Todos estos datos parecen indicar que los niveles de aeroalergeno de soja existentes actualmente en la ciudad de Barcelona se encuentran en un rango de seguridad que no produce un incremento de ingresos en los hospitales de la ciudad ni un número inusual de asmáticos repetidores, al contrario de lo que ocurrió en los brotes de asma detectados en 1994 y 1996³³.

3.3.- Valor límite ambiental.

El objetivo final de esta monitorización de la concentración ambiental de aeroalergeno de soja, sería no solo eliminar las epidemias de asma por soja en la ciudad de Barcelona, sino tratar de establecer un límite de exposición máximo por debajo del cual los individuos sensibilizados no presentarían síntomas. Sin embargo, establecer un VLA en el caso de los alérgenos es más complicado que en el caso de los materiales tóxicos puesto que la concentración que provoca síntomas en los individuos sensibilizados puede variar en cada caso individual, y es dependiente de los niveles de anticuerpos IgE específicos que tenga el paciente frente al alérgeno y del grado de hiperrespuesta bronquial frente a la metacolina o histamina³⁶. Además, hay que tener en cuenta que deben ser considerados dos niveles de concentración ambiental de alérgeno: el nivel sensibilizante y el nivel que provoca síntomas en individuos ya sensibilizados. Diversos autores afirman que la cantidad de alérgeno necesario para sensibilizar está entre 100-1000 ng/m³, mientras que la necesaria para provocar síntomas una vez que el individuo está sensibilizado es de 10 ng/m³ o inferior³⁶. Además, en este sentido existen estudios de sensibilización a alérgenos como *Dermatophagoides pteronyssinus* en los cuales se afirma que concentraciones

superiores a 80 μg por gramo de polvo doméstico podrían llegar a sensibilizar incluso a personas sanas⁶⁸.

Solo para algunos alergenos como la harina de trigo, el látex y la alfa-amilasa, el límite para prevenir sensibilización y enfermedad alérgica esta establecido⁶⁹, Sin embargo, en el caso de los alergenos de soja este VLA no esta determinado, por lo que, en los presentes trabajos, el valor de 165 U/m^3 (obtenido como valor máximo en un trabajo previo realizado en 22 días de descarga en los cuales no se produjo ningún brote de asma)⁶, ha sido tomado como límite provisional para valorar la eficacia de las medidas ambientales implantadas para la descarga. Este valor correspondería a un nivel de 165 ng/m^3 si tenemos en cuenta los datos aportados en un trabajo previamente publicado que afirma que 1 unidad del estándar *soybean-LMM* corresponde a 1 ng de proteína²⁷.

Tomando este valor como límite, las medidas protectoras adoptadas en 1998 han conducido a un descenso, no solo en la media de concentración de aeroalergeno de soja, sino también en el número de valores que superan este nivel, que ha pasado de ser un 34% de los valores obtenidos en el periodo pre-intervención a solo un 3% en el periodo post-intervención (Tabla 1, segundo trabajo).

En cualquier caso, la consecuencia más importante de estas nuevas medidas adoptadas es la reducción de la concentración de aeroalergeno de soja en el periodo post-intervención y en el número de picos (niveles superiores a 165 U/m^3) en este periodo. Además, a pesar de que hay diferencias en la concentración de aeroalergeno de soja entre los días de descarga y no descarga en el periodo post-intervención, el nivel es inferior al valorado en el periodo pre-intervención, lo que supone una razón importante para aconsejar la implantación de estas medidas en otras ciudades donde se descargue semilla de soja.

Por lo tanto podríamos concluir que la medida de la concentración ambiental de aeroalergeno de soja en la ciudad de Barcelona y en otras ciudades donde se descarga y/o manipula soja es importante para evaluar la eficacia de las medidas ambientales encaminadas a reducir la concentración de aeroalergeno en la atmósfera, para valorar la exposición de la población a este alergeno y por último para conocer la influencia de esta exposición en la persistencia de los síntomas de asma.

CONCLUSIONES

1.- Los estudios de imprecisión, reproducibilidad y sensibilidad del método de ELISA-inhibición validado en el presente estudio, demuestran que es un método sensible y reproducible para medir la concentración ambiental de aeroalergeno de soja.

2.- Los estudios de concordancia entre los métodos de ELISA-inhibición y RAST-inhibición, demuestran que los resultados obtenidos pueden ser transferibles entre ambos laboratorios.

3.- Las intervenciones ambientales y las medidas implantadas en las industrias del puerto de Barcelona para controlar la dispersión de polvo de soja a la atmósfera durante la descarga, han demostrado ser efectivas al reducir la concentración ambiental de dicho alergeno en la ciudad.

4.- La reducción significativa de la concentración de aeroalergeno de soja y del número de picos (niveles superiores a 165 U/m^3) en el periodo post-intervención, ha demostrado ser efectiva puesto que, a estos niveles, no se produce un incremento en el número de ingresos de pacientes sensibilizados a la soja en los Servicios de Urgencias de los hospitales de la ciudad.

5.- Estos resultados, pueden proporcionar datos útiles para el desarrollo de programas de control de la concentración atmosférica de aeroalergeno de soja en otras ciudades donde se descarga y/o manipula soja u otros agentes de naturaleza alérgica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Antó JM, Sunyer J. A point-source asthma outbreak. *Lancet* 1986;1:900-3.
- 2.- Antó JM, Sunyer J, Rodriguez-Roisin R, Suarez M, Vazquez L. Asthma epidemics associated with soybean dust relevant during harbour activities. *N Engl J Med* 1989;320:1097-1102.
- 3.- Antó JM. Epidemias de asma en el mundo. En: Las epidemias de asma de Barcelona. Estudios sanitarios. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, 1990:71-81.
- 4.- Manzanera R, Armengol R, Villalbí JR, Plasència A, Anto JM. La salud pública y el asma por soja en Barcelona. *Estudis i Recerques de Salut Publica* nº 9. Ed: Ajuntament de Barcelona. Barcelona 1999.
- 5.- Sunyer J, Anto JM. Evidencias epidemiológicas. En: Las epidemias de asma de Barcelona. Estudios Sanitarios. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid 1990:71-81.
- 6.- Anto JM, Sunyer J, Reed CE, Sabrià J, Martínez F, Morell F, Codina R, Rodriguez-Roisin R, Rodrigo MJ, Roca J, Sáez M. Preventing asthma epidemics due to soybeans by dust-control measures. *N Engl J Med* 1993; 329:1760-3.
- 7.- Figley KD, Elrod RH. Endemic asthma due to castor bean dust. *JAMA* 1928;90:79-82.
- 8.- Ordman D. An outbreak of bronchial asthma in South Africa, affecting more than 200 persons, caused by castor bean dust from an oil-processing factory. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1955;7:10-24.
- 9.- Mendes E, Ulhoa Cintra A. Collective asthma, simulating an epidemic, provoked by castor-bean dust. *J Allergy* 1954;25:253-9.
- 10.- Salvaggio J, Hasselblad V, Seaburg J, Heiderscheit LT. New Orleans asthma. Relationship of climatologic and seasonal factors to outbreaks. *J Allergy* 1970;45:257-65.

- 11.- Ussetti P, Roca J, Agusti AGN, Montserrat JM, Rodriguez-Roisin R, Agusti-Vidal A. Asthma outbreaks in Barcelona. *Lancet* 1983;280:1.
- 12.- Duke W. Soybean as possible important source of allergy. *J Allergy* 1934;5:300-2.
- 13.- Albert R. A propos de douze cas de sensibilisation au groupe des légumineuses comestibles. *Rev Franç Allergol* 1973; 13: 399-410.
- 14.- White MC, Etzel RA, Olson DR, Goldstein IF. Re-examination of epidemic asthma in New Orleans, Louisiana, in relation to the presence of soy at the harbour. *Am J Epidemiol* 1997;145:1-7.
- 15.- Cocco G, Schiano M, Sacerdoti G. Functional characteristics in soybean asthma (abstract). *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:469.
- 16.- Navarro C, Marquez M, Hernando L, Galvan F, Zapatero L, Caravaca F. Epidemic asthma in Cartagena, Spain, and its association with soybean sensitivity. *Epidemiology* 1993;4:76-9.
- 17.- Garcia-Ortega P, Rovira E, Mora E. Epidemias de asma alérgica a semilla de soja en ciudades pequeñas. *Med Clin (Barc)* 1997;108:677.
- 18.- Ballester F, Soriano JB, Otero I, Rivera ML, Sunyer J, Merelles A, et al. Asthma visits to emergency rooms and soybean unloading in the harbours of Valencia and A Coruña, Spain. *Am J Epidemiol* 1999;149:315-22.
- 19.- Sunyer J, Antó JM, Rodrigo MJ, Morell F. Case-control study of serum immunoglobulin-IgE antibodies reactive with soybean in epidemic asthma. *Lancet* 1989;1:179-82.
- 20.- Rodrigo MJ, Morell F, Helm R, Swanson MC, Greife A, Antó JM, Reed CE. Identification and partial characterization of the soybean-dust allergens involved in the Barcelona asthma epidemic. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:778-84.
- 21.- Thompson PS, Stewart GA. Allergens and pollutants; in: Holgate ST, Church Mk, Lichtenstein LM. *Allergy*. 2ª Ed. Mosby International Ltd (London, UK), 2001. Cap 15.

- 22.- Gonzalez R, Zapatero L, Caravaca F, Carreira J. Identification of soybean proteins responsible for respiratory allergies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1991;95:53-7.
- 23.- Gonzalez R, Polo F, Zapatero L, Caravaca F, Carreira J. Purification and characterization of major inhalant allergens from soybean hulls. *Clin Exp Allergy* 1992;22:748-55.
- 24.- Odani S, Koide T, Ono T, Seto I, Tanaka T. Soybean hydrophobic protein: Isolation, partial characterization and the complete primary structure. *Eur J Biochem* 1987;162:485-91.
- 25.- Baud F, Pebay-Peyroula E, Cohen-Addad C, Odani S, Lehmann MS. Crystal structure of hydrophobic protein from soybean; a member of a new cysteine-rich family. *J Mol Biol* 1993;231:877-87.
- 26.- Gonzalez R, Varela J, Carreira J, Polo F. Soybean hydrophobic protein and soybean hull allergy. *Lancet* 1995;346:48-9.
- 27.- Aceves M, Grimalt JO, Sunyer J, Antó JM, Reed CE. Identification of soybean dust as an epidemic asthma agent in urban areas by molecular marker and RAST analysis of aerosols. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:783-8.
- 28.- Sunyer J, Antó JM, Sabrià J, Rodrigo MJ, Roca J, Morell F, Rodriguez-Roisin R, Codina R. Risk factors of soybean epidemic asthma. *Am Rev Respir Dis* 1992;148:1096-102.
- 29.- Sabrià J, Antó JM, Sunyer J, Roca J, Morell F, Rodriguez-Roisin R, Rodrigo MJ, Codina R. Clinical and functional characteristics of patients two years after being affected by the soybean asthma epidemic in Barcelona. *Thorax* 1994;49:906-9.
- 30.- Antó JM, Soriano JB, Sunyer J, Rodrigo MJ, Roca J, Morell F. Soybean sensitization in epidemic asthma patients 8 years after an intervention. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:A515.

- 31.- Anto JM, Soriano JB, Sunyer J, Rodrigo MJ, Morell F, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Swanson MC. Long term outcome of soybean epidemic asthma after an allergen reduction intervention. *Thorax* 1999;54(8):670-74.
- 32.- Anto JM. Barcelona asthma epidemics: new evidence two years after their control. *European Respiratory J* 1990; 3(Suppl. 10):61s.
- 33.- Soriano JB, Anto JM, Plasencia A, and the Barcelona Soybean-Asthma Group. Repeaters count: a sentinel method for asthma outbreaks. *Thorax* 1995;50:1101-03.
- 34.- Villalbí JR, Plasencia A, Manzanera R, Armengol R, Antó JM, the Collaborative and Technical Support Groups for the study of soybean asthma in Barcelona. Epidemic soybean asthma and public health: new control systems and initial evaluation in Barcelona, 1996-98. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:461-5.
- 35.- Swanson MC, Li TC, Weinth-Murtha PE, Trudeau WL, Fernandez-Caldas E, Greife A, Rodrigo MJ, Morell F, Reed CE. Source of the aeroallergen of soybean dust: A low molecular mass glycopeptide from the soybean tela. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:783-88.
- 36.- Reed CE, Swanson MC, Li JT. Environmental monitoring of protein aeroallergens. En: *Asthma in the Workplace*. Eds: Bersntein IL, Chang-Yeung M, Malo JL, Bernstein DJ. Ed: Marcel Dekker, Inc, 2th ed., 1999:235-55.
- 37.- Agarwal MK, Yunginger JW, Swanson MC, Reed CE. An immunochemical method to measure atmospheric allergens. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68:194-200.
- 38.- Platts-Mills TAE, Chapman MD, Heymann PW, Luczynska CM. Measurements of airborne allergen using immunoassays. *Immun Allergy Clinics N Am* 1989;9:269-83.
- 39.- Swanson MC, Campbell AR, Klauck MJ, Reed CE. Correlation between levels of mite and cat allergens in settled and airborne dust. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:776-83.
- 40.- Price JA, Pollock I, Little SA, Longbottom JL, Warner JO. Measurement of airborne mite antigen in homes of asthmatic children. *Lancet* 1990;336:895-7.

- 41.- Luczynska CM, Li Y, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Airborne concentrations and particle size distribution of allergen derived from domestic cat (*Felis domesticus*). Am Rev Resp Dis 1990;141:361-7.
- 42.- Edwards RG, Beeson MF, Dewdney JM. Laboratory animal allergy: the measurement of airborne urinary allergens and the effects of different environmental conditions. Lab Animals 1983;17:235-9.
- 43.- Price JA, Longbottom JL. ELISA method for the measurement of airborne levels of major laboratory animal allergens. Clin Allergy 1988;18:95-107.
- 44.- Sander I, Neuhaus-Schröder C, Borowitzki G, Baur X, Raulf-Heimsoth M. Development of a two-site enzyme-linked immunosorbent assay for alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* based on a monoclonal antibodies. J Immunol Methods 1997;210(1):93-101.
- 45.- Lillienberg L, Baur X, Doekes G, Belin L, Raulf-Heimsoth M, Sander I et al. Comparison of four methods to assess fungal amylase in flour dust. Ann Occup Hyg 2000;44(6):427-33.
- 46.- Raulf-Heimsoth M, Sander I, Chez Z, Borowitzki G, Diewald K, Van Kampen V, et al. Development of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for detection of the latex allergen Hev b 1. Int Arch Allergy Immunol 2000;123(3):236-41.
- 47.- Doekes G, Van Niftrik M, Portengen L, Tomazic-Jezic VJ, Chen Z, Tjoe Nij EN et al. Measurement of latex proteins in low-volume airborne samples and glove extracts with a sandwich EIA using polyclonal rabbit anti-latex IgG. J Allergy Clin Immunol 2001;107:A438.
- 48.- Zahradnik E, Raulf-Heimsoth M, Brüning T, Doekes G, Sander I. Development of a sandwich enzyme immunoassay for quantification of phytase derived from *Aspergillus niger*. (Abstract). Exposure Assessment in a Changing Environment Congress 2004; p.49, 28-5.
- 49.- Harlow E, Lane D. Immunoassay. En: Antibodies. A laboratory manual. Eds: Harlow E, Lane D. Ed: Coldspring Harbor Laboratory 1988:553-612.

- 50.- Carpenter AB. Enzyme-linked immunoassays. En: Manual Of Clinical Laboratory Immunology. Eds: Rose NR, Folds JD, Nakamura RM. Ed: American Society for Microbiology, Washington, D.C., 5th ed., 1997:908-15.
- 51.- Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Antibody detection and preparation. En: Current protocols in immunology. Eds: Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Ed: John Wiley & Sons, Inc. 1997.
- 52.- Renström A, Gordon S, Hollander A, Spithoven J, Larsson PH, Venables KM, Heederik D, Malmberg P. Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels II. Factors influencing antigen detection. Allergy 1999;54:150-7.
- 53.- Renström A, Gordon S, Larsson PH, Tee RD, Newman-Taylor AJ, Malmberg P. Comparison of a radioallergosorbent (RAST) inhibition method and a monoclonal enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for aeroallergen measurement. Clin Exp Allergy 1997;27:1314-21.
- 54.- Gordon S, Kiernan LA, Nieuwenhuijsen MJ, Cook AD, Rosemary RD, Newman-Taylor AJ. Measurement of exposure to mouse urinary proteins in a epidemiological study. Occup Environ Med 1997;54:135-40.
- 55.- Hollander A, Gordon S, Renström A, Thissen J, Doekes G, Larsson PH, Malmberg P, Venables KM, Heederik D. Comparison of methods to assess airborne rat and mouse allergen levels I. Analysis of air samples. Allergy 1999;54:142-9.
- 56.- Luczynska CM, Arruda LK, Platts-Mills TAE, Miller JD, Lopez M, Chapman MD. A two-site monoclonal antibody ELISA for the quantification of the major Dermatophagoides SPP, allergens, Der p I, Der f I. J Immunol Methods 1989;118:227-35.
- 57.- Bolliguer ME, Wood RA, Chen P, Eggleston PA. Measurement of cat allergen levels in the home by use of an amplified ELISA. J Allergy Clin Immunol 1989;101:124-5.

- 58.- Gordon S, Tee RD, Nieuwenhuijsen MJ, Lwson D, Harris J, Newman-Taylor AJ. Measurement of airborne rat urinary allergen in an epidemiological study. *Clin Exp Allergy* 1994;24:1070-7.
- 59.- Swanson MC, Campbell AR, Klauck MJ, Reed CE. Correlations between levels of mite and cat allergens in settled and airborne dust. *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:776-83.
- 60.- Balnd JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;i:307-10.
- 61.- Hollis S: Analysis of method comparison studies. *JIFCC* 1997;9(1).
- 62.- The measure of interrater agreement; in Fleiss JL: *Statistical methods for rates and proportions*. New York, Wiley, 1981;pp 212-36.
- 63.- Hypothesis testing categorical data; in Rosner B: *Fundamentals of biostatistics*. 4^a ed. Duxbury Press (Belmont, California), 1995: p 426.
- 64.- Box GE, Jenkins GM. *Time series analysis: Forecasting and control*. San Francisco, Holden-Day, 1976.
- 65.- Diggle P. *Time series: A biostatistical introduction*. New York, Oxford science Publications. Oxford University Press, 1992.
- 66.- Chatfield C: *The analysis of time series: An introduction*, ed 5. London, Chapman & Hall, 1996.
- 67.- Murillo C. *Métodos estadísticos de series temporales. Aplicaciones sanitarias*. Barcelona, SG Editores SA, 1994.
- 68.- Platts-Mills TA, Sporik RB, Wheatley LM, Heymann PW. Is there a dose-response relationship between exposure to indoor allergens and symptoms of asthma? *J Allergy Clin Immunol*. 1995 Oct;96(4):435-40.

69.- Baur X. Are closer to developing threshold limit values for allergens in the workplace?. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003;90(suppl):11-8.