

Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Charakterisierung der entzündungsauslösenden Potenz von Glucanen in
einem Vollblutmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefanie Hinz
Tierärztin
aus Oberhausen

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3252

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. Bert-André Zucker
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Gerd Schlenker
Dritter Prüfer: Univ.-Prof. Dr. Dr. Hafez Mohamed Hafez

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

glucans, moulds, cytokines, aerosols, animal housing, limulus, airborne
infection, air microbiology

Tag der Promotion: 17.11.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-515-8

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written
authorization of the publisher.

Coverbild © cornelius - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin – 030-45494866

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhalt

1	Einleitung und Zielstellung	1
2	Literatur	2
2.1	Bioaerosole	2
2.1.1	Einleitung.....	2
2.1.2	Erkrankungen durch Bioaerosole.....	2
2.1.2.1	Allergische Erkrankungen.....	2
2.1.2.2	Nicht-allergische Erkrankungen	3
2.1.2.2.1	Toxische Erkrankungen	3
2.1.2.2.2	Infektiöse Erkrankungen	4
2.1.2.2.3	Neoplastische Erkrankungen	4
2.1.3	Bedeutung von Bioaerosolbelastungen in Tierställen.....	4
2.2	Glucane	5
2.2.1	Vorkommen und Struktur der Glucane.....	5
2.2.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen der Glucane	7
2.2.3	Die Glucan-Rezeptoren	8
2.2.4	Möglichkeiten der Beeinflussung der Wirkung von Glucanen.....	10
2.2.5	Wechselwirkung der Glucane mit anderen entzündungsauslösenden Stoffen.....	11
2.2.6	Durch Glucane ausgelöste Erkrankungen.....	12
2.2.7	Nachweismethoden für Glucane	13
2.2.7.1	Inhibition Enzyme Immunoassay	13
2.2.7.2	Glucanspezifischer Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test	14
2.2.7.3	Enzyme-Immunoassay für 1,6-verzweigte 1,3-Glucane	15
2.2.7.4	Nachweis mit Hilfe von Dectin-1	15
2.3	Schimmelpilze	16
2.3.1	Einteilung und Aufbau der Schimmelpilze.....	16
2.3.2	Anforderungen der Schimmelpilze an ihren Lebensraum.....	17
2.3.3	Vorkommen von luftgetragenen Schimmelpilzen	18
2.3.4	Erkrankungen durch luftgetragene Schimmelpilze	19
2.3.4.1	Allgemeine Wirkung der Schimmelpilze	19
2.3.4.2	Wirkung einzelner Schimmelpilzgattungen und –spezies.....	21
2.3.4.3	Wirkung der Mykotoxine	21
2.3.4.4	Reaktionen des Immunsystems auf Schimmelpilzexposition	22
2.3.5	Nachweis und Beurteilung der Schimmelpilzbelastung	23
2.4	Der Humane Vollbluttest.....	24
2.4.1	Entwicklung des humanen Vollbluttests.....	24
2.4.2	Prinzip des humanen Vollbluttests	24
2.4.3	Vergleich des humanen Vollbluttests mit anderen Testsystemen	25
2.4.4	Kryokonserviertes Blut.....	25
2.4.5	Zytokine.....	26
3	Material und Methoden.....	27
3.1	Bestimmung der Aktivität von kommerziell erhältlichen Glucanen in einem humanen Vollbluttest.....	27
3.1.1	Untersuchte Glucane	27
3.1.2	Durchführung des Vollbluttests	28
3.1.2.1	Blutspender	28

Inhalt

3.1.2.2	Vollblutinkubation.....	28
3.1.2.3	ELISA zum Nachweis proinflammatorischer Zytokine	29
3.1.2.3.1	ELISA zum Nachweis von IL-1 β	29
3.1.2.3.1	ELISA zum Nachweis von IL-6	30
3.1.3	Bestimmung der Aktivität von Glucanen im Vollbluttest nach Zusatz von PB.....	31
3.1.4	Bestimmung der Aktivität von Glucanen im Vollbluttest nach NaOH-Behandlung	31
3.2	Bestimmung der Aktivität von kommerziell erhältlichen Glucanen in einem glucanspezifischen Limulus-Amöbozyt-Lysat (LAL)-Test.....	31
3.2.1	Untersuchte Glucane	31
3.2.2	Durchführung des glucanspezifischen LAL-Tests	32
3.2.3	Bestimmung der Aktivität von Glucanen im glucanspezifischen LAL-Test nach NaOH-Behandlung	32
3.3	Bestimmung der Konzentration an einatembaren Staub, Glucanen, Schimmelpilzen, Endotoxinen, Bakterien und proinflammatorisch aktiven Stoffen in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen.....	32
3.3.1	Untersuchte Tierställe	33
3.3.2	Bestimmung der Konzentration an einatembaren Staub	35
3.3.3	Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Glucanen	35
3.3.3.1	Vorversuche zur Optimierung der Probenaufbereitung für den glucanspezifischen LAL-Test	35
3.3.4	Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffen	36
3.3.4.1	Sammlung der luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffe.....	36
3.3.4.2	Bestimmung der Konzentration an proinflammatorisch aktiven Stoffen mittels eines humanen Vollbluttests.....	36
3.3.4.3	Untersuchung des Einfluss von Polymyxin B auf die proinflammatorische Aktivität der Bioaerosolproben.....	36
3.3.5	Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Endotoxinen.....	36
3.3.5.1	Sammlung der luftgetragenen Endotoxine	36
3.3.5.2	Bestimmung der Endotoxinkonzentration mittels eines LAL-Tests	37
3.3.6	Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Schimmelpilzen.....	37
3.3.6.1	Nachweis luftgetragener Schimmelpilze mittels Impaktion	37
3.3.6.2	Nachweis luftgetragener Schimmelpilze mittels Impingement.....	38
3.3.7	Bestimmung der Konzentration luftgetragener Bakterien	38
3.3.7.1	Nachweis der luftgetragenen aeroben gram-negativen Gesamtkoloniezahl	39
3.3.7.2	Nachweis der luftgetragenen Gesamtkoloniezahl	39
3.4	Bestimmung der Konzentration an Glucanen, Schimmelpilzen und Bakterien in potentiellen Quellen für Bioaerosole aus Tierställen.....	39
3.4.1	Probennahme und –aufbereitung.....	39
3.4.1.1	Nachweis der Schimmelpilze und Bakterien	39
3.4.1.2	Nachweis der Glucane.....	40
3.5	Statistische Auswertung.....	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Proinflammatorische Aktivität von Glucanen im Vollbluttest.....	41
4.1.1	Einfluss der Behandlung mit Polymyxin B auf die proinflammatorische Aktivität.....	41

Inhalt

4.1.2	Vergleich zwischen der glucaninduzierten IL-1 β - und IL-6-Ausschüttung.....	43
4.1.3	Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die proinflammatorische Aktivität von Glucanen im Vollbluttest	45
4.2	Aktivitäten von Glucanen in einem glucanspezifischen LAL-Test.....	47
4.2.1	Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die Aktivität von Glucanen in einem glucanspezifischen LAL-Test.....	47
4.3	Konzentration an einatembaren Staub, Glucanen, Endotoxinen, Schimmelpilzen und Bakterien in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen sowie deren proinflammatorische Potenz	50
4.3.1	Vorversuche zur Anwendung des glucanspezifischen LAL-Test zur Glucanbestimmung in Bioaerosolproben	50
4.3.2	Konzentration an einatembaren Staub, Glucanen, Endotoxinen, Schimmelpilzen und Bakterien in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen sowie die proinflammatorische Potenz dieser Proben.....	51
4.4	Konzentrationen an Glucanen, Schimmelpilzen und Bakterien in potentiellen Glucanquellen aus verschiedenen Tierställen	60
5	Diskussion	63
5.1	Proinflammatorische Potenz kommerziell erhältlicher Glucane.....	63
5.1.1	Struktur-Wirkungsbeziehungen.....	63
5.1.2	Einfluss von NaOH auf die proinflammatorische Aktivität von Glucanen	65
5.2	Reaktivität der Glucane in einem glucanspezifischen LAL-Test.....	66
5.3	Vergleich der Reaktivität von Glucanen im Vollblut- und glucanspezifischen LAL-Test	66
5.4	Glucane in Bioaerosolen aus Tierställen.....	67
5.4.1	Konzentration von Glucanen in der Luft von Tierställen	67
5.4.2	Beziehungen zwischen luftgetragenen Glucanen und luftgetragenen Schimmelpilzen in den untersuchten Tierställen.....	68
5.4.3	Beziehungen zwischen luftgetragenen Glucanen und einatembaren Staub, sowie luftgetragenen Endotoxinen und Bakterien	69
5.4.4	Bedeutung von Glucanen bei der Auslösung von nichtinfektiösen entzündlichen Atemwegserkrankungen	70
6	Zusammenfassung	72
7	Summary	74
8	Literaturverzeichnis.....	76
9	Anhang	99

Abkürzungsverzeichnis

A.	<i>Aspergillus</i>
a _w -Wert	Wasseraktivitätswert
Caso	Caseinpepton-Sojamehlpepton
CSE	Kontrollstandardendotoxin
Da	Dalton
DG	Dichloran-Glycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAA	extrinsische-allergische Alveolitis
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EU	Endotoxin Unit
EUU	Endotoxin Equivalent Unit
HP	hypersensitive Pneumonitis
IEIA	Inhibition Enzyme Immunoassay
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
KBE	Kolonie-bildende Einheit
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LPS	Lipopolysaccharid
MVOC	Mikrobielle flüchtige organische Verbindungen
n.a.	nicht auswertbar
NaCl-Lösung	Kochsalzlösung
NaOH	Natriumhydroxid
NEDA	Napthlethylenediamindihydrochlorid
n.u.	nicht untersucht
ODTS	Organic Dust Toxic Syndrom
RAO	Recurrent Airways Obstruction
rpm	rounds per minute
PAMP	pathogen-associated molekular pattern
PB	Polymyxin B
PGP	personengetragenes Gefahrstoffprobennahmesystem
PRR	pattern recognition receptor
<i>St.</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>S.</i>	<i>Saccharomyces</i>
Th	T-Helferzellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
u.N.	unter der Nachweisgrenze
VDI	Verein deutscher Ingenieure

1 Einleitung und Zielstellung

Bioaerosole in Tierställen können eine potentielle Gesundheitsgefahr für Menschen und Tiere darstellen. In dieser Hinsicht besonders bedeutsam sind potentiell toxische Bioaerosolbestandteile wie Endotoxine, β -1,3-D-Glucane, Schimmelpilze und Mykotoxine.

β -1,3-D-Glucane sind eine der wichtigsten Gerüstsubstanzen der Zellwand von Pilzen, insbesondere Schimmelpilzen. Sie können immunmodulierend wirken (Mueller et al., 2000; Roubroeks et al., 2000) und stehen im Verdacht an der Auslösung verschiedener bioaerosolbedingter Erkrankungen, insbesondere des Respirationstraktes beteiligt zu sein (Williams, 1997; Mandryk et al., 1999; Douwes et al., 2000a; Hauswirth und Sundry, 2004). Über ihre genaue pathophysiologische Bedeutung bei der Entstehung solcher bioaerosolbedingten Krankheiten ist jedoch wenig bekannt, da unter Praxisbedingungen stets eine gemeinsame Exposition mit anderen luftgetragenen Substanzen, insbesondere Endotoxinen, vorliegt (Gehring et al., 2001). Verschiedene epidemiologische Untersuchungen in Schul- und Bürogebäuden weisen aber darauf hin, dass Glucane, insbesondere in Gebäuden mit Problemen in der Luftfeuchtigkeitsregulation oder mit direkten Feuchtschäden, einen potentiellen Risikomarker für unspezifische Entzündungsreaktionen des Respirationstraktes bei dort untergebrachten Personen darstellen (Rylander, 1999a).

Ein Untersuchungsschwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der proinflammatorischen Aktivität kommerziell erhältlicher β -1,3-D-Glucane. Dabei sollten insbesondere die Beziehungen zwischen der Struktur der Glucane und ihrer proinflammatorischen Aktivität untersucht sowie das proinflammatorische Potential von Glucanen und Endotoxinen miteinander verglichen werden. Das dazu verwendete Arbeitsmodell war ein humaner Vollbluttest. Dieser beruht auf den pathophysiologischer Weise im Organismus ablaufenden Entzündungsprozessen und ermöglicht dadurch eine realitätsnahe in-vitro-Testung der proinflammatorischen Aktivität verschiedener Substanzen. Da bisher kaum Daten über die luftgetragene Glucanbelastung aus dem Tierhaltungsbereich vorliegen, wurden entsprechende Studien in verschiedenen Tierställen durchgeführt. Diese Untersuchungen dienten auch dazu abschätzen zu können, welchen Beitrag Glucane an der gesamt-proinflammatorischen Potenz von Bioaerosolen aus Tierställen haben.

In der Literatur sind ebenfalls Überlegungen beschrieben die Quantifizierung luftgetragener β -Glucane als alternative Nachweisverfahren für die Konzentrationsbestimmung an luftgetragenen Schimmelpilzen mittels Kultivierungsverfahren zu etablieren (Chew et al., 2001). Hierdurch würde ein kultivierungsunabhängiges Verfahren, welches innerhalb von wenigen Stunden nach der Probensammlung Ergebnisse liefern kann, zur Verfügung stehen. Die Möglichkeit der Übertragbarkeit dieser Überlegungen auf Bioaerosole aus Tierställen wurde ebenfalls in Rahmen dieser Arbeit geprüft.

2 Literatur

2.1 Bioaerosole

2.1.1 Einleitung

Bioaerosole sind luftgetragene Partikel biologischer Herkunft, darunter sind alle im Luftraum befindlichen Ansammlungen von Partikeln, denen Pilze, Bakterien, Viren und/oder Pollen sowie deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte anhaften bzw. diese beinhalten oder bilden, zu verstehen (Anonym, 2005). Als Synonym für Bioaerosole wird häufig der Begriff organischer Staub verwendet (Douwes et al., 2003).

Bioaerosole kommen in der Natur ubiquitär vor (Linsel, 2001). In ihnen unterscheidet man aufgrund der Herkunft pflanzliche, tierische und mikrobielle Bestandteile. Die Bioaerosolzusammensetzung kann dabei starken räumlichen und zeitlichen Konzentrationsschwankungen unterliegen (Hoppenheidt und Mücke, 1998). Aus medizinischer Sicht besonders bedeutsame Bioaerosolbestandteile sind Endotoxine, β -1,3-D-Glucane, Schimmelpilze und Mykotoxine, da diese u.a. potentiell toxische, proinflammatorische und immunmodulatorische Wirkungen entfalten können.

2.1.2 Erkrankungen durch Bioaerosole

Die Exposition von Bioaerosolen kann zu Erkrankungen des Respirationstraktes und subjektiven Symptomen sowohl bei Menschen als auch bei Tieren führen (Zucker et al., 2005). Weiterhin medizinisch bedeutsam ist die Einwirkung der Bioaerosole auf die äußere Haut. Die Bedeutung von Bioaerosolbelastungen erkannte bereits 1555 der dänische Bischof Olaus Magnus (Ramazzini, 1940), der einen Einfluss des während des Dreschens freigesetzten Staubes auf die Gesundheit der Menschen feststellte. Da stets mehrere Bioaerosolbestandteile gemeinsam wirken, können sie sich gegenseitig in der Wirkung beeinflussen (Rylander et al., 1992; Hoppenheidt, 2002). Die respiratorischen Atemwegserkrankungen durch Bioaerosole sind meistens die Folge einer Atemwegsentszündung, die bei berufsbedingten Erkrankungen durch die Exposition von Toxinen, proinflammatorische Substanzen oder Allergene ausgelöst wird. Außerdem können die in den Bioaerosolen enthaltenen Infektionserreger (z.B. Coxiellen, Legionellen) zu Erkrankungen mit respiratorischen Symptomen führen. Auf Grundlage der Entzündungsmechanismen und Symptome können durch Bioaerosole ausgelöste nichtinfektiöse Erkrankungen in allergische und nicht-allergische Erkrankungen unterteilt werden (Douwes et al., 2003).

2.1.2.1 Allergische Erkrankungen

Diese Erkrankungsformen sind durch eine immunspezifische Entzündung charakterisiert, in der verschiedener Antikörper (IgE, IgG) eine Hauptrolle spielen (Douwes et al., 2003). Bedeutsam sind im Zusammenhang mit Bioaerosolbelastungen folgenden Allergietypen:

- Allergien vom Typ I (Sofortreaktion)

Bei diesem Allergietyp entstehen die Symptome wenige Sekunden bis Minuten nach dem Kontakt mit der allergieauslösenden Substanz durch Freisetzung von Histamin, Leukotrienen und Prostaglandinen aus basophilen Granulozyten und Mastzellen. Beispiele dafür sind die allergische Rhinitis und Konjunktivitis und das allergische Asthma bronchiale. Dabei handelt es sich beim Menschen sehr häufig um eine Sensibilisierung gegen so genannte Innenraumallergene, darunter fallen u.a. Milbenallergene, Tierepithelien und Schimmelpilzallergene (Hoppenheidt und Mücke, 1998).

- Allergien vom Typ III kombiniert mit Typ IV- Reaktionen

Ein Beispiel dafür ist die so genannte exogen-allergische Alveolitis (EAA). Sie wird auch als hypersensitive Pneumonitis (HP) bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine akut, subakut oder chronisch verlaufende Lungenentzündung, die durch wiederholte Inhalation von organischen Stäuben verursacht werden kann. Es kommt zu einer systemischen und pulmonalen Reaktion. Die EAA ist charakterisiert durch das Vorhandensein präzipitierender Antikörper, sensibilisierter Lymphozyten und mononukleärer Zellinfiltrate in den Alveolen. Es kommt zu irreversiblen pulmonalen Funktionseinbußen infolge einer Lungenfibrose. Für die Allergieentstehung sind schwerpunktmäßig Schimmelpilze, in Tierställen insbesondere Aspergilluspezies (Radon et al., 1999), verantwortlich (Bünger et al., 2000a). Zur Auslösung der EAA müssen sie in sehr hohen Konzentrationen vorkommen (10^6 bis 10^{10} Sporen/m³). Dies wird zumeist nur bei beruflicher Exposition, z.B. in der Landwirtschaft durch Arbeiten mit verschimmeltem Heu, Stroh und Getreide erreicht.

2.1.2.2 Nicht-allergische Erkrankungen

2.1.2.2.1 Toxische Erkrankungen

Toxische Substanzen biologischen Ursprungs führen zu entzündlichen Vorgängen an den Schleimhäuten. Dafür verantwortlich sind hauptsächlich Endotoxine, Mykotoxine und β -1,3-D-Glucane (Hoppenheidt, 2002). Aufgrund des inspiratorischen Kontaktes mit diesen Stoffen kommt es häufig zu Entzündungen der Schleimhäute des Respirationstraktes. Dies kann zu folgenden Erkrankungen führen:

- Bronchitis und nicht-allergisches Asthma als Folgeerkrankung

Das nicht-allergische Asthma beruht auf einer chronischen Exposition irritierender Stoffe und ist nicht IgE-vermittelt. Diese Asthmaform ist häufig bei Landwirten feststellbar (Radon et al., 1999). Ein Beispiel für durch Bioaerosole induziertes Asthma bei Tieren ist die Recurrent Airways Obstruction (RAO) des Pferdes. Diese Erkrankung stellt jedoch eine Mischform dar, denn neben der Entzündungsreaktion aufgrund toxischer Stoffwechselprodukte ist auch eine allergische Komponente an der Symptomentstehung beteiligt. Die Rolle der verschiedenen Staubkomponenten ist dabei bei Mensch und Tier unklar. Besonders bedeutsam für diese Erkrankungen sind jedoch Endotoxine und Schimmelpilze, die zusammen mit anderen Staubbestandteilen eine synergistische Wirkung in der Symptomentstehung bedingen (Pirie et al., 2003). Weiterhin ist bekannt, dass luftgetragene Endotoxine in hohen Konzentrationen (100 – 200 ng/m³) zu Bronchokonstriktion beim Menschen führen können (Kirkhorn and Garry, 2000).

- Organic Dust Toxic Syndrom (ODTS)

Diese Erkrankung wird auch als toxische Alveolitis bezeichnet. Es handelt sich dabei um eine akute grippeartige Erkrankung mit Fieber, Muskelschmerzen und neutrophiler Entzündung des unteren Respirationstraktes (Sorenson et al., 1998b). Sie wird durch Inhalation hoher Konzentrationen von organischem Feinstaub hervorgerufen (Mücke und Lemen, 1999) und ist selbstlimitierend. Die Symptome ähneln der EAA, allerdings kommt es nicht zu strukturellen Veränderungen am Lungenparenchym. Das ODTS kann bereits beim ersten Feinstaubkontakt auftreten, denn es beruht auf einer toxischen Reaktion und weist keine Anzeichen einer immunologischen Hypersensitivität auf (Linaker und Smedley, 2002). Es ist also im Gegensatz zur EAA keine Sensibilisierungsphase notwendig. Zur Entstehung wird eine hohe Konzentration des auslösenden Agens benötigt (10^9 Schimmelpilzsporen/m³ bzw. 1-2 µg/m³ Endotoxin). Damit handelt es sich ebenfalls um eine Erkrankung, die hauptsächlich durch stark belastete Arbeitsplätze ausgelöst wird.

2.1.2.2.2 Infektiöse Erkrankungen

Infektiöse Erkrankungen können durch Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen oder Helminthen ausgelöst werden. Die infektiösen Mikroorganismen müssen dann aus ihrem Reservoir auf einen empfänglichen Wirt übertragen werden. Eine Möglichkeit dafür stellt die luftgetragene Exposition dar, die typischerweise bei Bioaerosolen vorkommt. Dies ist beim Tier beispielsweise bei der equinen Influenza, der porcinen Influenza, der infektiösen bovinen Rhinotracheitis und der Psittakose bzw. Ornithose der Fall. Beispiele für durch luftgetragene Krankheitserreger ausgelöste Erkrankungen beim Menschen sind Q-Fieber, Influenza und die Legionärskrankheit (Douwes et al., 2003).

2.1.2.2.3 Neoplastische Erkrankungen

Die Entstehung von Neoplasien ist durch Einwirkung von Mykotoxinen möglich. Besonders bedeutsam in diesem Zusammenhang sind das Ochratoxin und das Aflatoxin. Die Hauptaufnahme erfolgt zwar über die Nahrung, eine Inhalation ist allerdings auch möglich. Eine hohe Gefährdung haben dabei z.B. Arbeiter in der Viehfutterproduktion (Douwes et al., 2003).

2.1.3 Bedeutung von Bioaerosolbelastungen in Tierställen

Bioaerosole in Tierställen können eine potentielle Gefahr für die Tiere und das dort arbeitende Personal darstellen. Auch in der Umgebung von Tierhaltungsanlagen haben die Bioaerosolbelastungen eine hohe Bedeutung. Es wird angenommen, dass ein erhöhtes Risiko von Lungenerkrankungen bei Anwohnern besteht (Radon et al., 2005). Obstruktive Atemwegserkrankungen sind bei Landwirten, welche häufig sehr hohen Bioaerosolexpositionen ausgesetzt sind (Hoopmann et al., 2005), die häufigste Berufskrankheit (Nowak, 1998). Es leiden z.B. 55% der Schweinehalter unter einer chronischen Bronchitis (Linsel, 2001). Schweinestallstaub zeichnet sich insbesondere durch hohe Endotoxin- und Glucangehalte aus, dies gilt auch für Staub aus Geflügelställen und Getreidestaub (Radon et al., 1999). Quellen für β -Glucane in diesem Bereich sind Mikroorganismen, Abbauprodukte der Mikroorganismen und Pflanzenfasern (Hauswirth und Sundry, 2004).

Ähnlich wie beim Menschen kann auch beim Tier eine hohe Bioaerosolbelastung zu Erkrankungen führen. Ein bedeutsames Beispiel dafür ist die RAO des Pferdes, die durch Inhalation von organischem Staub ausgelöst werden kann (Airakasinen et al., 2005; Pirie et al., 2003). Weiterhin kann eine hohe Belastung mit Bioaerosolen und den darin enthaltenen proinflammatorisch aktiven Substanzen das Auftreten von respiratorischen Faktorenkrankheiten beim Tier begünstigen (Donham, 1991; van Gucht et al., 2003).

Die Konzentration der einzelnen Bioaerosolkomponenten in der Tierhaltung ist dabei abhängig von der Tierart, dem Alter der Tiere, der Belegungsdichte, der Fütterungs- und Haltungstechnologie, der Funktionsweise der lufttechnischen Anlagen, den Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen und stallklimatischen Faktoren (Zucker et al., 2005) und kann starken räumlichen und zeitlichen Schwankungen unterliegen (Hoppenheidt und Mücke, 1998). Generell ist jedoch davon auszugehen, dass bei der Intensivtierhaltung hohe Konzentrationen an luftgetragenen Mikroorganismen und Stäuben in den Tierställen nachgewiesen werden können, dies gilt wiederum insbesondere für Geflügel- und Schweineställe (Seedorf et al., 1998).

2.2 Glucane

2.2.1 Vorkommen und Struktur der Glucane

Glucane sind Polymere der Glucose. Sie dienen Pilzen als Gerüstsubstanz und machen bis zu 80 % ihrer Zellwand aus (mit Ausnahme von *Cryptococcus neoformans* und Zygomyceten). Glucane kommen außer in Pilzen noch in Pflanzen und vereinzelt in Bakterien vor (Chew et al., 2001), z.B. ist bekannt, dass Streptokokken Glucane bzw. glucanähnliche Polymere produzieren (Pickering et al., 2005). Außerdem dienen sie in Protozoen, Braunalgen und Kieselalgen als Speichersubstanz (McIntosh et al., 2005). Glucane kommen dagegen nicht in tierischen oder menschlichen Zellen vor.

Unter den verschiedenen Glucanen zeigen die β -1,3-D-Glucane die größte biologische Aktivität. Die wichtigste Quelle für diese Glucane stellen die Zellwände von Schimmelpilzen dar (Williams, 1994; Williams, 1996). Durch Inhalation von Schimmelpilzen oder Schimmelpilzbestandteilen und Pflanzenteilen können β -1,3-D-Glucane in den Respirationstrakt gelangen (Hauswirth und Sundry, 2004). Diese Glucane haben immunmodulatorische Eigenschaften, deren Ausmaß abhängig ist von ihrer Primärstruktur und den damit verbundenen chemisch-physikalischen Eigenschaften. Diese Tatsache ist schon seit langem bekannt. Man weiß z.B. seit 50 Jahren, dass Zymosan eine aktivierende Wirkung auf das Retikuloendotheliale System hat. (Riggi und Di Luzio, 1961; Brown et al., 2002). In Getreide, insbesondere in den Körnern von Hafer und Gerste kommen typischerweise β -Glucane mit gemischten 1,3- und 1,4-Verzweigungen vor, sie besitzen ebenfalls immunmodulatorische Eigenschaften (Roubroeks et al., 2000).

- Primärstruktur der Glucane

Die β -1,3-D-Glucane können als lineare Glucane (Abbildung 1) vorliegen oder ein Grundgerüst aus D-Glucoseneinheiten haben, die am C1 und C3 verbunden sind, mit zusätzlichen Verzweigungen, die am C6 ansetzen (Abbildung 2). Man unterscheidet also

lineare und verzweigte Glucane. Die Länge des Grundgerüsts variiert bei den verschiedenen Glucanen. Weiterhin unterscheiden sich die verzweigten Glucane in der Anzahl der Verzweigungen. Dadurch ergeben sich Glucane mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und daraus resultierenden unterschiedlichen biologischen Wirkungen.

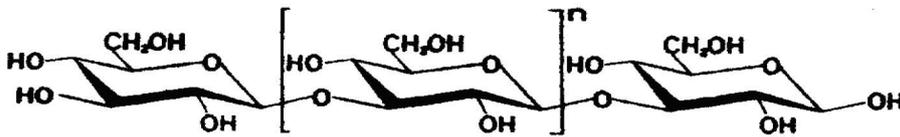


Abbildung 1: Primärstruktur von Curdlan als Beispiel für ein lineares β -1,3-D-Glucan (nach McIntosh et al., 2005)

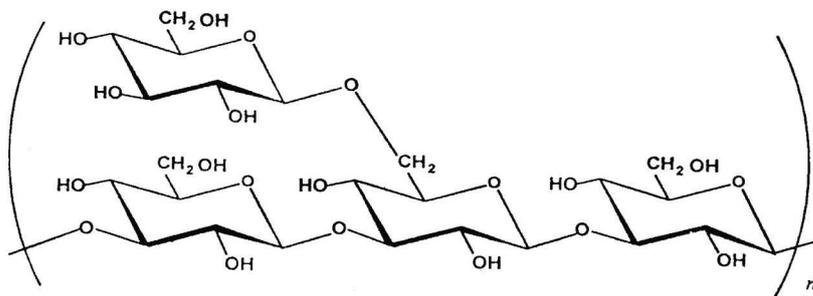


Abbildung 2: Primärstruktur von Grifolan als Beispiel für ein verzweigtes β -1,3-D-Glucan (nach Adachi et al., 1994)

- Raumstruktur der Glucane

Glucane können drei verschiedene Raumstrukturen annehmen. Die willkürliche Spiralanordnung, die Einfachhelix und die Dreifachhelix. Die Dreifachhelix, die die Hauptraumstruktur verzweigter Glucane darstellt, wird durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Glucosepolymeren stabilisiert und führt dazu, dass die Glucane wasserunlöslich sind (Rylander, 1999a). Die β -1,3-D-Glucane in der Pilzzellwand kommen hauptsächlich in der Dreifachhelix vor (Mueller et al., 2000). Generell sind Glucane schlecht wasserlöslich und die Wasserlöslichkeit nimmt mit steigender Molekularmasse ab (Ishibashi et al., 2001). Des Weiteren ist das Molekulargewicht ein wichtiger Faktor in der Konformationsstabilität (Aketagawa et al., 1993).

In Bioaerosolen kommen Glucane nur zu 10% in wasserlöslicher Form vor. Allerdings haben sowohl wasserlösliche als auch wasserunlösliche Glucane eine inhalative Bedeutung (Rylander et Carvalho, 2006). Des Weiteren haben Glucane auch in partikulärer Form eine Wirkung auf das Immunsystem (Cleary et al., 1999) (s. Kapitel 2.2.2).

Eine weitere wichtige Eigenschaft der Glucane, insbesondere für die Rezeptorbindung, ist ihre elektrische Ladung. Glucane, die nur aus Glucosebausteinen bestehen sind elektrisch neutral. Beispiele für geladene Glucane sind Glucanphosphat und Glucansulfat.

2.2.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen der Glucane

β -1,3-D-Glucane wirken auf das Immunsystem und führen zur Freisetzung von Zytokinen (IL-1, IL-2, IL-6 und TNF-alpha), zur Verstärkung des Respiratory Burst, zur Freisetzung von Nitritoxid, zur Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten, zur Aktivierung des alternativen Komplementweges und zur Aktivierung der neutrophilen Granulozyten sowie zur Verstärkung deren antimikrobieller Wirkung (Adachi et al., 1994; Soltys und Quinn, 1999; Douwes et al., 2000c; Ohno et al., 2001; Pang et al., 2005). Die Wirkung der Glucane erfolgt über Bindung an den so genannten Glucanrezeptor und die dadurch ausgelöste Freisetzung des Nuklear Faktors κ_B (Lowe et al., 2001). Dies gilt nicht für Glucane mit einem Molekulargewicht unter 10.000 g/mol. Diese sind trotz Bindung an den Glucanrezeptor biologisch inaktiv (Brown und Gordon, 2005). Dagegen kommt es mit steigendem Molekulargewicht zu einer Verbesserung der immunmodulatorischen Eigenschaften (z.B. Zytokinfreisetzung nach Bindung an den Glucanrezeptor). Diese Tatsache ist besonders bedeutsam bei löslichen Glucanen (Brown und Gordon, 2003; Herre et al., 2004).

Eine weitere Fähigkeit der β -Glucane ist die Freisetzung von H_2O_2 aus Makrophagen. Dies ist jedoch strukturabhängig, denn dieser Effekt wird im Gegensatz zu partikulären Glucanen nicht durch das gelförmige Grifolan ausgelöst (Adachi et al., 1994). Gantner et al. (2005) beschrieben ebenfalls eine Wirkungsabhängigkeit vom Aggregatzustand. Nach Bindung eines partikulären Glucans, z.B. Zymosan kam es zu einer Aktivierung des Glucanrezeptors. Dagegen führt die Bindung eines löslichen Glucans (in diesem Fall Laminarin) nicht zu einer Stimulierung der Signalkette. Des Weiteren fanden Adachi et al. (2004), dass Schizophyllan die zytokinvermittelte immunmodulierende Aktivität von Lymphozyten erhöht.

Durch die Fähigkeit zur Zytokinstimulation sind Parallelen zur Entzündungsauslösung durch Endotoxine gegeben. Lipopolysaccharid (LPS) kann ebenfalls zur Induktion von IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α führen. Allerdings hat LPS einen stärkeren induzierenden Einfluss auf IL-1 β als β -Glucane. Es konnte in einer Monozytenzellkultur jedoch nachgewiesen werden, dass Zymosan IL-6 in der gleichen Stärke induziert wie LPS (Bondeson et al., 1999). Adachi et al. (1994) dagegen fanden, dass 500 μ g/ml Grifolan benötigt werden, um eine vergleichbare Menge IL-6 zu induzieren wie 10 μ g/ml LPS. Außerdem haben β -1,3-D-Glucane eine antitumoröse und antimikrobielle Wirkung. Die antitumoröse Wirkung steht im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Zytokinfreisetzung, denn TNF- α hat eine direkte Apoptosewirkung auf Tumore (Ishibashi et al., 2001). Die Glucane Lentinan und Sonifilan haben bereits klinisch bewiesene Effekte in der Krebstherapie (Ohno et al., 2001). Dabei ist für Lentinan die Dreifachhelix als Raumstruktur für die antitumoröse Wirkung essentiell (Zhang et al., 2005).

Außerdem können Glucane den Verlauf eines Endotoxinschocks bei Mäusen positiv beeinflussen. Dies wurde anhand der Wechselwirkung zwischen Glucanen und Endotoxinen verschiedener Bakterien (insbesondere *E.coli* und Salmonellen) untersucht. Dazu wurde Mäusen vor einer LPS-Gabe lösliches 1,6- β -1,3-Glucan intramuskulär verabreicht. Das Ergebnis war eine modifizierte Zytokinbildung während des Endotoxinschock, und zwar eine verbesserte Produktion von IL-6 und eine unterdrückte Produktion von TNF- α (Soltys und Quinn, 1999). Engstad et al. (2002) beobachteten einen Einfluss der Löslichkeit von Glucanen auf den Sepsisverlauf. Während die systemische Verabreichung von partikulärem Glucan bei Ratten zu einer zunehmenden Sensitivität für einen Endotoxinschock führte, schützte lösliches Glucan dagegen. Onderdonk et al. (1992) beobachteten, dass mit

Betafectin, ein 1,6-verzweigtes- β -1-3-Glucan mit hoher Affinität zum Glucanrezeptor, behandelte Mäuse während einer Sepsis weniger Bakterien im Blut hatten und beschrieben diesen Effekt als antimikrobielle Eigenschaft der Glucane.

Des Weiteren schafft die β -Glucanstimulation eine Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem, denn der Glucanrezeptor Dectin-1 wirkt als Co-Stimulationsmolekül für T-Zellen (Hauswirth und Sundy, 2004) und für lösliches β -Glucan aus *Candida albicans* wurde eine indirekte Wirkung auf die T-Zellfunktion nachgewiesen (Nakagawa et al., 2003). Außerdem wirken Zymosan und partikuläre Glucane als Aktivatoren des alternativen Komplementweges. Die Freisetzung der zur Phagozytose benötigten lysomalen Enzyme erfolgt in diesem Fall über den Glucanrezeptor (Janusz et al., 1987). Diese Freisetzung kann durch lösliche Glucane gehemmt werden (Czop und Austen, 1985a). Die Glucanwirkung ist dosisabhängig. Pelizon et al. (2005) verabreichten weiblichen Mäusen 20 oder 100 μg pro Tier β -Glucan aus *Saccharomyces cerevisiae* intraperitoneal. Sie beobachteten eine signifikant erhöhte Aktivität der Peritonealmakrophagen gegen *P. brasiliensis* bei den mit 20 μg pro Tier glucanvorbehandelten Mäusen gegenüber der Kontrollgruppe (unbehandelte Tiere). Die Dosis von 100 μg pro Tier dagegen führte zu einer signifikanten höheren Produktion von TNF- α nach Stimulation mit *St. aureus*. Allgemein war die niedrigere Dosis effektiver in der Stimulation der NK-Zellen und der antifungalen Aktivität, während die höhere Dosis die Zytokinproduktion steigerte.

Olson et al. (1996) stellten in einer Zellkultur mit Alveolarmakrophagen ebenfalls eine Veränderung der TNF- α -Produktion in Abhängigkeit von der Glucankonzentration fest. Die höchste Freisetzung war bei 100 bis 200 μg Glucan aus Bäckerhefe pro ml Zellkulturflüssigkeit nachweisbar. Konzentrationen über 500 μg pro ml führten zu einer Suppression der TNF- α -Aktivität. 1000 μg pro ml führten zu einer Aktivität, die unter der unspezifischen Stimulation lag. Sie vermuteten, dass das unphagozytierte β -Glucan die Zytokine bindet und diese dadurch im Zytokinassay nicht mehr nachweisbar sind.

2.2.3 Die Glucanrezeptoren

Die Wirkung der Glucane auf das Immunsystem verläuft rezeptorvermittelt (Mueller et al., 2000). Daran sind folgende Rezeptoren beteiligt (Willment et al., 2001):

1. Dectin-1
2. Toll-like Rezeptor 2
3. Komplement-Rezeptor 3
4. Lactosylceramid
5. Scavenger Rezeptor

Eine Übersicht über den schematischen Aufbau und die Funktion dieser Rezeptoren zeigt Abbildung 3. Sie gehören zu den Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) und können somit Pathogene direkt erkennen und damit interagieren (Sato et al., 2006). Glucane können mit einem oder mehreren Rezeptoren interagieren. Allerdings interagieren einige β -Glucane selektiv mit einem Rezeptor, z.B. Scleroglucan und Laminarin, andere nicht-selektiv, z.B. Schizophyllan (Mueller et al., 2000). Dabei kann die Interaktion mit mehreren Rezeptoren zum Triggern der Reaktion führen. Des Weiteren reagieren die Glucanrezeptoren auf unterschiedliche Glucankonzentrationen im Blut, wobei Dectin-1 die höchste Affinität hat (Rice et al., 2004). Der kleinstmögliche Ligand des Dectin-1-Rezeptors besteht aus sieben

Glucoseeinheiten (Czop und Austen, 1985b). Er besitzt allerdings nicht die Fähigkeit zur Stimulierung des Nuklear Faktors_{κB}. Die Bindung an Glucanrezeptoren ist außerdem abhängig von der Konformation, der Verzweigungsfrequenz, dem Molekulargewicht, der Ladung und der Löslichkeit, wobei die Verzweigungsfrequenz und das Molekulargewicht besonders bedeutsam sind. (Müller et al., 1996).

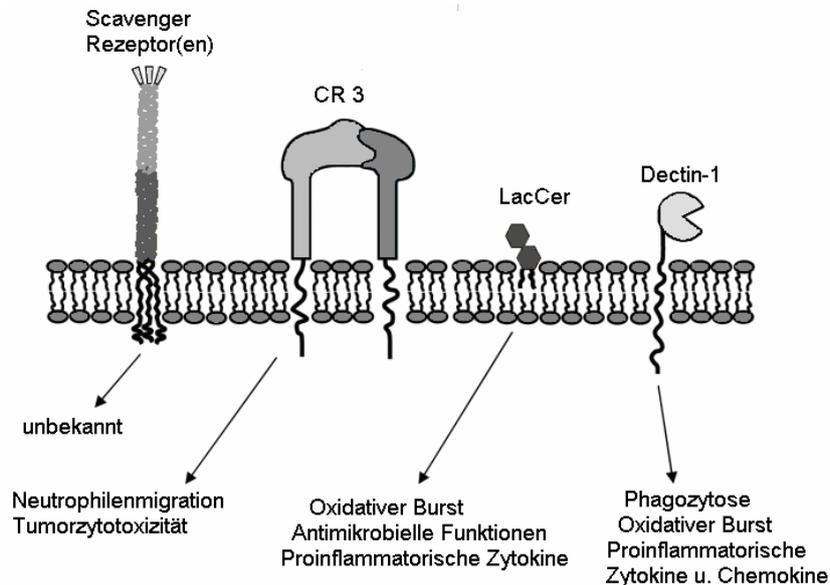


Abbildung 3: Die Glucanrezeptoren Scavenger-Rezeptor, Komplement-Rezeptor 3 (CR3), Lactosylceramind (LacCer) und Dectin-1 und ihre Funktionen (nach Brown und Gordon, 2005)

Dectin-1 wird als Hauptrezeptor für die β -1-3-D-Glucane beschrieben, allerdings ist an der zellulären Glucanerkennung stets eine Kombination der oben genannten Rezeptoren beteiligt. Dectin-1 ist an der zellulären Immunantwort gegenüber β -Glucanen beteiligt und erkennt sowohl lösliche als auch partikuläre Glucane (Brown et al., 2002; Willment et al., 2003; Brown und Gordon, 2005). Es handelt es sich dabei um ein Transmembranprotein mit einer extrazellulären Erkennungsdomäne für Carbohydrate, das beim Menschen in zwei Hauptisoformen (A und B) existiert. Er kommt schwerpunktmäßig auf Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen und eosinophilen und neutrophilen Granulozyten vor (Willment et al., 2005) und wird in geringem Maße auf einigen T-Zellsubpopulationen exprimiert (Lull et al., 2005). Seine Expression kann durch Zytokine und mikrobielle Produkte beeinflusst werden. So wird die Expression durch IL-4 und IL-13 erhöht, IL-10, LPS sowie Dexamethason führen dagegen zur Down-Regulation der Expression (Willment et al., 2003). Neben Glucanen erkennt der Rezeptor auch intakte Pilzpartikel (Brown und Gordon, 2005).

Der Toll-like Rezeptor 2 (TLR-2) ist ein Typ2-Membranprotein und vermittelt zusammen mit Dectin-1 die Zytokinproduktion nach Glucankontakt. Dabei fungiert das TLR-assoziierte Adaptormolekül MyD88 bei linearen β -1,3-Glucane als essentielle Komponente (Roeder et al., 2004). Außerdem hat der TLR-Rezeptor eine Beziehung zum Scavenger-Rezeptor. Des Weiteren besteht über einen TLR-spezifischen Signalweg eine Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem (Gantner et al., 2003; Frasnelli et al., 2005).

Denn allgemein gehören die TLRs zu den Typ-1-Transmembranrezeptoren und umfassen eine Familie mit 11 verschiedenen TLRs, die für die Erkennung pathogener Mikroorganismen und die Aktivierung der angeborenen Immunantwort entscheidend sind (Netea et al., 2004). Insbesondere ist die epitheliale Expression von TLR-Rezeptoren wichtig für die Immunabwehr von Inhalationspathogenen (Sha et al., 2004).

Der Komplement-Rezeptor 3 dient als Phagozytoserezeptor für eine Vielzahl opsonierter und unopsonierter Pathogene, u.a. für β -Glucane. Über ihn besteht eine Verbindung zum Komplementsystem. Er wird in hohem Maße auf neutrophilen Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen exprimiert (Akramiene et al., 2007). Die Glucanerkennung läuft über die Lectindomäne dieses Rezeptors (Brown und Gordon, 2005).

Lactosylceramid ist das Hauptsphingolipid der neutrophilen Granulozyten. Es kommt außerdem auf Alveolarepithelzellen vor und erfüllt dort die Funktion des Komplement - Rezeptors 3 (Hahn et al., 2003). Die Bindung von Betafectin an diesen Rezeptor kann durch β -Glucane mit hohem Molekulargewicht gehemmt werden, nicht jedoch durch β -Glucane mit niedrigem Molekulargewicht (Zimmermann et al., 1998). Es wird vermutet, dass die Interaktion von β -Glucanen mit diesem Rezeptor zur Induktion des macrophage inflammatory protein-2 und zur Aktivierung des Nuklear Faktors_{κB} führt. Des Weiteren ist dieser Rezeptor an der Verstärkung der antimikrobiellen Funktion der neutrophilen Granulozyten beteiligt. Der genaue Mechanismus dieser Aktivitäten ist aber noch unbekannt (Akramiene et al., 2007).

Der Scavenger-Rezeptor ist ein multifunktionales, integrales, nicht-glucanspezifisches Membranprotein und dient der Bindung und Endozytose von Polyanionen, wie Glucanphosphat und Glucansulfat (Sorensen et al., 1998a). Außerdem dient er der Bindung löslicher Glucane. Der Scavenger-Rezeptor ist somit nicht glucanspezifisch, sondern bindet Glucane in Abhängigkeit von ihrer Ladung (Brown und Gordon, 2005).

2.2.4 Möglichkeiten der Beeinflussung der Wirkung von Glucanen

Die Wirkung der Glucane auf das Immunsystem ist eng mit ihrer Struktur verbunden. Deshalb besteht durch Strukturänderungen die Möglichkeit der Wirkungsbeeinflussung. Eine Möglichkeit ist die Behandlung mit Natriumhydroxid (NaOH). Dadurch kann eine Dreifachhelix in eine Einfachhelix überführt werden. Diese Veränderung führt zu einer Verbesserung der Löslichkeit und beeinflusst die Zytokinfreisetzung durch Glucane und deren Antitumoraktivität. Falch et al (2000) fanden, dass die Behandlung mit NaOH bei Scleroglucan die Fähigkeit zur Induktion von TNF- α reduziert. Diese Beeinflussung durch NaOH ist nicht bei allen Glucanen gleich stark ausgeprägt. Zum Beispiel kann die Antitumoraktivität von Curdlan durch NaOH-Behandlung erhöht werden, während die Antitumoraktivität von Schizophyllan durch NaOH-Behandlung nicht beeinflusst wird (Saito et al., 1991).

Neben der immunopharmakologischen Aktivität ist auch die Aktivierung des Limulusfaktors G abhängig von der Raumstruktur. Auch hier führt die Einfachhelix zu einer höheren Aktivierung (Saito et al., 1991; Hirata et al., 1998). Diese Wirkungsbeeinflussungen sind nicht nur bei verzweigten β -Glucanen möglich.

Eine andere Möglichkeit der Wirkungsbeeinflussung stellt die Behandlung mit Glucanasen dar. Hier bietet sich insbesondere die Zymolase, eine 1-3- β -Glucanase, an. Sie führt

ebenfalls zur Überführung der Dreifachhelix in eine Einfachhelix ohne selbst das Immunsystem zu aktivieren (Kataoka et al., 2002).

Außerdem beeinflussen sich die Glucane gegenseitig in ihrer Wirkung. Dies liegt u.a. an der unterschiedlichen Affinität zum Glucanrezeptor. Laminarin z.B. weist eine gute Rezeptorbindung auf, allerdings ist der stimulierende Effekt aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes sehr gering. Deshalb hat Laminarin in löslicher Form einen stark hemmenden Effekt auf die Erkennung von Zymosan (Brown et al., 2002). Laminarinoligosaccharide hemmen den stimulierenden Einfluss von Curdlan auf den Nuklear Faktor_{κB} (Kataoka et al., 2002). Des Weiteren blockiert Laminarin komplett die Erkennung von *Candida albicans* durch Dectin-1. Physiologischerweise erkennt Dectin-1 *Candida albicans* über die so genannten Glucannarben, die während der Knospung entstehen (Gantner et al., 2005).

2.2.5 Wechselwirkung von Glucanen mit anderen entzündungsauslösenden Stoffen

Glucane kommen in Bioaerosolen vor und es ist bekannt, dass sie an der Entstehung, von verschiedenen durch Bioaerosole ausgelösten respiratorischen Erkrankungen beteiligt sind (Rylander et al., 1992; Hoppenheidt, 2002). Weitere entzündungsauslösende Bioaerosolbestandteile sind u.a. Endotoxine und Tannine. Endotoxine und Glucane entfalten ihre entzündungsauslösende Wirkung im Respirationstrakt durch Aktivierung der Alveolarmakrophagen. Diese Tatsache ist der Ansatzpunkt einer potentiell synergistischen Wirkung von Endotoxinen und Glucanen in Bioaerosolen (Rylander und Fogelmark, 1994). So führte z.B. die experimentelle Exposition eines Aerosols aus Endotoxinen (Endotoxin aus *E. coli* in der Konzentration 10µg pro ml) und β-Glucanen (Curdlan in der Konzentration 100 µg pro ml) bei Meerschweinchen zu einer deutlichen Zunahme der Entzündungszellen im Respirationstrakt, während ein Aerosol, das nur Endotoxine oder Curdlan enthielt nur zu einer geringen Zunahme dieser Zellen führte (Fogelmark et al., 1994). Dazu fand Williams (1997), dass die Beteiligung von Glucanen an der Entstehung von Entzündungen nach Inhalation von organischem Staub hauptsächlich in der Potenzierung der Immunantwort auf andere Substanzen, insbesondere Endotoxine, liegt.

Neben dieser synergistischen Wirkung ist eine antimikrobielle Wirkung der Glucane durch Beeinflussung der Zytokinausschüttung bei Endotoxinapplikation nach vorangegangener Applikation von Glucanen (10 bis 100 µg Betafectin pro Maus) beschrieben (Onderdonk et al., 1992). Dies ist dadurch zu erklären, dass das verabreichte Glucan zu einer Erhöhung der Monozyten- und Granulozytenanzahl führt und außerdem diese Zellen auf die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine vorbereitet sind. Insgesamt führt dies zu einer effektiveren Phagozytose.

Allerdings fanden Hoffman et al. (1993), dass dieser Effekt auf die Zytokinausschüttung abhängig von der Glucandosis ist. Denn über 500 µg Glucan aus Bäckerhefe pro ml Zellkulturflüssigkeit hemmen die TNF-α-Sekretion durch LPS, während niedrigere Konzentrationen Glucan aus Bäckerhefe sie stimulieren. Die Hemmung beruht dabei nicht auf einem toxischen Effekt der Glucane.

2.2.6 Durch Glucane ausgelöste Erkrankungen

Glucane sind als Bioaerosolbestandteil an der Entstehung verschiedener, schwerpunktmäßig respiratorischer Erkrankungen beteiligt. Ihre Bedeutung für die einzelnen Erkrankungsformen ist unterschiedlich. Häufig beschrieben ist der Glucannachweis in Wohn- und Büroräumen (s. Tabelle 1), die einen typischen schimmlichen Geruch aufweisen (Rylander et al., 1998; Thorn und Rylander, 1998; Wan und Li, 1999; Douwes et al., 2000c). Hier wird eine Beteiligung von Glucanen bei der Auslösung des „sick building syndrom“ vermutet (Rylander et al., 1992; Odabasi et al., 2004). Dabei ist für die Beurteilung der Dosis-Wirkungsbeziehung wichtig, dass Glucane ihre Toxizität auch noch nach dem Absterben des Mikroorganismus behalten (Fogelmark und Rylander, 1997). Im Gegensatz zum gesamten Schimmelpilz haben Glucane jedoch keine allergieauslösende Potenz (Douwes, 2005). Allerdings konnte im Mausinhalationsversuch nachgewiesen werden, dass luftgetragene β -1,3-D-Glucane die Down-Regulation der IgE-allergenspezifischen Antwort, die physiologischerweise bei Nichtallergikern vorkommt, aufheben können. Weiterhin wurde festgestellt, dass es durch die Freisetzung von IL-6 und IL-10 aus den Alveolarmakrophagen zu einer Th-2-dominierten Immunantwort kommt. Dies entspricht der Immunantwort von Allergikern auf Umweltallergene (Wan und Li, 1999). Außerdem konnte in verschiedenen epidemiologischen Studien und experimentellen Belastungsversuchen eine positive Korrelation zwischen der Exposition mit β -1,3-D-Glucanen und Entzündungserscheinungen im Respirationstrakt sowie veränderten Lungenfunktionsparametern festgestellt werden (Thorn et al., 1998). Dabei führte eine akute Glucanexposition zu einer verminderten Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Respirationstrakt während eine subchronische Exposition die Anzahl der eosinophilen Granulozyten erhöhte. Damit unterscheidet sich die Immunantwort auf Glucane deutlich von der neutrophil dominierten Entzündungsreaktion als Antwort auf Endotoxine (Thorn et al., 2001). Singh (2005) fand heraus, dass die Exposition von Glucanen zu einem Rückgang der Alveolarmakrophagen führt. Respiratorische Symptome nach Glucanexposition sind ab Konzentrationen von 10 ng pro m^3 beschrieben (Rylander, 1996). Auf landwirtschaftlichen Betrieben wurden in organischen Stäuben Glucankonzentrationen von $0,82$ bis zu $4,34 \text{ } \mu\text{g pro m}^3$ (Tabelle 1) mittels des Inhibition Enzyme Immunoassay (IEIA) ermittelt (Douwes et al., 1996; Eduard et al., 2001).

Rylander et al. (1999b) untersuchten Arbeiter in der Papierindustrie mit Atemwegsproblemen. Bei der Papierherstellung sind die Arbeiter organischem Staub ausgesetzt, der u.a. Endotoxine und β -Glucane enthält. Sie stellten einen Zusammenhang zwischen der Exposition von Endotoxinen und β -Glucanen und den Atemwegsbeschwerden fest. Es kam u.a. zum Anstieg des eosinophilen kationischen Proteins. Eine Trennung der Wirkung von Endotoxinen und β -Glucanen war nicht möglich, da die Inhalation beider Stoffe gleichzeitig stattfand. Ähnliche Ergebnisse fanden Douwes et al. (2000a). Sie stellten fest, dass die arbeitsbedingte Exposition gegenüber Kompostaerosolen zu akuten und chronischen entzündlichen Reaktionen der oberen Atemwege führen kann. Als Entzündungszellen dominierten die neutrophilen Granulozyten und als auslösendes Agens wurden Endotoxine und β -Glucane nachgewiesen. Aus Inhalationsversuchen ist jedoch bekannt, dass β -Glucane im Gegensatz zu Endotoxinen nicht zu einer neutrophilen Entzündung führen. Sie führen bei subchronischer Exposition zur Zunahme der eosinophilen Granulozyten in der Trachea. Der zugrunde liegende Pathomechanismus ist die Migration von eosinophilen Granulozyten aus dem Blut, daran beteiligt sind Makrophagen und CD4^+ T-

Lymphozyten (Sjostrand und Rylander, 1997). Im Blut dagegen bewirken sie eine Abnahme der eosinophilen Granulozyten und der Produktion von TNF- α . Allerdings können die β -Glucane die entzündliche Wirkung der Endotoxine verstärken (Thorn et al., 2001). Damit wird klar, dass β -1,3-D-Glucane eine wichtige Rolle bei Bioaerosolbelastungen spielen, insbesondere durch ihre Wechselwirkung mit Endotoxinen. Die genaue Wirkungsweise ist jedoch noch unbekannt.

Tabelle 1: Glucangehalte in verschiedenen Arbeits- und Lebensbereichen

Messort	Glucangehalt	Nachweisverfahren	Quelle
Kompostindustrie	0,54-4,85 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	IEIA	Douwes et al. (2000b)
Landwirtschaft	0,82 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	IEIA	Eduard et al. (2001)
Abfallverarbeitung	0,2 – 19 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	IEIA	Douwes et al. (1996)
Schweinehaltung	4,34 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	IEIA	Douwes et al. (1996)
Papierindustrie	2,0 – 97 ng/m^3	IEIA	Rylander et al. (1999b)
Ruderhäuser	0 – 19 ng/m^3	LAL	Thorn und Rylander (1998)
Sägewerk	0,14- 4,33 ng/m^3	LAL	Mandryk et al. (1999)
Schulen mit Atemwegsproblemen	15,3 ng/m^3	LAL	Rylander et al. (1998)
Schulen ohne Atemwegsprobleme	2,9 ng/m^3	LAL	Rylander et al. (1998)
Innenräume (Schimmelpilz belastet)	3,7 ng/m^3	LAL	Wan und Li, 1999
Wohnungen	126 – 169 ng/m^3	IEIA	Douwes et al., (2000c)

IEIA = Inhibition Enzyme Immunoassay

LAL = glucanspezifischer LAL-Test

2.2.7 Nachweismethoden für Glucane

2.2.7.1 Inhibition Enzyme Immunoassay (IEIA)

Douwes et al. (1996) beschrieben einen Inhibition Enzyme Immunoassay zur Quantifizierung von β -1,3-D-Glucanen in Bioaerosolproben. Dazu werden die Glucane mittels Wassers mit einem milden Detergenz aus den Staubproben extrahiert und anschließend bei 120°C autoklaviert. Bei dem dann folgenden Immunoassay diente Laminarin als Standardglucan. Die Antikörper stammen von Kaninchen, die mit Laminarin immunisiert wurden. Die Inhibitionskurve für Laminarin reicht von 40 bis 3.000 ng/ml . Curdlan, z.B. zeigt eine Reaktion zwischen 200 und 10.000 ng/ml . Dies ist jeweils der Bereich von 15 bis 85% Inhibition.

Diese Nachweismethode ist nicht spezifisch für β -1,3-Glucane, sondern zeigt auch Kreuzreaktionen mit β -1,6-Glucanen. Inwieweit die Reaktivität verschiedener Glucane im ELISA deren entzündungsauslösendes Potential für Säuger charakterisiert ist nicht bekannt.

2.2.7.2 Glucanspezifischer Limulus-Amöbozyt-Lysat (LAL)-Test

Dieses Testsystem beruht auf der Eigenschaft der Amöbozyten von *Limulus polyphemus* (Pfeilschwanzkrebs) bei Kontakt mit Endotoxinen und Glucanen zu koagulieren. Dies geschieht durch Aktivierung einer Enzymkaskade (Abbildung 4), an deren Ende die Koagulation der Hämolymphe steht. Den Herstellern kommerzieller Testkits ist es gelungen, die Hämolymphe von *Limulus polyphemus* zu isolieren, so dass der Test im „Reagenzglas“ durchgeführt werden kann.

Endotoxine und Glucane aktivieren die oben genannte Enzymkaskade über verschiedene Einstiegswege. Endotoxine führen zur Aktivierung des Faktors C und Glucane zur Aktivierung des Faktors G. In dem glucanspezifischen LAL-Test wurde der Faktor C entfernt, so dass nur noch eine Aktivierung der Enzymkaskade über Glucane stattfindet. Die Enzymkaskade (s. Abbildung 4) ist in dem Testkit mit einer Farbbildungsreaktion gekoppelt. Dadurch ist eine Aussage über die Glucankonzentration in der Probe möglich (Hoppenheidt, 2002). Dieses Testverfahren ist mit einer Nachweisgrenze von 1-10 pg pro ml sehr sensitiv für lineare und verzweigte β -Glucane und damit deutlich sensitiver als der IEIA (Thorne et al., 2004). Der glucanspezifische LAL-Test ist dafür weniger spezifisch, da auch andere Glucanarten und Polysaccharide, allerdings erst in höheren Konzentrationen (μg -Bereich) erkannt werden (Douwes et al., 1996; Odabasi et al., 2004). Allerdings führen lineare β -1,3-D-Glucane zu einer stärkeren Aktivierung des Faktors G als verzweigte Glucane. Muta et al. (1995) fanden, dass eine Aktivierung des Faktors G bei Glucankonzentrationen zwischen 3×10^{-5} und 4×10^{-9} g/ml zu erwarten ist. Dabei hängt die zur Aktivierung notwendige Konzentration von der Kettenlänge und der Konformation der Glucanstruktur ab. Glucane in der Dreifachhelix führen zur schlechtesten Aktivierung des Faktors G (Thorne et al., 2004). Ein niedriges Molekulargewicht führt ebenfalls zu einer geringen Aktivierung des Faktors G (Ohno et al., 1990; Saito et al., 1991). Inwieweit der glucanspezifische LAL-Test aber die entzündungsauslösende Potenz verschiedener Glucane für Säugetiere widerspiegelt ist unbekannt. Aus verschiedenen Untersuchungen zur endotoxinbedingten Koagulation der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses ist bekannt, dass diese die entzündungsauslösende Wirkung von Endotoxinen unterschiedlicher bakterieller Herkunft für Säuger nur sehr eingeschränkt beschreibt (Fennrich et al., 1998; Zucker et al., 2005).

Eine Voraussetzung zur Erkennung der β -Glucane durch den Faktor G ist, dass sie in wasserlöslicher Form vorliegen. Deshalb ist vor der Testdurchführung eine Überführung der β -Glucane in eine wasserlösliche Form notwendig. Zur Überführung von in Bioaerosolproben vorkommenden β -Glucanen in die wasserlösliche Form werden das Autoklavieren und die Behandlung mit NaOH in verschiedenen Protokollen beschrieben. Gemeinsames Ziel ist es jeweils die Dreifachhelixstruktur aufzubrechen und die Glucane durch Überführung in die Einfachhelix- oder willkürliche Spiralanordnung wasserlöslich zu machen. Das Autoklavieren erfolgte bei 121°C für 15 bis 90 min. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand zur Weiterverarbeitung genutzt (Rylander et al., 1992; Douwes et al., 1996; Chew et al., 2001; Milton et al., 2001; Würtz et al., 2005).

Saito et al. (1991) fanden eine 100fach höhere Fähigkeit zur Aktivierung des Faktors G durch Glucane nach Behandlung mit NaOH. Bei der Aufbereitung mit NaOH schwanken die Angaben der Arbeitskonzentration in verschiedenen Literaturangaben von 0,05 N NaOH bis zu 0,3 N NaOH. Nach der NaOH-Behandlung wurden die Proben geschüttelt und

weiterverarbeitet (Rylander, 1996; Foto et al., 2004). Douwes et al. (1996) beschrieben vor der Weiterverarbeitung noch zusätzlich die Zentrifugation des Überstandes.

Die Effizienz der einzelnen Aufbereitungsmethoden für Glucane ist unbekannt (Douwes, 2005). Ebenfalls unbekannt ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Glucanbestimmung mittels glucanspezifischen LAL-Test und IEIA nach Douwes et al., 1996 (Thorne et al., 2004).

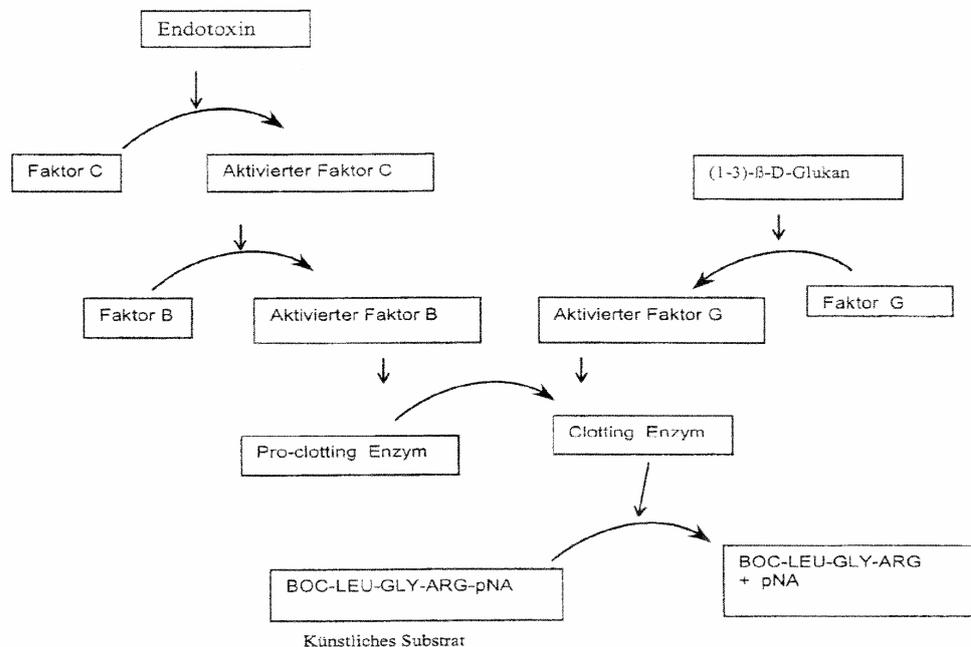


Abbildung 4: Schematische Darstellung des LAL-Test (nach Gebrauchsinformation GlucateLL, Pyroquant Diagnostik GmbH)

2.2.7.3 Enzyme Immunoassay für 1,6-verzweigte- β -1,3-Glucane

Milton et al. (2001) beschrieben einen Enzyme Immunoassay, der zur Quantifizierung von 1,6-verzweigten- β -1,3-Glucanen geeignet ist. Dieser beruht auf der Verwendung des Rezeptors Galactosylceramid mit einer hohen Affinität zu β -1,3-D-Glucanen als Coating Antikörper und von monoclonalen Antikörpern, die spezifisch für β -1,3-D-Glucane aus Pilzzellwänden sind, als Tracer-Antikörper. Dieser Test ist spezifisch für 1,6-verzweigte-1,3- β -Glucane, so dass er lineare Glucane, wie z.B. Curdlan, nicht erkennt. Glucan aus Bäckerhefe erkennt er bei einer Konzentration von 0,8 ng pro ml und ist damit deutlich sensibler als der durch Douwes et al. (1996) beschriebene Inhibition Enzyme Immunoassay, der ein Detektionslimit von 40 ng pro ml aufweist.

2.2.7.4 Nachweis mit Hilfe von Dectin-1

Graham et al. (2006) nutzten den Hauptglucanrezeptor Dectin-1 zum Nachweis von β -Glucanen. Dieser Test beruht auf einem ELISA-Verfahren und verwendet Dectin-1 sowohl als Coating- als auch als Tracer-Antikörper. Der Test erkennt lösliche und unlösliche β -Glucane. Des Weiteren gibt es Affinitätsunterschiede zwischen β -Glucanen mit und ohne

1,6-Bindungen. Im Vergleich zum Glucateil-Test weist dieser Test eine deutlich geringere Sensitivität auf.

2.3 Schimmelpilze

2.3.1 Einteilung und Aufbau der Schimmelpilze

Unter Schimmelpilzen versteht man Fadenpilze aus den Abteilungen Ascomycota, Zygomycota und Deuteromycota, die folgende gemeinsame ökologische und kulturmorphologische Eigenschaften aufweisen:

1. Boden oder konzentrierte Nährlösungen als Lebensraum
2. Saprophytische Lebensweise
3. Bildung eines typischen Myzels
4. Überwiegende Vermehrung durch ungeschlechtliche Sporen (Sporangiosporen oder Konidien)
5. Bei Bildung sexueller Fortpflanzungsorgane sind diese sehr klein (Roth et al., 1990).

Schimmelpilze bestehen aus Pilzfäden (Hyphen), die das Myzel bilden. Aus dem Myzel wachsen die Sporenträger mit den arttypischen Sporen. Diese sind asexuelle Verbreitungsorgane und oft gefärbt, wodurch die Schimmelpilze mit bloßem Auge sichtbar sind. Die Hyphen sind farblos, dadurch ist diese Wachstumsphase makroskopisch schwer erkennbar. Die Größe der Pilzsporen liegt bis auf wenige Ausnahmen zwischen 3 und 20µm, meistens sogar unter 10 µm (Anonym, 2002).

Schimmelpilzzellen sind von einer Zellwand umgeben, die meistens zweischichtig ist. Ihre genaue Zusammensetzung unterscheidet sich in den einzelnen taxonomischen Gruppen. Als Hauptgerüstsubstanzen kommen Glucane und Chitin vor. Diese können mit Proteinen Komplexe bilden.

Wichtige Schimmelpilz-Vertreter aus human- und veterinärmedizinischer Sicht sind u.a.:

- *Aspergillus*

Diese Gattung wird auch Gießkannenschimmel genannt. Er ist einer der häufigsten und wichtigsten Schimmelpilze und kommt hauptsächlich im Erdboden, besonders in warmen und tropischen Zonen vor. Die Vermehrung erfolgt vegetativ durch Bildung von blau-grün bis schwarz gefärbten Konidien. Besonders bedeutsam sind die Spezies *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. versicolor* und *A. terreus*. Sie können Systemykosen auslösen und sind bedeutsame Mykotoxinbildner (Rolle and Mayer, 1993). Des Weiteren ist *A. fumigatus* ein bedeutsamer Auslöser allergischer Lungenerkrankungen (Douwes et al., 2003).

- *Penicillium*

Diese unter dem Namen Pinselschimmel bekannte Gattung ist ein weit verbreiteter Bodenbewohner in den kühleren und gemäßigten Zonen. Die Vermehrung erfolgt ebenfalls durch Konidien, die grün gefärbt sind. Als bedeutende Mykotoxinbildner in dieser Gattung sind *P. verrucosum*, der Ochratoxin A produziert und *P. citrinum*, der Citrinin produziert, zu nennen (Sweeney and Dobson, 1998).

- Mucorales

Diese Familie ist auch als Köpfchenschimmel bekannt und umfasst die Gattungen *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus* und *Rhizomucor*. Im Gegensatz zu den beiden vorherigen Vertretern ist bisher keine Mykotoxinbildung bekannt (Mücke und Lemen, 1999).

- Fusarium

Sie besiedeln als so genannte Ährenpilze Getreide bereits auf dem Feld. Bei unsachgemäßer Getreidelagerung kann es dann zu Mykotoxinbildung, hauptsächlich Trichothecene und Fumonisine (Sweeney and Dobson, 1998), kommen. Das Myzel ist hellgelb bis rosa und bildet so genannte Chlamydosporen als derbwandige Dauerorgane aus.

- weitere Ährenpilze

Außer *Fusarium* gibt es noch weitere Ährenpilze. *Claviceps purpurea*, der Mutterkornpilz, einer der bekanntesten Mykotoxinbildner, gehört ebenfalls zu den Ährenpilzen (Mücke und Lemen, 1999).

- Schwärzepilze

Diese Familie verdankt ihren Namen dem in Myzel und/ oder Konidien eingelagerten Melanin, das zu einer dunklen Färbung führt. Im Sommer werden häufig große Mengen von Sporen abgegeben. Als wichtige Gattungen sind zu nennen: *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* und *Epicoccum*. *Alternaria* und *Cladosporium* besiedeln Pflanzen während des Wachstums, dadurch kommen sie in hoher Konzentration im organischen Staub pflanzenverarbeitender Betriebe vor (Mücke und Lemen, 1999).

2.3.2 Anforderungen der Schimmelpilze an ihren Lebensraum

Schimmelpilze benötigen zur Entwicklung organisches Substrat. Dies kommt in ausreichender Menge in Form von organischem Staub auf fast allen Oberflächen in Tierställen und anderen Gebäuden vor. Außerhalb von Gebäuden ist stets ausreichend organisches Substrat in der Umwelt vorhanden. Sie wachsen in dem weiten Temperaturspektrum von 0°C bis 50°C. *Cladosporium* kann sogar bereits bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt wachsen. Die mesophilen Arten, zu denen die meisten Schimmelpilze gehören, haben ein Temperaturoptimum von 25°C bis 35°C. Die wichtigste Gattung der mesophilen Schimmelpilze ist *Penicillium*. Während die *Aspergillus*arten, als weitere wichtige Gattung zu den thermophilen Schimmelpilzen gehören.

Das Minimum der Wasseraktivität (a_w -Wert), darunter versteht man den frei verfügbaren Anteil des Wassers, liegt bei 0,80 bis 0,85. Der ebenfalls bedeutsame Schimmelpilz *Stachybotrys chartarum* braucht einen minimalen a_w -Wert von 0,94. Er tritt deshalb typischerweise in Gebäuden nach Wasserschäden auf.

Der in der Atmosphäre befindliche Sauerstoffgehalt ist in Regel zur Entwicklung ausreichend (Egert, 1999). Somit wirken sich in der Innenraumluft hauptsächlich Feuchtigkeit, Nährstoffangebot und Temperatur als wachstumsbestimmend aus. Daher ist die Entwicklung von Schimmelpilzen in der direkten Umgebung von Menschen und Tieren problemlos möglich. Ihre Konzentration in der Außenluft, d.h. vor allem der Übergang von verschiedenen Quellen in den luftgetragenen Zustand, ist abhängig von Ort, Klima, Tages- und Jahreszeit und unterliegt großen Schwankungen. Im Sommer kann die Konzentration der kultivierbaren Sporen in der Außenluft über 2000 KBE/m³ liegen. Während dieser Zeit stellt die Außenluft

eine Hauptquelle für Pilze in der Innenraumlufte in unbelasteten (keine Feuchtigkeitsschäden) Wohn- und Bürogebäuden dar. Im Winter dagegen kann die Konzentration luftgetragener Sporen unter 100 KBE/m³ liegen (Koch et al., 2000). Außerdem ist im Winter die Konzentration der Pilzsporen in der Innenraumlufte häufig höher als in der Außenluft (Vujanovic et al., 2001).

2.3.3 Vorkommen von luftgetragenen Schimmelpilzen

Der Hauptanteil luftgetragener Schimmelpilze in der Außenluft wird von Cladosporium, Penicillium, Alternaria und Aspergillus gestellt (Cooley et al., 1998). Ihr Anteil beträgt in ländlichen Bereichen 71 – 85% (Adhikari et al., 2004). Besonders hohe Außenluftkonzentrationen erreichen Cladosporiumsporen während der Sommermonate.

Aufgrund der geringen Größe der Schimmelpilzsporen (2-100 µm, meist kleiner 10 µm) und ihres geringen Gewichtes ist eine rasche und weiträumige Ausbreitung möglich. Dadurch können Schimmelpilzsporen, die ubiquitär in der Außenluft vorkommen, auch in Wohnräume und Tierställe gelangen. Ihre geringe Größe führt dazu, dass die Sporen teils lungen- und alveolengängig sind. Dies gilt insbesondere für thermotolerante und thermophile Schimmelpilze, z.B. einige Aspergillusarten (Clarke und Madelin, 1987). Dabei gibt es für unterschiedliche landwirtschaftliche Produktions- und Arbeitsbereiche typische Schimmelpilzarten. So konnte ein häufiges Vorkommen von *A. candidus* in Lagergetreide, *A. flavus* in Geflügelzuchten und *Scopulariopsis brevicaulis* in Schweineställen nachgewiesen werden (Fischer et al., 2005).

Neben der Jahreszeit ist auch die Umgebung (Tabelle 2) von großer Bedeutung für eine Schimmelpilzbelastung. In Dörfern liegt aufgrund der landwirtschaftlichen Aktivität die Pilzbelastung der Außenluft über dem zweifachen Wert der korrespondierenden Pilzbelastung in Vororten (Dott et al., 2004). Erhöhte Schimmelpilzkonzentration im Vergleich zur Außenluft findet man außer in Tierställen auch häufig in der Holzwirtschaft und in der Abfallverarbeitung (Anonym, 2004).

Tabelle 2: Schimmelpilzkonzentrationen in verschiedenen Umgebungen

Messort	Schimmelpilzkonzentration in der Luft	Quelle
Außenluft	$5,4 \times 10^2$ KBE/m ³	Revankar (2003)
Außenluft	$3,6 \times 10^2$ KBE/m ³	Macher et al. (1991)
Holzpanelfabrik	$2,3 \times 10^1$ KBE/m ³	Lugauskas et al. (2004)
Getreidemühle	$1,7 \times 10^4$ KBE/m ³	Lugauskas et al. (2004)
Geflügelställe	$1,0 \times 10^4$ KBE/m ³	Seedorf et al. (1998)
Legehennenställe	$7,3 \times 10^2$ KBE/m ³	Schütze (2002)
Legehennenställe	$5,0 \times 10^2$ KBE/m ³	Clark et al. (1983)
Müllrecyclinganlage	$1,7 \times 10^5$ KBE/m ³	Hedal et al. (2003)
Rinderställe	$0,5 \times 10^3$ bis $7,0 \times 10^5$ KBE/m ³	Beck et al. (2007)
Rinderställe	$1,9 \times 10^2$ bis $7,5 \times 10^3$ KBE/m ³	Schütze (2002)
Rinderställe	$1,0 \times 10^3$ bis $1,0 \times 10^5$ KBE/m ³	Pasanen et al. (1989)
Rinderställe	$6,3 \times 10^3$ KBE/m ³	Seedorf et al. (1998)
Schafställe	$6,4 \times 10^4$ KBE/m ³	Schütze (2002)
Schweinställe	$2,3 \times 10^2$ bis $5,6 \times 10^2$	Schütze (2002)
Schweinställe	$1,0 \times 10^3$ bis $1,0 \times 10^5$ KBE/m ³	Eduard et al. (2001)
Schweinställe	$5,0 \times 10^3$ KBE/m ³	Seedorf et al. (1998)
Schweinställe	$2,9 \times 10^4$ KBE/m ³	Baekbo (1990)
Pferdeställe (Offenstall)	$1,8 \times 10^3$ KBE/m ³	Nardoni et al. (2005)
Pferdeställe	$3,0 \times 10^3$ KBE/m ³	Nardoni et al. (2005)
Wohngebäude	$1,9 \times 10^2$ KBE/m ³	Gorny und Dutkiewicz (2002)
Zoogeschäft	$4,0 \times 10^2$ KBE/m ³	Jo und Kang (2006)

2.3.4 Erkrankungen durch luftgetragene Schimmelpilze

2.3.4.1 Allgemeine Wirkung der Schimmelpilze

Schimmelpilze können sowohl in lebender als auch in abgestorbener Form zu Erkrankungen führen. Dabei sind die Pilzsporen, die Zellwandbestandteile (z.B. Glucane) und die Mykotoxine medizinisch am bedeutsamsten. Diese Stoffe können durch Materialbewegungen oder Luftströmungen in die Luft gelangen und dadurch zu Bioaerosolbestandteilen werden. Generell können luftgetragene Pilze über vier Wirkungsmöglichkeiten zu Gesundheitsbeeinträchtigungen führen (Fischer und Dott, 2003):

- Infektionen
- Allergien
- toxische Wirkung
- inflammatorische Wirkung.

Infektionen werden durch pathogene und fakultativ pathogene Schimmelpilze ausgelöst. Die Inhalation luftgetragener Schimmelpilzsporen ist für gesunde Personen nicht zwangsläufig schädlich, stellt aber ein potentiell Risiko dar. Insbesondere bei Menschen und Tieren mit Immundefekten können lebende Schimmelpilzsporen zu Infektionen führen. In dieser

Hinsicht besonders problematisch sind thermotolerante Aspergillusarten, welche beispielsweise die Aspergillose der Lunge verursachen. Die anderen Erkrankungen (Allergien, Intoxikationen und entzündliche Reaktionen) können auch durch nicht-pathogene Schimmelpilze ausgelöst werden (Fischer und Dott, 2003). Außerdem kann eine erhöhte Schimmelpilzexposition die Entstehung viraler und bakterieller Erkrankungen fördern (Singh, 2005).

Allergien stellen einen weiteren wichtigen Erkrankungskomplex dar. So sind Schimmelpilze einer der wichtigsten Auslöser von Innenraumallergien beim Menschen (Allergien des Typ I und Typ IV) (Keller et al., 1998). Als häufiger Auslöser einer Typ-1-Allergie beim Menschen sind *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium* und *Cladosporium* beschrieben (Hiipakka und Buffington, 2000). Hauptallergenträger sind dabei die Sporen und selten auch die Myzelteile. Dabei wirken besonders die Proteine und Mannoproteine der Zellwand allergen. Diese zeigen zwischen den einzelnen Pilzen teils hohe Verwandtschaftsgrade, so dass es zu Kreuzreaktionen kommen kann, wie z.B. zwischen *Alternaria* und *Cladosporium*. Dabei erhöht eine längerfristige Exposition der Allergene in hoher Konzentration bei Atopie die Gefahr der Sensibilisierung. Dieser Mechanismus besteht auch bei der Recurrent Airways Obstruction (RAO) der Pferde, an deren Auslösung inhalierte Schimmelpilze mitbeteiligt sind. Pirie et al. (2003) fanden in einem Provokationsversuch an bereits an RAO erkrankten Pferden, dass die Inhalation eines Schimmelpilzextraktes zu Entzündungen in den Atemwegen und zu respiratorischer Dysfunktion führt. An der Symptomatik sind jedoch auch andere Stoffe, z.B: Endotoxine, Glucane und Staubmilben, beteiligt (Ward und Couetil, 2005). Nardoni et al. (2005) berichteten, dass neben hohen umweltbedingten Pilzlasten auch eine hohe Anzahl luftgetragener Partikel zu einer Zunahme der Erkrankungszahl führt. Eine Sensibilisierung gegen Schimmelpilze besteht häufig gegen *Aspergillus fumigatus* und *Alternaria alternata* und umfasst dieselben Pilzproteine, die auch bei Menschen allergische Reaktion hervorrufen (Airaksinen et al., 2005). Wobei *Alternaria* durch Madelin et al.(1991) als dominanteste Spezies in Pferdeställen nachgewiesen werden konnte. *Aspergillus fumigatus* dagegen wurde nur in geringer Menge isoliert.

Weiterhin können Schimmelpilze insbesondere bei Menschen zu nicht-allergischen entzündlichen Erkrankungen führen, wofür vor allem Glucane mit verantwortlich sind (s. auch Punkt 2.2.6).

Die toxische Wirkung der Schimmelpilze beruht hauptsächlich auf der Fähigkeit zur Mykotoxinbildung. Nach inhalativer Exposition sind z.B. folgende Schäden bekannt: Nierenversagen durch Ochratoxin, Schäden des ZNS durch tremogene Mykotoxine und Schäden des oberen Respirationstraktes durch *Stachybotrys chartarum*-Mykotoxine (Fischer und Dott, 2003). Als bedeutsame luftgetragene Schimmelpilze, die zur Mykotoxinbildung fähig sind und regelmäßig in Tierställen nachgewiesen werden können, sind in diesem Zusammenhang *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* zu nennen (Seedorf et al., 1998). Außerdem können Schimmelpilze zusammen mit anderen biogenen Quellen mikrobielle flüchtige organische Verbindungen (MVOC) bilden. Diese stehen ebenfalls im Verdacht an Reizwirkungen, Atemwegserkrankungen und unklaren Innenraumbeschwerden beteiligt zu sein. Bei den MVOCs handelt es sich in Tierställen hauptsächlich um Ketone, Alkohole und Ester. Die in Wohnhäusern häufig nachgewiesenen Terpene sind dagegen von untergeordneter Bedeutung (Beck et al., 2007). Des Weiteren können Schimmelpilze an der Entstehung der toxischen Alveolitis und des Sick-Building-Syndrom beteiligt sein. Das Sick-Building-Syndrom ist gekennzeichnet durch unspezifische Symptome, wie z.B.

Kopfschmerzen, Müdigkeit, Schleimhautreizungen, erhöhte Allergie- und Infektanfälligkeit, die mit dem Aufenthalt in einem bestimmten Gebäude in Zusammenhang stehen (Fennrich et al., 2000). Dies ist nach einer WHO-Schätzung bei 15-20% der Neubauten der Fall (Vujanovic et al., 2001).

2.3.4.2 Wirkungen einzelner Schimmelpilzgattungen und –spezies

Besonders interessant in diesem Zusammenhang sind *Aspergillus* und *Penicillium*, die als ein Mitauslöser der RAO bei Pferden gelten (Rapp et al., 1991). Sie kommen im Heu vor und ihre Sporen sind ein Hauptbestandteil des einatembaren Staubes in Pferdeställen (Webster et al., 1987). Auch beim Menschen haben *Penicillium*-arten eine Bedeutung für die Ätiologie des Asthma bronchiale (Garrett et al., 1998).

Aspergillus fumigatus, das vorherrschende luftgetragene Pilzpathogen der *Aspergillus*-arten (Ibrahim-Granet et al., 2003), kann zu einer Vielzahl von Erkrankungen beim Menschen führen. Bei intaktem Immunsystem führt die Inhalation einiger hundert Sporen pro Tag jedoch nicht zu erkennbaren Erkrankungen (Hohl et al., 2005). Für immunsupprimierte Individuen besteht allerdings eine deutlich höhere Gefahr, an einer systemischen Aspergillose oder Aspergillus-pneumonie zu erkranken. Generell kann die Inhalation von *Aspergillus*-konidien, die aufgrund ihrer geringen Größe (2-3µm Durchmesser) bis in die terminalen Abschnitte des Respirationstraktes gelangen, zu einer IgE-vermittelten Entzündung führen, die zu Obstruktionen in den Bronchien und Asthma führt. Eine weitere Gefahr, insbesondere bei Asthmatikern ist die allergische bronchopulmonale Aspergillose, bei der die Hyphen von *A. fumigatus* saprophytisch im Bronchiallumen wachsen (Kurup et al., 2001). Die erste Verteidigungslinie gegen *A. fumigatus* bilden aufgrund des häufigen inhalativen Eindringens die bronchioalveolären Makrophagen mit nachfolgender Zytokinproduktion, z.B. TNF- α . *Penicillium verrucosum* ist einer der Hauptproduzenten von Ochratoxin A in den kälteren Klimazonen. Es lässt sich in Milchkuhhaltungen und Innenräumen nachweisen. Damit besteht eine potentielle Gefahr der Aufnahme von Ochratoxin A, das im luftgetragenen Staub und den Konidien nachweisbar ist und den damit verbundenen Gesundheitsgefahren, insbesondere durch Inhalation mit weiteren Staubkomponenten (Skaug et al., 2001).

2.3.4.3 Wirkung der Mykotoxine

Weiterhin bedeutsam für durch Schimmelpilze ausgelöste Erkrankungen sind die Mykotoxine. Dabei handelt es sich um niedermolekulare (Molekulargewicht < 1 kDa), toxische Sekundärmetabolite, die vorwiegend von Ascomyceten und Fungi imperfecti gebildet werden, welche auf Lebens- und Futtermitteln wachsen (Weber, 1993). Sie werden meistens in einer Umwelt mit einem hohen a_w -Wert (>0,85) produziert (Revankar, 2003). Die Hauptmykotoxinproduzenten sind *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium* (Bünger et al., 2004). Eine Klassifizierung der Mykotoxine kann nach chemischen (strukturbasierte Klassifikation), biologischen (nach dem produzierenden Pilz) oder toxikologischen Gesichtspunkten erfolgen (Jarvis und Miller, 2005). Die Mykotoxine der Schimmelpilze gehören zu ca. 25 Strukturtypen organischer, meistens aromatischer Verbindungen. Sie sind

überwiegend hitzestabil und unpolar (Dörfler, 1989). Mykotoxine sind fettlöslich und haben daher die Tendenz sich in den Fettfraktionen von Pflanzen und Tieren anzusammeln (Hussein and Brasel, 2001).

Die Aufnahme von Mykotoxinen erfolgt hauptsächlich über kontaminierte Nahrung bzw. kontaminierte Futtermittel. Es ist jedoch auch eine Aufnahme durch Inhalation möglich. Dabei kommen Mykotoxine in lebenden und toten Schimmelpilzsporen und organischem Staub vor (Fischer et al., 2000). Das Risiko dafür ist besonders hoch an Orten, an denen die Luft eine hohe Konzentration Schimmelpilze (ab 10^7 KBE/m³ Luft) enthält, z.B. in der Abfallwirtschaft und in der Landwirtschaft. So konnten in Getreidestäuben und Stäuben aus Tierställen Aflatoxin, Moniliformin, Deoxynivalenol und Ochratoxin A nachgewiesen werden (Dott et al., 2004). Dabei ist zu beachten, dass die toxische Wirkung luftgetragener Mykotoxine nach Inhalation bis zu 40mal stärker ist als bei oraler Exposition (Smoragiewicz et al., 1993). So ist z.B. für Trichothecene ein akut toxischer Effekt in Form des ODTS oder der Lungenmykotoxikose durch inhalative Aufnahme beschrieben (Schenker, 1998). Die Mykotoxine können auch zusammen mit Endotoxinen zur Auslösung des ODTS führen (Tanaka et al., 2002). Über chronische Effekte bei protrahierter Exposition ist wenig bekannt. Allerdings beschrieben Hayes et al. (1984) einen Zusammenhang zwischen der Inhalation von Aflatoxinen und Krebs beim Menschen. Kenntnisse über die Wechselwirkung mit anderen Bioaerosolbestandteilen liegen nicht vor (Bünger et al., 2000b).

Der allgemeine Wirkmechanismus der Mykotoxine beruht auf der Reaktion mit funktionellen und subzellulären Organellen der Zelle. Dadurch kommt es zu Störungen im Kohlenhydrat-, Protein- und Lipidstoffwechsel sowie zu Störungen der mitochondrialen Atmung und der Nukleinsäuresynthese. Dies führt dosisabhängig neben der oben bereits erwähnten Auslösung des ODTS u.a. zu Immunsuppression und zwar schwerpunktmäßig zu einer Unterdrückung der B- und T-Lymphozytenaktivierung, der Immunglobulin- und der Antikörperbildung. In dieser Hinsicht besonders potent sind Trichothecene, T2-Toxin und Deoxynivalenol. Außerdem können Mykotoxine nephro- und hepatotoxisch wirken, insbesondere Ochratoxin A (Corrier, 1991).

2.3.4.4 Reaktionen des Immunsystems auf Schimmelpilzexposition

Das Immunsystem reagiert auf eine Exposition gegenüber Schimmelpilzen mit der Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Yike et al., 2005). Des Weiteren kommt es beim Kontakt mit Schimmelpilzen zur Bildung von IgE- und IgG-Antikörper. Die IgE-Antikörper können bei erneutem Kontakt eine Typ-1-Allergie-Reaktion vermitteln. Allergien des Typ-3 werden dagegen durch IgG vermittelt (Albrecht et al., 2005). IgG wird auch genutzt um eine Schimmelpilzexposition nachzuweisen, allerdings sind durch diesen Nachweis keine Rückschlüsse auf eine allergische Reaktion möglich (Anonym, 2002). Ein besonders bedeutsamer Bestandteil der Immunabwehr gegen inhalativ aufgenommene Schimmelpilze sind die Alveolarmakrophagen. Sie führen während einer Pilzinfektion zur Freisetzung von TNF- α (Hoffman et al., 1993). Daran sind Dectin-1 und TLR-Rezeptoren als wichtigste Rezeptoren beteiligt. Für stationäre Alveolarmakrophagen konnte eine starke Expremierung von Dectin-1 nachgewiesen werden (Steele et al., 2005). Dabei stellen die Glucane als Dectin-1-Liganden Pathogen-Associated Molekular Pattern (PAMPs) für die Erkennung von Pilzen durch das Immunsystem dar (McCann et al., 2005; Luhm et al., 2006).

So wird z.B. *A. fumigatus* anhand des β -Glucananteils in der Zellwand, der aus verzweigten 1,3-1,6- β -Glucanen und linearen 1,3-1,4- β -Glucanen besteht (Hohl et al., 2005) mit Hilfe des Dectin-1-Rezeptors erkannt. Für die antifungale Aktivität neutrophiler Granulozyten gegen Hyphen und Konidien von *A. fumigatus* ist weiterhin TLR4 essentiell (Steele et al., 2005). Außerdem ist an der Erkennung von *A. fumigatus* das TLR-assoziierte Adaptormolekül MyD88 beteiligt (Roeder et al., 2004). Die Erkennung ist jedoch unabhängig von CD14, damit besteht ein Unterschied zur Erkennung von LPS (Mambula et al., 2002).

Neben den Alveolarmakrophagen sind auch andere phagozytäre Zellen an der Pilzabwehr beteiligt. Die pulmonalen dendritischen Zellen können Hyphen und Konidien verdauen und transportieren sie zu den lokalen Lymphknoten. Dort sorgen sie dann für eine Antwort der T-Helferzellen (Romani, 2004).

2.3.5 Nachweis und Beurteilung der Schimmelpilzbelastung

Zur Bewertung des gesundheitlichen Risikos infolge einer aerogenen Schimmelpilzexposition ist es erforderlich die Schimmelpilzkonzentration in der Innenraumluft mit der Schimmelpilzkonzentration in der Außenluft für jede Gattung zu vergleichen. Hierfür werden luftgetragene Schimmelpilze mit spezifischen Luftsammelgeräten gesammelt und anschließend die Konzentration an vermehrungsfähigen Schimmelpilzen mittels Kultivierung auf geeigneten Nährböden bestimmt. Eine Differenz von 100 KBE/m³ kann als Hinweis auf eine Innenraumbelastung gewertet werden. Des Weiteren ist für die Beurteilung der Belastungssituation eine Identifikation der vorkommenden Schimmelpilzarten notwendig (Egert, 1999).

In umweltepidemiologischen Studien konnte noch keine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Schimmelpilzkonzentration in der Luft und gesundheitlichen Auswirkungen ermittelt werden. Somit kann kein Grenzwert angegeben werden ab dem mit einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit durch Schimmelpilze in der Innenraumluft zu rechnen ist. Als Ausnahme sind sehr hohe Schimmelpilzkonzentrationen an stark belasteten Arbeitsplätzen zu sehen (Anonym, 2002). Dies liegt insbesondere daran, dass Schimmelpilze nicht isoliert, sondern mit weiteren potentiell gesundheitsgefährdenden Substanzen, z.B. Endotoxinen, zusammen auftreten. Dies ist insbesondere bei der Anwendung des oben genannten „Erfahrungsrichtwert“ von 100 KBE/m³ zu beachten. Allerdings ist aus diversen Studien eine erhöhte Prävalenz an respiratorischen Symptomen bei Personen bekannt, die einer erhöhten Schimmelpilzkonzentration ausgesetzt sind. In diesem Zusammenhang konnten Eduard et al. (2001) bei Landwirten eine zunehmende Häufigkeit von Krankheitssymptomen im Respirationstrakt während der Arbeit ab $2 - 50 \times 10^4$ Pilzsporen/m³ feststellen. Des Weiteren gibt es bei Kindern, die in feuchten und schimmeligen Wohnungen leben eine erhöhte Prävalenz für Atemwegssymptome im Vergleich mit Kindern aus unbelasteten Wohnungen (Platt et al., 1989).

Neben diesen kulturellen Nachweismethoden besteht auch die Möglichkeit eine Schimmelpilzbelastung anhand von verschiedenen Biomarken zu quantifizieren. Als quantitativer Marker für Pilzbiomasse können die extrazellulären Polysaccharide, insbesondere der Aspergillus- und Penicilliumarten, sowie Ergosterol gemessen werden. Des Weiteren können β -Glucane als Marker für Schimmelpilzbiomasse dienen (Rylander und Lin, 2000; Beijer et al., 2003), diese Methode ist jedoch weniger spezifisch (Wouters et

al., 2006). Eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung von Schimmelpilzbelastungen stellt die Messung der mikrobiellen flüchtigen organischen Verbindungen (MVOC) dar. Dabei gelten Werte ab 50 ng/m^3 als verdächtig, wenn die Werte in der Außenluft unter 10 ng/m^3 liegen. Diese nicht auf einer Kultivierung basierenden Verfahren ermöglichen bisher jedoch keine Abschätzung einer potentiellen Gesundheitsgefährdung, dazu ist ebenfalls eine ausführliche mykologische Untersuchung notwendig (Keller et al., 1998).

2.4 Der humane Vollbluttest

2.4.1 Entwicklung des humanen Vollbluttests

Der humane Vollbluttest wurde ursprünglich entwickelt, um den Kaninchen-Fiebertest im Rahmen der Untersuchung von Parenteralia auf Pyrogenfreiheit abzulösen. Mittlerweile wird dieses Testsystem aber auch zur Charakterisierung der entzündungsauslösenden Potenz von Bioaerosolen bzw. Bioaerosolbestandteilen genutzt (Fennrich et al., 2000; Zucker et al., 2002). Er eignet sich jedoch nicht als Parameter zur Überprüfung einer akuten Belastung mit Bioaerosolen (Linsel et al., 2005).

Der Kaninchen-Fiebertest wurde in den vierziger Jahren eingeführt. In den siebziger Jahren wurde der LAL-Test entwickelt und stellt mittlerweile ein international akzeptiertes Verfahren zur Endotoxinmessung dar. Seine Anwendung ist allerdings weitestgehend auf den Endotoxinnachweis beschränkt. Nach der Entdeckung von Interleukin -1β als fieberauslösende Substanz entstand das Bestreben Systeme mit zellulärer Grundlage zur Pyrogentestung zu entwickeln. Dies wurde 1982 auf der Basis menschlicher Leukozyten versucht. Allerdings erwies sich diese Methode als schwer zu standardisieren. 1995 entstand der erste Versuch menschliches Vollblut als zelluläre Grundlage zur Pyrogentestung zu verwenden (Hartung et al., 1999). Daraus entstand der humane Vollbluttest in der jetzigen Form.

2.4.2 Prinzip des humanen Vollbluttests

Bioaerosolproben, die mittels Impingement oder Filtration gesammelt wurden, werden in Kontakt mit dem Blut von gesunden Spendern gebracht. Entzündungsauslösende Inhaltsstoffe (z.B. Glucane, Tannine, Endotoxine) aktivieren die Monozyten (Blutmakrophagen), welche dann verschiedene proinflammatorische Signalmoleküle ausschütten. Die Konzentration dieser Signalmoleküle wird anschließend mittels spezifischem ELISA bestimmt und dient als Maß für das proinflammatorische Potential der untersuchten Proben. Prinzipiell das Gleiche passiert im Lungengewebe. Hier aktivieren die entzündungsauslösenden Stoffe vor allem die Lungenmakrophagen, welche dieselben proinflammatorischen Signalstoffe ausschütten wie die Blutmakrophagen. In der Lunge wird durch diese das Entzündungsgeschehen ausgelöst und gesteuert (Abbildung 5). Der humane Vollbluttest stellt damit die Vorgänge im Respirationstrakt infolge Bioaerosolbelastung nach.

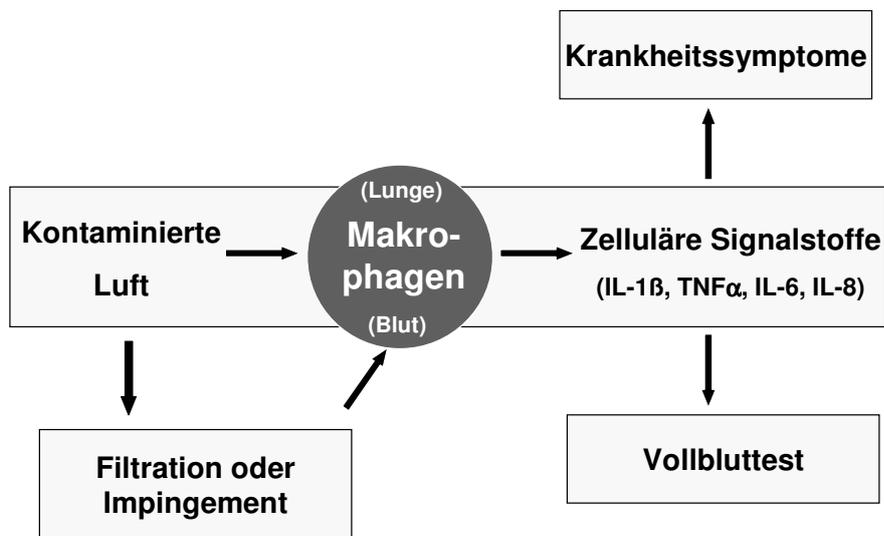


Abbildung 5 : Prinzip des Vollbluttests (nach Zucker et al.; 2004)

2.4.3 Vergleich des Vollbluttests mit anderen Testsystemen

Besonderer Vorteil des Vollbluttests ist es, dass die während der Entzündung ablaufenden pathophysiologischen Prozesse ex-vivo in einem für die belastete Spezies relevanten System (porcine und bovine Vollblutteste werden zurzeit entwickelt) nachvollzogen werden können. Damit ist eine genauere Aussage über die entzündungsauslösende Substanz möglich, denn die Reaktion der Monozyten ist bedeutend variabler als z.B. die Reaktion im LAL-Test, der weitestgehend auf den Endotoxinnachweis beschränkt ist. Diese Variationsbreite spiegelt der Vollbluttest wieder. So ist aus der Untersuchung von Endotoxinen bekannt, dass der LAL-Test im Vergleich mit dem humanen Vollbluttest die unterschiedlich starke toxische Wirkung von Endotoxinen auf den Menschen nur eingeschränkt wieder gibt. Deshalb kann es im LAL-Test zur Über- oder Unterbewertung der toxischen Potenz eines Endotoxines kommen (Fennrich et al., 1998; Zucker et al., 2004). Im Vergleich zum Kaninchentest ist der Vollbluttest sensitiver und ökonomischer. (Fennrich et al., 1998). Ein Nachteil des Vollbluttestes war bisher, dass frisches Blut benötigt wurde. Deshalb wurde die Verwendung von kryokonserviertem Blut eingeführt.

2.4.4 Kryokonserviertes Blut

Kryokonserviertes Blut ist wie der Name bereits sagt ein kältekonserviertes Vollblut. Es enthält DMSO (Dimethylsulfoxid) als Kryoprotektivum. Es kann direkt nach dem Auftauen im humanen Vollbluttest verwendet werden. Zur Herstellung größerer Chargen kann das Blut mehrerer Spender unabhängig von ihrer Blutgruppe gemischt werden. Der Vorteil des kryokonservierten Blutes ist, dass es eine überprüfte Qualität hat (von Aulock, 2005). Bei Frischblut können so genannte Low-responder vorkommen, also Spender, die kaum oder erst bei sehr hohen Immunstimuli reagieren. Da es sich bei dem kryokonservierten Blut um

ein Mischprodukt handelt kommt es zum Wegfall der interindividuellen Reaktionsunterschiede. Des Weiteren können auch nur bereits geprüfte Spender zur Herstellung verwendet werden.

Die Fähigkeit zur Freisetzung von IL-1 β und IL-6 nach Stimulation ist bei kryokonserviertem Blut erhalten. TNF- α wird jedoch nicht mehr ausgeschüttet. Allerdings sind die absoluten Mengen der freigesetzten Interleukine im Vergleich zum Frischblut erhöht und die Bildung ist aufgrund des DMSO etwas verzögert (Schindler et al., 2004).

2.4.5 Zytokine

Zytokine sind wichtige Regulatoren der Immunantwort auf Infektionen, Entzündungen und Traumata. Sie werden hauptsächlich von Lymphozyten sezerniert und von daher auch als Lymphokine bezeichnet. Allgemein dienen sie als Kommunikationsmoleküle zwischen den an der Immunabwehr beteiligten Zellen. Dies führt z.B. zur Anlockung weiterer phagozytischer Zellen. Die Zytokine können in pro- und antiinflammatorische Zytokine unterteilt werden (Dinarello, 2000). Ihre Wirkung erfolgt durch Bindung an hochspezifische Zelloberflächenrezeptoren auf den Zielzellen, wodurch eine Serie intrazellulärer Signalwege ausgelöst wird (Carol et al., 1997).

Im humanen Vollbluttest wird die entzündungsauslösende Potenz der untersuchten Substanz über die Zytokinausschüttung charakterisiert. Dazu werden meistens die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α gemessen, die ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind. Sie haben viele überlappende Funktionen und können sich wechselseitig beeinflussen. Sie werden u.a. von Monozyten und Makrophagen als Reaktion auf mikrobielle Produkte neben anderen endogenen Pyrogenen, wie z.B. Prostaglandinen, während der Immunantwort auf diese Stimuli ausgeschüttet (Hoffmann et al., 2005). TNF- α ist das am häufigsten untersuchte Interleukin. Seine wichtigste lokale Aufgabe ist die Auslösung einer Entzündung.

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β ist der bekannteste Vertreter der endogenen Pyrogen und führt u.a. zur Auslösung von Fieber (Fennrich et al., 1998). Es ist sowohl in akuten als auch in chronischen Entzündungsprozessen involviert, wobei es jedoch in akuten Entzündungsprozessen zusammen mit TNF- α , IL-6, IL-8 und anderen Zytokinen eine Schlüsselrolle einnimmt. (Carol et al., 1997). Dabei gilt es als Hauptentzündungsmediator. IL-1 β wird schwerpunktmäßig von Monozyten sezerniert aber auch von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen (Krüger et al., 2004).

IL-6 ist ein zentrales Regulationsmolekül für Immun- und Entzündungsprozesse und an der Kontrolle der Akutphasereaktion beteiligt. Es wird hauptsächlich durch Makrophagen und Monozyten gebildet. In auf Blutzellen basierenden Testsystemen reagiert es auf Immunstimuli am sensitivsten und kann in großer Menge im Kulturmedium gemessen werden (Nakagawa et al., 2002).

3 Material und Methoden

3.1 Bestimmung der proinflammatorischen Aktivität von kommerziell erhältlichen Glucanen in einem humanen Vollbluttest

3.1.1 Untersuchte Glucane

Folgende kommerziell erhältliche Glucane wurden hinsichtlich ihrer Reaktivität im Vollbluttest untersucht:

- Barley Glucan (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: G-6513, Lot-Nr.: 1138821)
- Curdlan (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: C-7821, Lot-Nr.: 114K4096)
- Glucan aus Bäckerhefe (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: G-5011, Lot-Nr.:125K4026)
- Laminarin (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: L-9634, Lot-Nr.:77H3793)
- Paramylon (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: 89862, Lot-Nr.: 1122945)
- Zymosan (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: Z-4250, Lot-Nr.: 80K0989)

Für diese Untersuchungen wichtige Eigenschaften sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Eigenschaften der untersuchten Glucane

Bezeichnung	Isolierbar aus	Glucanart	Verzweigungs- frequenz	Molekulargewicht
Barley β - Glucan	Gerste	Lineares β -1,3- 1,4- D-Glucan	keine	$1,91 \times 10^5$ g/mol
Curdlan	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Lineares β -1,3-D- Glucan	keine	$> 10^5$ g/mol
Glucan aus Bäckerhefe	<i>S. cerevisiae</i>	β -1,3-D-Glucan mit 1,6-Verzweigungen	Jede 3. Glucoseeinheit	$> 10^5$ g/mol
Laminarin	<i>L. digitata</i>	β -1,3- Glucan mit 1,6- Verzweigungen	Jede 10. Glucoseeinheit	7×10^3 g/mol
Pachyman (Standard Glucatell)	<i>Poria cocos</i>	β -1,3-D-Glucan	keine	$1,68 \times 10^5$ g/mol
Paramylon	<i>Euglena gracilis</i>	Lineares β -1,3-D- Glucan	keine	5×10^5 g/mol
Zymosan	<i>S.cerevisiae</i>	β -1,3-D-Glucan mit 1,6-Verzweigungen + Mannan	Jede 3. Glucoseeinheit	$> 10^5$ g/mol

3.1.2 Durchführung des Vollbluttests

Die Bestimmung der proinflammatorischen Aktivität der Glucane erfolgte mittels eines semiquantitativen humanen Vollbluttestes wie bei Zucker et al. (2006) beschreiben. Hierbei wird die proinflammatorische Aktivität einer Substanz anhand der durch sie hervorgerufenen Interleukinausschüttung aus Monozyten bewertet. Der Test besteht aus folgenden Schritten:

1. Vollblutinkubation
2. ELISA zum Nachweis von Entzündungsmediatoren
3. Bewertung der Ergebnisse.

3.1.2.1 Blutspender

Es wurde das Blut von 21 klinisch gesunden Spendern genutzt. Zusätzlich wurde für einige Versuche kryokonserviertes Blut verwendet, welches freundlicherweise von der Universität Konstanz zur Verfügung gestellt wurde.

3.1.2.2 Vollblutinkubation

Verwendete Materialien

- Pipettenspitzen pyrogenfrei
- 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) pyrogenfrei
- Brutschrank (37°C)
- Zentrifuge
- Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (Caso-Agar, Oxoid, Art.-Nr. CM 131)
- Control Standard Endotoxin: Endotoxin von *E.coli* O111: B4 (Cambrex, USA)
- Dichloran-Glyzerin-Agar (DG-18-Agar, Oxoid, Art.-Nr. CM 729)
- Heparinisiertes Blut (max. 4 Stunden alt)
- Polymyxin B (Sigma-aldrich, Bestellnummer: P-4932, Lot-Nr.: 123K2500)
- Pyrogenfreie physiologische Kochsalzlösung (NaCl-Lösung; Braun, Melsungen)

Durchführung

Zuerst wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der Glucane in pyrogenfreier physiologischer NaCl-Lösung in den Konzentrationen 1,0 mg/ml bis 100 pg/ml erstellt. Danach wurden für die Erstellung einer Standardkurve aus dem Control Standard Endotoxin (CSE) Lösungen mit einer endotoxischen Aktivität von 0 EU/ml; 0,1 EU/ml; 0,25 EU/ml; 0,5 EU/ml; 1,0 EU/ml und 5,0 EU/ml hergestellt. Anschließend erfolgte der Probenansatz wie folgt:

- 900 µl NaCl plus
- 100 µl Probe bzw. CSE plus
- 100 µl heparinisiertes Blut.

Als Positivkontrolle wurde allen Verdünnungen zusätzlich 100 µl der CSE-Lösung mit einer Aktivität von 1,0 EU/ml („Spike“) zugesetzt, dadurch konnte eine Hemmung der Interleukinbildung während der Inkubationsphase durch Probeninhaltsstoffe festgestellt werden. Dazu wurden folgende Mengen in die Eppendorfreaktionsgefäße pipetiert:

- 800 µl NaCl plus
- 100 µl Probe plus
- 100 µl CSE (Konzentration von 1,0 EU/ml) plus
- 100 µl heparinisiertes Blut.

Anschließend wurden die Eppendorfreaktionsgefäße fünfmal vorsichtig geschwenkt. Danach erfolgte für 22 Stunden die Vollblutinkubation bei 37°C, um die Interleukinbildung durch die Monozyten zu ermöglichen.

Nach der Inkubation wurden die Eppendorfgefäße erneut fünfmal vorsichtig geschwenkt und bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert. Danach wurden die Überstände aliquotiert und bei – 80°C bis zu den ELISA- Untersuchungen gelagert.

Abschließend erfolgte die Sterilkontrolle der Probenansätze. Dazu wurden je 100 µl aller Verdünnungsstufen auf Caso-Agar und DG-18-Agar ausgestrichen und für 48 Stunden bei 37°C bzw. 96 Stunden bei 25°C bebrütet.

3.1.2.3 ELISA zum Nachweis proinflammatorischer Zytokine

Die Bewertung des proinflammatorischen Potentials der Proben erfolgte über die Quantifizierung der während der Vollblutinkubation stattgefundenen IL-1β- bzw. IL-6-Bildung mittels spezifischer ELISA.

3.1.2.3.1 ELISA zum Nachweis von IL-1β

Materialien

- Coating Antikörper: Antihuman IL-1β (Pierce-Endogen, Rockford, Bestellnummer: M421BE)
- Tracer-Antikörper: Antihuman IL-1β Monoclonal Antibody, biotin-labeled (Pierce-Endogen, Bestellnummer: M420BB)
- Rekombinat Human IL-1β zur Herstellung der Standardlösung (Pierce-Endogen)
- ELISA-Platte: Nunc-Immuno Platte, MaxiSorp surface (Nunc, Dänemark)
- POD: 1 mg/ml Stammlösung: 1 mg Peroxidase-conjugated Streptavidin + 1 ml steriles Bidest
- Substrat : TMB Substrat (Seramun, Wolzig)
- Coatingpuffer : 0,03 M Natriumcarbonat + 0,068 M Natriumhydrogencarbonat
- Waschpuffer : 1 l PBS (Oxoid) ph 7,0 + 0,2 ml Tween 20 (Serva, Heidelberg)
- Arbeitspuffer: PBS + 3% BSA
- Stopplösung: 1M H₂SO₄
- ELISA-Reader

Durchführung

Die Durchführung der ELISA erfolgte entsprechend den Angaben des Lieferanten der verwendeten Antikörper und ist in der Tabelle 14 (s. Anhang) zusammenfassend dargestellt.

Auswertung

Das Blut von klinisch gesunden Spendern ist frei von IL-1β (Weigandt, 2000). Diese Bedingung galt als erfüllt, wenn die optische Dichte der Vollblutstimulation mit pyrogenfreiem

NaCl nicht das Zweifache der optischen Dichte des Blank (Arbeitspuffer) des ELISAs überschritten hat.

Zur Bestimmung der Aktivität der Probe wurde zuerst die Verdünnungsstufe bestimmt, in der die Probe noch eine positive Reaktion im Vollbluttest hervorrief. Eine Probe wurde als positiv bewertet, wenn die optische Dichte der Probe das Dreifache der optischen Dichte der Vollblutstimulation mit pyrogenfreiem NaCl (100 µl NaCl, 100 µl Blut, 900 µl NaCl = Nullkontrolle) überschritten hat. Die Aktivität der jeweiligen Probe ergab sich dann aus folgendem Produkt: Verdünnungsstufe der Probe mit gerade noch positiver Reaktion x endotoxische Aktivität der Verdünnungsstufe des CSE mit gerade noch positiver Reaktion. Die Aktivität wurde in EEU/ ml (Endotoxin Equivalent Units/ ml) angegeben.

Beispiel: Der Spender reagierte positiv ab 0,5 EU/ml CSE und die Probe reagierte bis einschließlich der Verdünnungsstufe 1:100 positiv. Dies bedeutet laut oben genannter Formel $100 \times 0,5 = 50$, die Probe wies also eine Aktivität von 50 EEU/ml auf.

Bei Proben die unterhalb der Nachweisgrenze lagen wurde zur statischen Auswertung die Hälfte der unteren Nachweisgrenze verwendet. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass aufgrund der semiquantitativen Auswertung die Schwankungsbreite der Ergebnisse eine Verdünnungsstufe betragen kann (Zucker, 2004). Dies entspricht bei dekadischer Verdünnung einer Zehnerpotenz.

Außerdem wurde die unspezifische Hemmung der Interleukinbildung überprüft. Sie konnte ausgeschlossen werden, wenn ungespikte Proben der Verdünnungsreihe ein negatives Signal zeigten, die dazugehörigen gespikten Proben aber positiv reagierten. Anschließend erfolgte die Auswertung der Sterilkontrolle. Proben, in denen nach der Inkubation eine Vermehrung von Mikroorganismen festgestellt wurde, wurden nicht zur Auswertung herangezogen.

3.1.2.3.2 ELISA zum Nachweis von IL-6

Der Nachweis von IL-6 erfolgte bei ausgewählten Proben zusätzlich zum Nachweis von IL-1 β .

Materialien

- Coating Antikörper: Antihuman IL-6 Monoclonal Antibody, Purified (Pierce Endogen, Bestellnummer M620E)
- Tracer Antikörper: Antihuman IL-6 Monoclonal Antibody, Biotin-labeled (Pierce Endogen, Bestellnummer: M621B)
- Rekombinant Human IL-6 (Pierce Endogen) zur Herstellung der Standardlösung
- ELISA-Platte: Nunc-Immuno Platte, MaxiSorp surface
- POD: 1,25 µl Peroxidase- conjugated Streptavidin-Stammlösung in 30 ml Assay Buffer
- Coatingpuffer: PBS 4% BSA
- Blockpuffer: 4% BSA, 5% Saccharose in PBS
- Arbeitspuffer: PBS 4% BSA pH: 7,4
- Waschpuffer: 1 l PBS pH 7,4 + 0,5 ml Tween 20
- TMB Substrat
- Stopplösung: 0,18 M H₂SO₄

Durchführung

Die Durchführung des ELISA erfolgte analog zum Protokoll des Human IL-6 Screening Set der Firma Pierce, Rockford (Tabelle 15 s. Anhang).

Auswertung

Die Auswertung der IL-6-Meßwerte erfolgte analog zum IL-1 β -ELISA (s. Punkt 3.1.2.3.1).

3.1.3 Bestimmung der Aktivität von Glucanen im Vollbluttest nach Zusatz von Polymyxin B

Polymyxin B (PB) ist ein Polypeptidantibiotikum, das die Fähigkeit zur Reduzierung der proinflammatorischen Potenz von Endotoxinen hat (Cooperstock, 1974). Zur Untersuchung des Einflusses von Polymyxin B auf die proinflammatorische Potenz der Glucane wurden vor Zugabe des Blutes 10 μ l Polymyxin B mit einer Konzentration 0,5 mg/ml zum Reaktionsansatz (890 μ l NaCl, 100 μ l Probe, 10 μ l PB) hinzugegeben. Die Proben wurden fünfmal geschwenkt und dann 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Vollblut und der Vollbluttest wurde wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben durchgeführt. Mit Polymyxin B behandelte und nicht behandelte Glucanproben wurden stets gleichzeitig in einem Vollblutansatz untersucht.

3.1.4 Bestimmung der Aktivität von Glucanen im Vollbluttest nach NaOH-Behandlung

Zur Untersuchung des Einflusses einer NaOH-Behandlung auf die Interleukinausschüttung durch kommerziell erhältliche Glucane wurde zu den in physiologischer NaCl-Lösung gelösten Glucanen soviel 50%ige NaOH gegeben, dass eine Arbeitsendkonzentration von 0,3 N NaOH entstand. NaOH überführt in der Dreifachhelix vorkommende Glucane in die Einfachhelix und beeinflusst dadurch u.a. die Wasserlöslichkeit. Die so mit NaOH behandelten Proben wurden geschüttelt und nach einer Einwirkzeit von 10 min erfolgte eine pH-Einstellung auf den neutralen Bereich mit 1M HCL. Anschließend erfolgte die Erstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe mit physiologischer NaCl-Lösung. Die anschließende Vollblutinkubation erfolgte in Anwesenheit von Polymyxin B, um den Einfluss möglicher Endotoxinkontaminationen ausschließen zu können (s. Punkt 3.1.2. und Punkt 3.1.3.). NaOH-behandelte und nicht-behandelte Glucanproben wurden stets gleichzeitig in einem Vollblutansatz untersucht.

3.2 Bestimmung der Aktivität von kommerziell erhältlichen Glucanen in einem glucanspezifischen Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test

3.2.1 Untersuchte Glucane

Die untersuchten Glucanen waren genau dieselben Glucanen, die auch im humanen Vollbluttest untersucht wurden (s. Punkt 3.1.1.)

3.2.2 Durchführung des glucanspezifischen LAL-Tests

Hierbei handelte es sich um einen glucanspezifischen LAL-Test (Glucateil) der Firma Pyroquant Diagnostik GmbH (Mörfelden-Walldorf). Die Durchführung des Tests erfolgte nach Angabe des Herstellers als Endpunkt-Methode (Tabelle 16 s. Anhang).

Material

- Pipettenspitzen (glucanfrei)
- Pyrotube-D (Pyroquant Diagnostik GmbH)
- Heizblock oder Brutschrank
- Plattenlesegerät mit 540- 450 nm Filter

Auswertung

Die Bestimmung der Konzentration an Glucanen erfolgte anhand der aus dem mitgeführten Standard (Pachyman) erstellten Standardkurve. Die Standardkurve wurde mittels linearer Regression ermittelt, wobei nur Tests zur Auswertung gelangten bei denen der Regressionskoeffizient der Standardkurve mindestens 0,98 betrug.

3.2.3 Bestimmung der Aktivität von Glucanen im glucanspezifischen LAL-Test nach NaOH-Behandlung

Die kommerziell erhältlichen Glucane wurden analog zu Punkt 3.1.4 mit NaOH versetzt. Anschließend erfolgte die vergleichende Untersuchung von NaOH-behandelten und nicht-behandelten Glucanen im glucanspezifischen LAL-Test (s. Punkt 3.2.2.)

3.3 Bestimmung der Konzentration an einatembaren Staub, Glucanen, Schimmelpilzen, Endotoxinen, Bakterien und proinflammatorisch aktiven Stoffen in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen

Zur Bestimmung der einzelnen Bioaerosolparameter wurden verschiedene Sammeltechniken verwendet. Die Abbildung 6 gibt für die Bioaerosoluntersuchungen in den Tierställen einen Gesamtüberblick. Die untersuchten Tierställe sowie die verwendeten Bioaerosolbestimmungsmethoden sind im anschließenden Text ausführlich beschrieben.

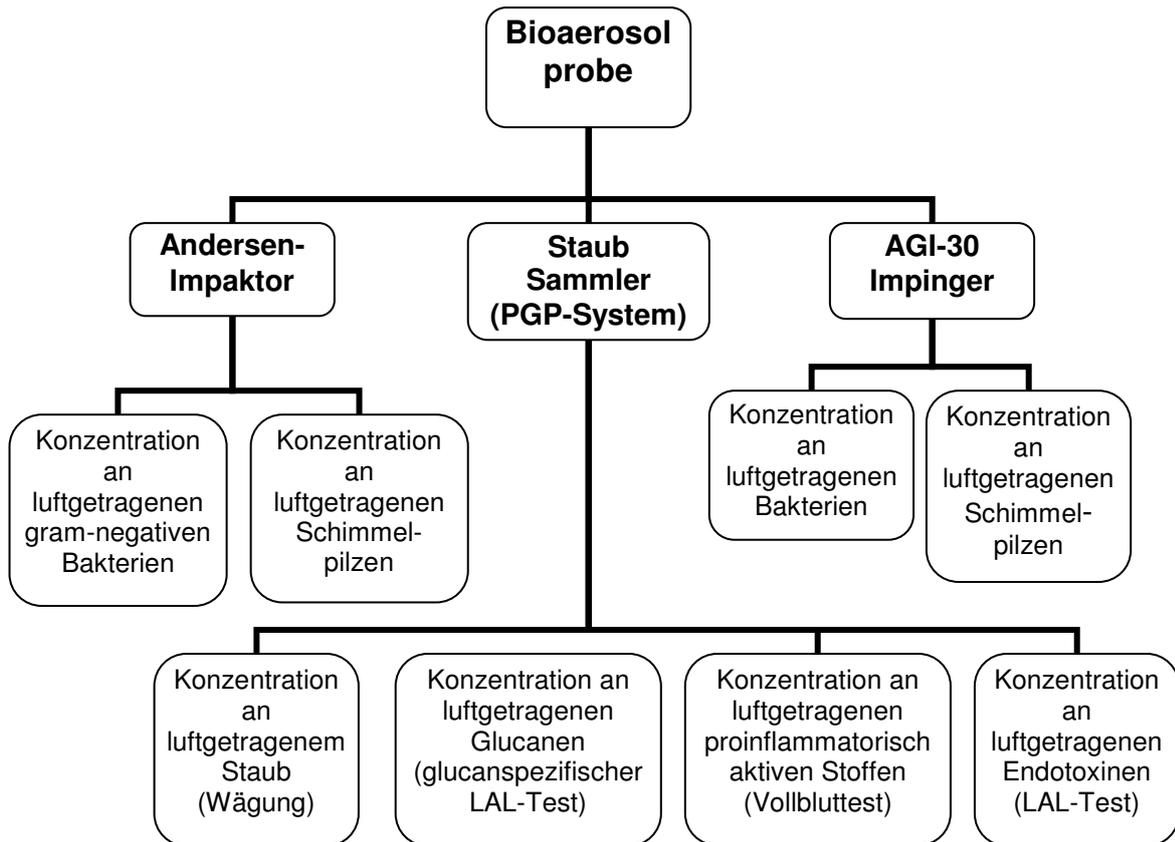


Abbildung 6: Übersicht über die in den Tierställen genommenen Bioaerosolproben, die verwendeten Sammelgeräte und die damit bestimmten Parameter

3.3.1 Untersuchte Tierställe

Die Probennahme erfolgte in verschiedenen Geflügel-, Schweine-, Rinder-, Pferde- und Schafställen. Die Bioaerosolproben wurden in der Mitte des Stalles in Höhe des Einatembereiches der Tiere gesammelt. Die Sammlung erfolgte nicht während Staubspitzenzeiten z.B. durch Füttern oder Einstreuen. Für die Untersuchung relevante Merkmale der Ställe sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Daten der untersuchten Tierställe

Tierart	Tierzahl u -alter	Haltungstechnologie	Fütterung	Stallmaße in m	Lüftung
Reitferde	26 Tiere zwischen 4 und 14 Jahren	Boxenhaltung auf Einstreu (Stroh, Späne)	Heu, Hafer, Pellets	38 x 15 x 3,5	Dachfirstlüftung
Reitferde	24 Tiere zwischen 4 und 24 Jahren	Boxenhaltung auf Einstreu (Stroh, Späne)	Heu, Hafer, Pellets	72 x 10 x 4,5	Fensterlüftung
Milchkühe	800 Tiere zwischen 2 und 5 Jahren	Laufstallhaltung auf Vollspaltenboden mit Liegeboxen	Maissilage	157 x 36,5 x 5	Fensterlüftung und Firstlüftung
Milchkühe vor der Abkalbung	70 Tiere zwischen 2 und 5 Jahren	Laufstallhaltung auf Tiefstreu (Stroh)	Maissilage	75 x 21 x 4	Fensterlüftung
Schafe	6 adulte Tiere	Laufstallhaltung auf Tiefstreu (Stroh)	Heu, Mineralfutter	10 x 5 x 3,5	Fensterlüftung
Mastschweine	575 Tiere mit ca. 70 kg	Gruppenhaltung auf Teilspaltenboden	Trockenfütterung	56 x 12 x 2,8	Unterdrucklüftung
Mastschweine	560 Tiere mit ca. 70 kg	Gruppenhaltung auf Teilspaltenboden	Trockenfütterung	56 x 12 x 2,8	Unterdrucklüftung
Mastschweine	580 Tiere mit ca. 70 kg	Gruppenhaltung auf Teilspaltenboden	Trockenfütterung	56 x 12 x 2,8	Unterdrucklüftung
Legehennen	8700 Tiere im Alter von 38 Wochen	Volierenhaltung auf Einstreu (Sägemehl)	Trockenfütterung	88 x 12 x 3,5	Unterdrucklüftung
Legehennen	8500 Tiere im Alter von 40 Wochen	Volierenhaltung auf Einstreu (Sägemehl)	Trockenfütterung	88 x 12 x 3,5	Unterdrucklüftung
Broilereltern-tieraufzucht	8350 Tiere im Alter von 16 Wochen	Bodenhaltung auf Einstreu (Sägemehl)	Trockenfütterung	88 x 12 x 3,5	Unterdrucklüftung
Broilereltern-tierhaltung	6800 Tiere im Alter von 40 Wochen	2-reihige Legenester auf Kotrosten in der Mitte des Stalles	Trockenfütterung	88 x 12 x 3,5	Unterdrucklüftung

3.3.2 Bestimmung der Konzentration an einatembarem Staub

Material

- pyrogenfreie Polykarbonmembranfilter mit 8 µm Porendurchmesser (Millipore, Eschborn)
- Sammelkopf für PGP-Staub (Ströhlein Instruments, Deutschland)

Die Probennahme zur Bestimmung der Konzentration an einatembarem Staub erfolgte mit dem PGP-Staubsammelsystem der Firma Ströhlein, in das pyrogenfreie Polykarbonmembranfilter mit 8 µm Porendurchmesser der Firma Millipore eingesetzt wurden. Die Filter wurden vor der Messung auf einer Feinwaage eingewogen. Die Sammlung erfolgte mit einer Luftdurchsatzrate von 3,5 l/min bei einer Sammeldauer von 180 min. Die Filterproben wurden zur Weiterverarbeitung kühl und trocken ins Labor transportiert.

Im Labor wurden die Filter im Wärmeschrank bei 60°C für 24 Stunden in pyrogenfreien Glasschalen getrocknet und erneut gewogen, um die gesammelte Staubmasse zu bestimmen. Anschließend wurden die Filterproben zur Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Glucanen, proinflammatorischen Stoffen und Endotoxinen genutzt.

3.3.3 Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Glucanen

Material

- 0,9 %ige sterile und pyrogenfreie NaCl-Lösung

Die konditionierten Filter (s. Punkt 3.3.2) wurden in 50 ml pyrogenfreiem Wasser in pyrogenfreien Glasschalen für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Im erhaltenen Eluat wurde dann die Konzentration an Glucanen mittels GlucateLL (s. Punkt 3.2.2) bestimmt. Das Eluat diente ebenfalls der Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Endotoxinen und proinflammatorisch aktiven Stoffen (s. Punkt 3.3.5 und Punkt 3.3.4)

3.3.3.1 Vorversuche zur Optimierung der Probenaufbereitung für den glucanspezifischen LAL-Test

In der Literatur (Rylander et al., 1992; Douwes et al., 1996; Fogelmark and Rylander, 1997; Chew et al., 2001) sind mehrere Verfahren zur Extraktion von Glucanen aus Staubproben beschrieben. Da über ihre Effizienz keine Untersuchungen vorlagen, wurden mehrere Extraktionsprotokolle verglichen. Bei den getesteten Proben handelte es sich um in pyrogenfreiem Wasser gelöste Gesamtstaubproben (Originalproben), welche für die einzelnen Tests aliquotiert wurden.

- Extraktion durch Hitze einwirkung

Dazu wurde die Originalprobe bei 121°C autoklaviert. Die Autoklavierungsdauer betrug 15 min bzw. 60 min. Aus dem Überstand der abgekühlten Proben wurde eine dekadische Verdünnungsreihe zur Untersuchung des Glucangehaltes erstellt.

- Extraktion durch NaOH

Die Originalprobe wurde mit NaOH versetzt, so dass in der Probe eine Konzentration von 0,3 N NaOH vorlag. Anschließend wurde die Probe kräftig geschüttelt. Nach 10 min

Einwirkungszeit erfolgten die Einstellung des pH-Wertes auf den pH-Bereich zwischen pH 6-8 sowie die Erstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe.

- Keine Aufbereitung

Dazu wurde von den Originalproben ohne weitere Aufbereitung eine Verdünnungsreihe erstellt.

Die so aufbereiteten Proben wurden dann vergleichend im glucanspezifischen LAL-Test wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben untersucht.

3.3.4 Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffen

3.3.4.1 Sammlung der luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffe

Zur Bestimmung der Konzentration an proinflammatorisch aktiven Stoffen wurden genau dieselben Filterproben bzw. die aus diesen Filterproben gewonnenen Eluate wie zur Bestimmung des Glucangehaltes verwendet (s. Punkt 3.3.3)

3.3.4.2 Bestimmung der Konzentration an proinflammatorisch aktiven Stoffen mittels eines humanen Vollbluttests

Aus der Staubsuspension wurde eine duale Verdünnungsreihe in pyrogenfreier physiologischer NaCl-Lösung erstellt und wie unter Punkt 3.1.2 beschrieben im Vollbluttest untersucht.

3.3.4.3 Untersuchung des Einflusses von PB auf die proinflammatorische Aktivität der Bioaerosolproben

Dazu wurden die Proben wie unter Punkt 3.1.4. beschrieben mit PB aufbereitet und anschließend im Vollbluttest (s. Punkt 3.1.2) untersucht. Die Behandlung mit dem Endotoxininhibitor PB führte zur Hemmung der endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität der Proben und somit konnte in diesem Untersuchungsschritt die nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität der Bioaerosolproben bestimmt werden (Eckardt,2007).

3.3.5 Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Endotoxinen

3.3.5.1 Sammlung der luftgetragenen Endotoxine

Zur Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Endotoxinen wurden genau die selben Filterproben bzw. die aus diesen Filterproben gewonnenen Eluate wie zur Bestimmung des Glucangehaltes verwendet (s. Punkt 3.4.2.)

3.3.5.2 Bestimmung der Endotoxinkonzentration mittels eines LAL-Tests

Materialien:

- LAL-Testkit QCL 1000 (BioWhittaker, USA)
- 25%ige Essigsäure
- 96-well-Mikrotiterplatte, pyrogenfrei
- Glasröhrchen (endotoxinfrei)
- Pipettenspitzen (endotoxinfrei)

Der LAL-Test wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Testdurchführung ist in Tabelle 17 (s. Anhang) beschrieben.

Auswertung

Die Bestimmung der Konzentration an Endotoxinen erfolgte anhand der aus den mitgeführten Standards erstellten Standardkurve. Diese wurde mittels linearer Regression ermittelt. Es wurden nur die Tests ausgewertet, deren Regressionskoeffizient mindestens 0,98 betrug.

3.3.6 Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Schimmelpilzen

Materialien

- Andersensammler
- All-glass-Impinger (AGI 30) (ACE Glass Incorporated, Vineland, N.J., USA)
- Pumpe mit Rotameter
- Reagenzgläser
- Erlmeierkolben
- Pipettenspitzen
- Glasspatel
- Vortexer
- Brutschrank
- 0,9%ige NaCl-Lösung
- Dichloran-Glyzerin-Agar (DG-18-Agar, Oxoid, Art.-Nr. CM 729)
- Tween-20

3.3.6.1 Nachweis luftgetragener Schimmelpilze mittels Impaktion

Unter Impaktion versteht man die Abscheidung luftgetragener Partikel aus einem angesaugten volumendefinierten Luftstrom direkt auf die Oberfläche einer festen Sammelphase.

In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte dieses mit einem Andersenkaskadenimpaktor (Andersen, 1958). Das Gerät besteht aus sechs Stufen mit je 400 Bohrungen. Der Durchmesser der Bohrungen nimmt von der oberen zur unteren Stufe ab (von 1,81 mm Durchmesser in der obersten Stufe bis 0,25 mm Durchmesser in der untersten Stufe).

Hierdurch soll die Abscheidung von luftgetragenen Partikeln in den verschiedenen Abschnitten des menschlichen Respirationstraktes simuliert werden.

Zur Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Schimmelpilzen wurde mit einer Luftstromrate von 28,3 l/min für 30 sec auf DG-18 Agar gesammelt. DG-18 Agar ist ein Selektivnährboden zum Nachweis xerophiler, mesophiler und thermotoleranter Schimmelpilze (Anonym, 2004). Der Transport der beaufschlagten Nährböden ins Labor erfolgte gekühlt bei 4°C.

Zur Bestimmung der mesophilen und thermotoleranten Schimmelpilze wurden die auf DG-18-Agar gewonnen Proben unter aeroben Bedingungen für 7 Tage bei 25°C bebrütet. Am 3., 5. und 7. Tag erfolgte die Auszählung der visuell sichtbaren Kolonien der Schimmelpilze zur Quantifizierung des Schimmelpilzgehaltes der Proben. Die Konzentration an luftgetragenen Schimmelpilzen wurde unter Berücksichtigung der Luftstromrate und der Sammelzeit berechnet.

3.3.6.2 Nachweis luftgetragener Schimmelpilze mittels Impingement

Bei der Keimsammlung mit dem Andersen-Sammler besteht bei hohem Keimgehalt die Gefahr einer Überladung der Agarplatten (Scharf, 2005), wodurch diese nicht mehr auswertbar sind. Deshalb wurde zusätzlich auch die Keimsammlung mittels Impingement durchgeführt. Unter Impingement versteht man die Einleitung eines angesaugten Luftstromes in ein flüssiges Sammelmedium mit der Suspension der Bioaerosole in der Flüssigkeit. Dies erfolgte in den vorliegenden Untersuchungen mit dem AGI-30 (Brachmann et al., 1964). Die Sammeldauer betrug 30 min bei einer Luftstromrate von 12,5 l/min. Als Sammelflüssigkeit wurde 50 ml physiologische Kochsalzlösung verwendet. Der Transport der Sammelflüssigkeit erfolgte gekühlt (4°C) in pyrogenfreien Röhrchen.

Zur Bestimmung der mesophilen und thermotoleranten Schimmelpilze wurde aus den Impingerflüssigkeiten mit physiologischer Kochsalzlösung mit 0,01% Tween 20 eine dekadische Verdünnungsreihe erstellt. Davon wurden dann jeweils 2 x 100 µl auf DG18-Agar ausgestrichen (Doppelansatz für jede Verdünnungsstufe). Anschließend erfolgte eine aerobe Bebrütung für 7 Tage bei 25°C und am 3., 5. und 7. Tagen die Auszählung der visuell sichtbaren Kolonien der Schimmelpilze. Die Konzentration an luftgetragenen Schimmelpilzen wurde unter Berücksichtigung der Luftstromrate und der Sammelzeit berechnet.

3.3.7 Bestimmung der Konzentration luftgetragener Bakterien

Material (zusätzlich zu den Materialien für die Schimmelpilzbestimmung)

- Caso-Agar
- MacConkey3-Agar (MC3-Agar, Oxoid, Art.-Nr. CM115)

3.3.7.1 Nachweis der luftgetragenen aeroben gram-negativen Gesamtkoloniezahl

Die Sammlung erfolgte mit einem sechsstufigen Andersen-Sammler mit einer Luftstromrate von 28,3 l/ min für 10 min auf MacConkey3-Agar, einem Selektivnährboden zur Bestimmung von luftgetragenen aeroben gram-negativen Bakterien (Zucker et al., 2000).

Die gewonnenen Proben wurden unter aeroben Bedingungen für 24 Stunden bei 37°C und anschließend für 24 Stunden bei Raumtemperatur bebrütet. Danach erfolgten eine visuelle Auszählung der gewachsenen Kolonien und die Berechnung der Konzentration an luftgetragenen gram-negativen Keimen.

3.3.7.2 Nachweis der luftgetragenen Gesamtkoloniezahl

Die Sammlung zur Erfassung der luftgetragenen Gesamtkoloniezahl erfolgte mittels AGI-30 (s. auch Punkt 3.3.6.2)

Zur Bestimmung der luftgetragenen Gesamtkoloniezahl aus der Impingerflüssigkeit wurde eine dekadische Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung erstellt. Anschließend wurden jeweils 2 x 100 µl auf Caso-Agar ausgestrichen (Doppelansatz je Verdünnungsstufe) und für 48 Stunden bei 37°C unter aeroben Bedingungen kultiviert.

3.4. Bestimmung der Konzentration an Glucanen, Schimmelpilzen und Bakterien in potentiellen Quellen für Bioaerosole in Tierställen

3.4.1 Probennahme und –aufbereitung

In ausgewählten Tierställen wurden zusätzlich zu den Bioaerosolproben, Proben von Einstreu, Futter und Kot in sterilen, pyrogenfreien Gefäßen gesammelt. Der Probentransport erfolgte gekühlt bei 4°C.

3.4.1.1 Nachweis der Schimmelpilze und Bakterien

10 g Substrat wurden unter sterilen Bedingungen abgewogen und falls notwendig zerkleinert. Anschließend wurden die Proben in 90 ml physiologischer Kochsalzlösung mit 0,01% Tween 20 gelöst und für 10 min geschüttelt. Danach erfolgte die Erstellung einer dekadischen Verdünnungsreihe mit physiologischer Kochsalzlösung.

Die Kultivierung der Schimmelpilze erfolgte analog zum Nachweis der Schimmelpilze aus den Impingerflüssigkeiten (s. Punkt 3.3.6.2)

Der Nachweis der gram-negativen Gesamtkoloniezahl und der Gesamtkoloniezahl aus den Substratproben erfolgte entsprechend dem Bakteriennachweis in den Impingerproben. (s. Punkt 3.3.7.2) Für die Bestimmung der gram-negativen Gesamtkolonie wurde ebenfalls MacConkey3-Agar verwendet. Die Kultivierung erfolgte wie unter 3.3.7.1 beschrieben.

3.4.1.2 Nachweis der Glucane

Eine Teilmenge der Proben wurde in einer pyrogenfreien Petrischale abgewogen und anschließend im Wärmeschrank bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anschließend wurde die Masse zur Bestimmung der Trockensubstanz erneut gewogen und im Möser fein zerkleinert. Dann wurden zur Untersuchungsvorbereitung 100 mg getrocknetes und zerkleinertes Substrat in Röhrchen mit 50 ml pyrogenfreiem Wasser gegeben und für zwei Stunden geschüttelt. Anschließend wurde zu den Proben soviel 50%ige NaOH gegeben, dass eine Arbeitsendkonzentration von 0,3 N NaOH entstand. Nach einer Einwirkzeit von 10 min wurden die Substratproben 10 min zentrifugiert. Die Überstände wurden zur Erstellung einer Verdünnungsreihe genutzt, die dann zur Glucanbestimmung verwendet wurde. Diese erfolgte im Glucateil-Test (s. Punkt 3.2.2.)

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit SPSS 12.0. Dabei wurden zur grafischen Darstellung der Ergebnisse überwiegend Boxplots und Boxplots mit überlagerten Einzelwerten genutzt. Diese waren wie folgt definiert. Die schwarze horizontale Linie innerhalb der weißen bzw. grauen Fläche (Box) eines Boxplots kennzeichnete die Lage des Median (50%-Perzentil) der jeweiligen Gruppe. Die untere und obere Grenze der Box kennzeichnen das 25%- bzw. 75%-Perzentil. Somit lagen in dem durch die Box dargestellten Wertebereich die mittleren 50% der Werte. Durch die dünnen Querstriche ober- und unterhalb der Box wurden die größten und kleinsten Werte der Stichprobe angegeben, die noch keine Ausreißer oder Extremwerte darstellten. Ausreißer und Extremwerte waren in diesem Zusammenhang Werte, die um mehr als das 1,5fache der Höhe der Box über oder unterhalb der Box lagen. Ausreißer wurden mit Kreisen dargestellt und ihre Entfernung betrug zwischen den 1,5fachen und Dreifachen der Boxhöhe. Extremwerte dagegen lagen mehr als das Dreifache der Boxhöhe über dem 75%-Perzentil bzw. unter dem 25%-Perzentil. Sie wurden mit Sternchen gekennzeichnet.

Zur weiteren Analyse der Daten wurden der Mann-Whitney-U-Test, der Wilcoxon-Test und die Korrelationsanalyse nach Spearman angewendet. Bei der Bewertungen der Signifikanz wurden für diese Tests Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Proinflammatorische Aktivität von Glucanen im Vollbluttest

4.1.1 Einfluss der Behandlung mit PB auf die proinflammatorischen Aktivität

Die proinflammatorische Aktivität kommerziell erhältlicher Glucane ist unterschiedlich stark, wie Abbildung 7 und Tabelle 5 zeigen. Der Vergleich zwischen der proinflammatorischen Potenz von Glucanen mit sowie ohne Zusatz von PB und dem CSE zeigt eine deutlich höhere Aktivität von bis zu sechs Zehnerpotenzen beim CSE. Die höchste Reaktivität der Glucane ohne PB-Behandlung zeigte mit einem Median von 200 EEU/mg Curdlan gefolgt von Zymosan (Median 30 EEU/mg), Glucan aus Bäckerhefe (Median 10 EEU/mg), BarleyGlucan, Paramylon (Median jeweils 5 EEU/mg) und Laminarin mit dem niedrigsten Median von 0,5 EEU/mg. Laminarin lag bei allen Untersuchungen (mit und ohne PB-Behandlung) unter der Nachweisgrenze und damit wurde definitionsgemäß zur statistischen Auswertung der Ergebnisse die Hälfte der unteren Nachweisgrenze verwendet.

Die Behandlung mit PB führte bei Curdlan und Paramylon zu einer Reduktion des Medianwertes der proinflammatorischen Aktivität und bei Zymosan zu einer Erhöhung des Medianwertes der proinflammatorischen Aktivität. Für die Glucane BarleyGlucan, Glucan aus Bäckerhefe und Laminarin war keine Veränderung der proinflammatorischen Aktivität nachweisbar. Insgesamt zeigte sich für die mit PB behandelten Glucane folgende Aktivitätsreihenfolge: Curdlan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > BarleyGlucan > Paramylon und Laminarin. Für Paramylon war aber im Gegensatz zu Laminarin auch nach Behandlung mit PB eine proinflammatorische Potenz nachweisbar. Somit war kein Unterscheid in der Reaktivitätsreihenfolge zwischen mit PB-behandelten und unbehandelten Glucanen nachweisbar.

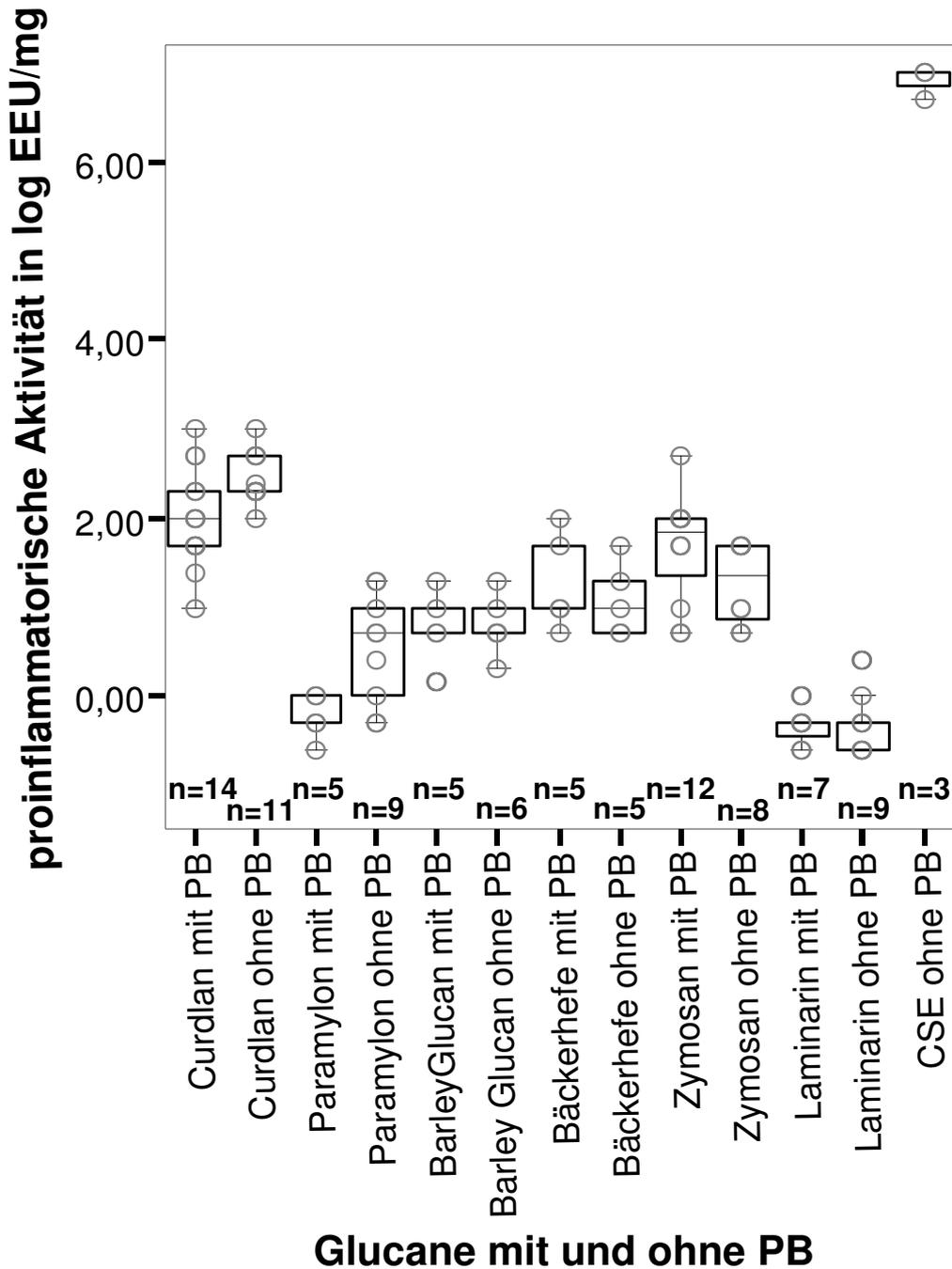


Abbildung 7: Proinflammatorische Aktivität von Glucanen mit und ohne Zusatz von Polymyxin B (PB) im Vollbluttest auf Grundlage der IL-1 β -Ausschüttung (Werte unter der Nachweisgrenze wurden mit der Hälfte der unteren Nachweisgrenze dargestellt.)

Tabelle 5: Proinflammatorische Aktivität von Glucanen mit und ohne Zusatz von Polymyxin B (PB) im Vollbluttest (IL-1 β -Ausschüttung)

Glucan		n	Median		Minimum		Maximum	
			EEU/mg	log EEU/mg	EEU/mg	log EEU/mg	EEU/mg	log EEU/mg
Curdlan	1	14	100,00	2,00	10,00	1,00	1000,00	3,00
	2	11	200,00	2,30	100,00	2,00	1000,00	3,00
Paramylon	1	5	0,50	-0,30	0,25	-0,60	1,00	0,00
	2	9	5,00	0,70	0,50	-0,30	20,00	1,30
BarleyGlucan	1	5	5,00	0,70	1,50	0,18	20,00	1,30
	2	6	5,00	0,70	2,00	0,30	20,00	1,30
Bäckerhefe	1	5	10,00	1,00	5,00	0,70	100,00	2,00
	2	5	10,00	1,00	5,00	0,70	50,00	1,70
Zymosan	1	12	75,00	1,85	5,00	0,70	500,00	2,70
	2	8	30,00	1,35	5,00	0,70	50,00	1,70
Laminarin	1	7	0,50	-0,30	0,25	-0,60	1,00	0,00
	2	9	0,50	-0,30	0,25	-0,60	2,50	0,40
CSE	2	3	1 x 10 ⁷	7,00	5 x 10 ⁶	6,70	1 x 10 ⁷	7,00

1 = mit PB-Zusatz

n = Anzahl der Bestimmungen

2 = ohne PB-Zusatz

4.1.2 Vergleich zwischen der glucaninduzierten IL-1 β und IL-6-Ausschüttung

In der Abbildung 8 und Tabelle 6 ist die proinflammatorische Aktivität verschiedener kommerziell erhältlicher Glucane anhand der IL-1 β - bzw. IL-6- Ausschüttung im humanen Vollbluttest dargestellt. Die Reihenfolge der Reaktivität bezogen auf die IL-6-Ausschüttung im humanen Vollbluttest war Curdlan > Glucan aus Bäckerhefe > BarleyGlucan > Paramylon > Laminarin und entspricht somit der Reaktivitätsreihenfolge bezogen auf die IL-1 β -Ausschüttung. Somit konnten keine Unterschiede in der Reaktivitätsreihenfolge der untersuchten Glucane zwischen IL-1 β - und IL-6-Ausschüttung im humanen Vollbluttest festgestellt werden.

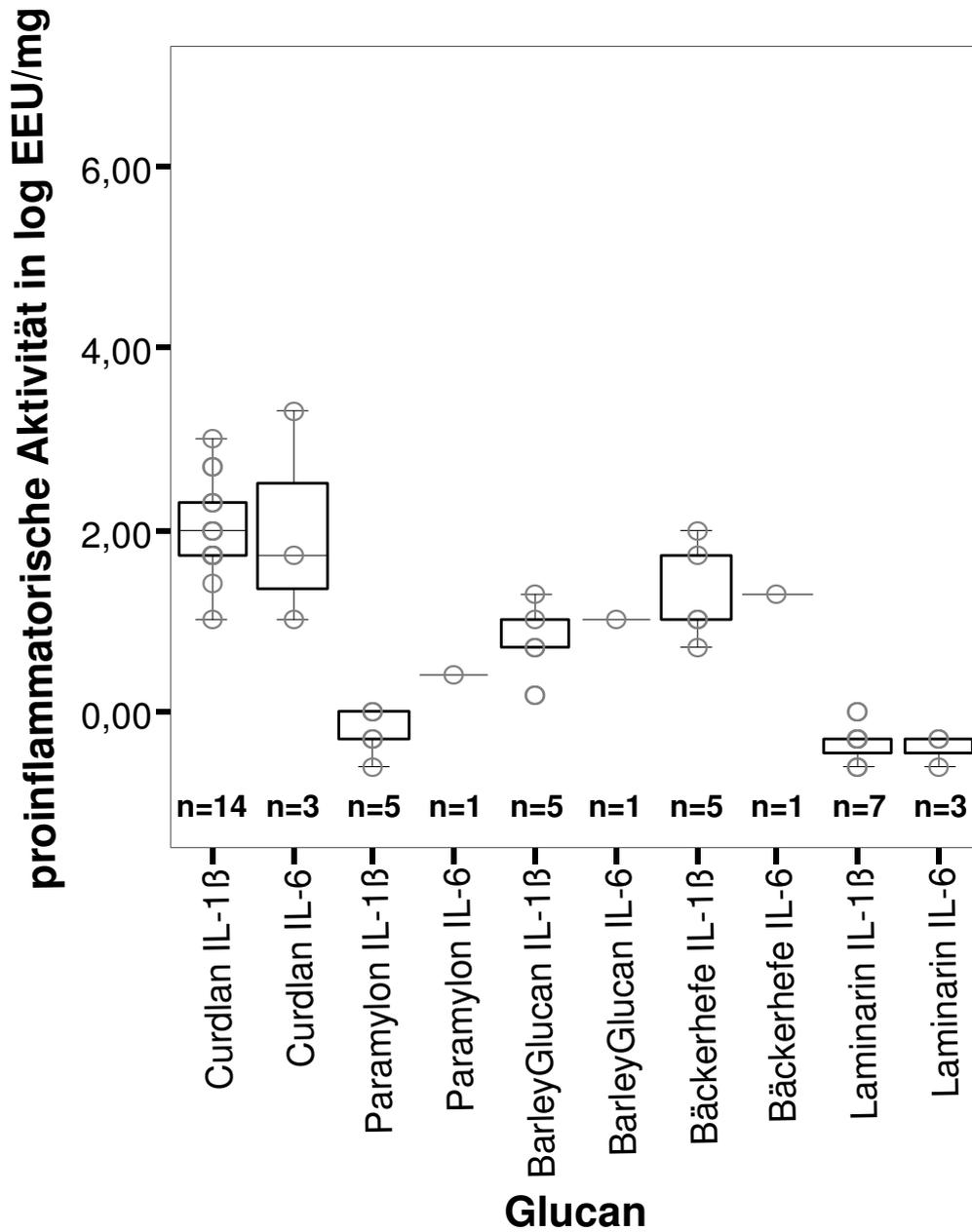


Abbildung 8: Vergleich der glucaninduzierten IL-1 β - und IL-6-Ausschüttung im Vollbluttest (Alle Untersuchungen fanden in Anwesenheit von PB statt, für Werte unter der Nachweisgrenze wurde die Hälfte der unteren Nachweisgrenze verwendet.)

Tabelle 6: Vergleich der glucaninduzierten IL-1 β - und IL-6-Ausschüttung im Vollbluttest (Alle Untersuchungen fanden in Anwesenheit von PB statt, für Werte unter der Nachweisgrenze wurde die Hälfte der unteren Nachweisgrenze verwendet.)

Glucan + PB		n	Median		Minimum		Maximum	
			EEU/mg	log EEU/mg	EEU/mg	log EEU/mg	EEU/mg	log EEU/mg
Curdlan	1	14	100,00	2,00	10,00	1,00	1000,00	3,00
	2	3	50,00	1,70	10,00	1,00	2000,00	3,30
Paramylon	1	5	0,50	-0,31	0,25	-0,60	1,00	0,00
	2	1	2,50	0,40	2,50	0,40	2,50	0,40
BarleyGlucan	1	5	5,00	0,70	1,50	0,18	20,00	1,30
	2	1	10,00	1,00	10,00	1,00	10,00	1,00
Bäckerhefe	1	5	10,00	1,00	5,00	0,70	100,00	2,00
	2	1	20,00	1,30	20,00	1,30	20,00	1,30
Laminarin	1	7	0,50	-0,30	0,25	-0,60	1,00	0,00
	2	3	0,50	-0,30	0,25	-0,60	0,50	-0,30

1 = IL-1 β -Ausschüttung 2 = IL-6-Ausschüttung n = Anzahl der Bestimmungen

4.1.3 Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die proinflammatorische Aktivität von Glucanen im Vollbluttest

Abbildung 9 und Tabelle 7 zeigen den Einfluss der NaOH-Behandlung auf die proinflammatorische Aktivität kommerziell erhältlicher Glucane. Bei Curdlan, Bäckerhefe, Zymosan und Laminarin ist kein Unterschied zwischen den mit NaOH-behandelten und den unbehandelten Glucanen feststellbar. Die Unterschiede bei Paramylon, das nach NaOH-Behandlung eine höhere proinflammatorische Potenz als das unbehandelte Paramylon zeigte und BarleyGlucan, das nach NaOH-Behandlung eine niedrigere proinflammatorische Potenz aufwies als das unbehandelte BarleyGlucan, lagen mit einem maximalen Unterschied von einer Zehnerpotenz innerhalb der üblichen Schwankungsbreite des Testsystems (s. Punkt 3.1.2.3.1). Die Durchführung einer statistischen Auswertung war aufgrund der geringen Fallzahl nicht sinnvoll. Es konnte somit im humanen Vollbluttest keine Veränderung der proinflammatorischen Aktivität kommerziell erhältlicher Glucane durch die Vorbehandlung mit NaOH nachgewiesen werden.

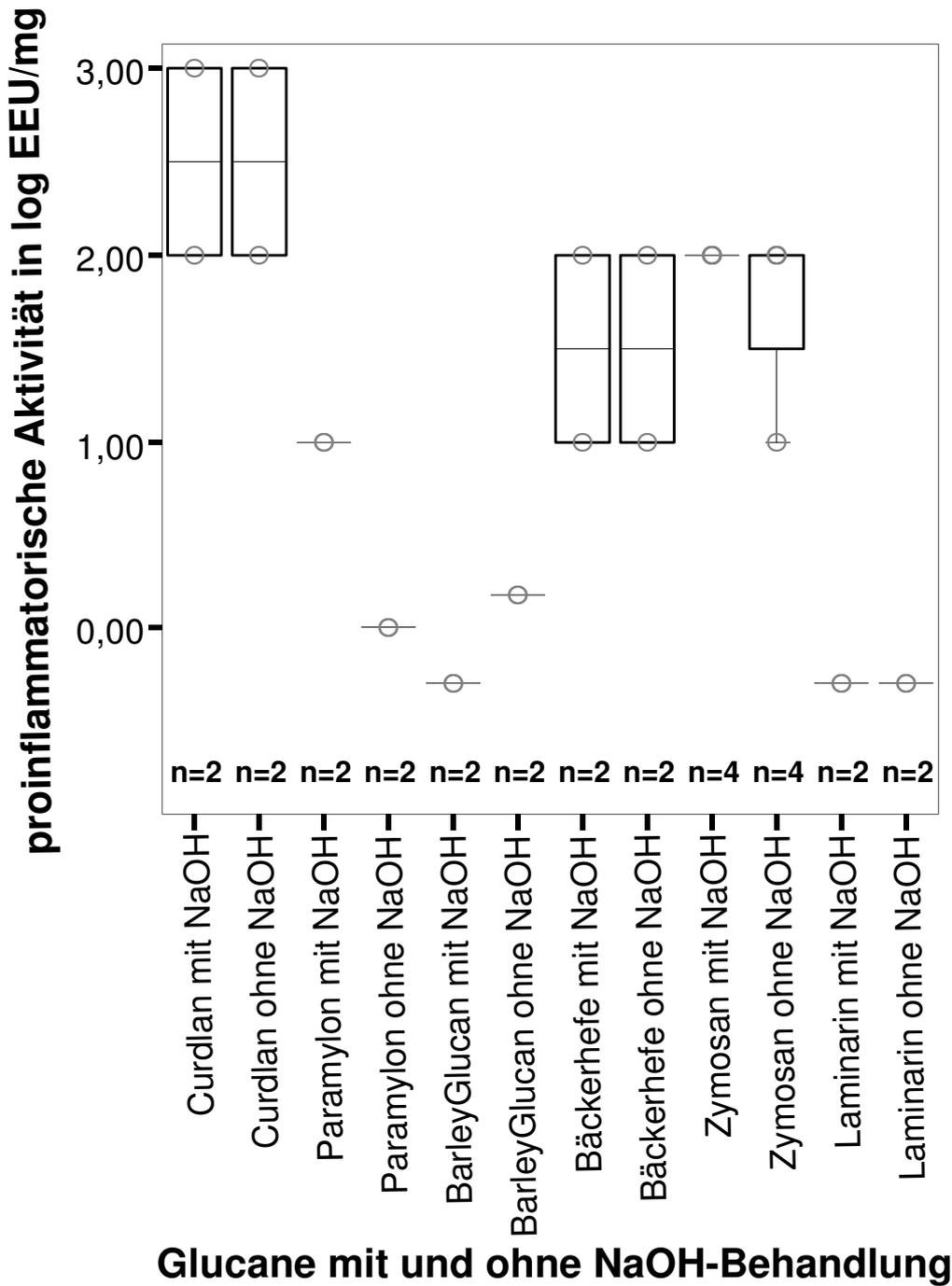


Abbildung 9: Einfluss der NaOH-Behandlung auf die proinflammatorische Aktivität verschiedener Glucane im Vollbluttest (Werte unter der Nachweisgrenze wurden mit der Hälfte der unteren Nachweisgrenze dargestellt.)

Tabelle 7: Einfluss der NaOH-Behandlung auf die proinflammatorische Aktivität im Vollbluttest (Werte unter der Nachweisgrenze wurden mit der Hälfte der unteren Nachweisgrenze dargestellt.)

Glucan + PB		n	Median		Minimum		Maximum	
			EEU/mg	log EEU/mg	EEU/mg	log EEU/mg	EEU/mg	log EEU/mg
Curdlan	1	2	550,00	2,50	100,00	2,00	1000,00	3,00
	2	2	550,00	2,50	100,00	2,00	1000,00	3,00
Paramylon	1	2	10,00	1,00	10,00	1,00	10,00	1,00
	2	2	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	0,00
BarleyGlucan	1	2	0,50	-0,30	0,50	-0,30	0,50	-0,30
	2	2	1,50	0,18	1,50	0,18	1,50	0,18
Bäckerhefe	1	2	55,00	1,50	10,00	1,00	100,00	2,00
	2	2	55,00	1,50	10,00	1,00	100,00	2,00
Zymosan	1	4	100,00	2,00	100,00	2,00	100,00	2,00
	2	4	100,00	2,00	10,00	1,00	100,00	2,00
Laminarin	1	2	0,50	-0,30	0,50	-0,30	0,50	-0,30
	2	2	0,50	-0,30	0,50	-0,30	0,50	-0,30

1 = mit NaOH

2 = ohne NaOH

n = Anzahl der Bestimmungen

4.2 Aktivitäten von Glucanen in einem glucanspezifischen LAL-Test

4.2.1 Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die Aktivität von Glucanen in einem glucanspezifischen LAL-Test

In Abbildung 10 und 11 und Tabelle 8 ist der Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die Reaktivität von kommerziell erhältlichen Glucanen im glucanspezifischen LAL-Test ersichtlich. Ohne Behandlung mit NaOH konnte folgende Reaktivität im glucanspezifischen LAL-Test ermittelt werden: Laminarin >> BarleyGlucan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > Paramylon > Curdlan. Bei fünf der sechs untersuchten Glucane führte die Behandlung mit NaOH zu einer deutlich höheren Aktivität dieser Substanzen. Aufgrund der geringen Fallzahl war eine statistische Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen mit NaOH-behandelten und unbehandelten Glucanen nicht sinnvoll. Aus der Tabelle 8 und der Abbildung 10 wird außerdem deutlich, dass die NaOH-Behandlung bei Laminarin im Gegensatz zu den anderen untersuchten Glucanen nicht zu einer Steigerung der gemessenen Pachymanaktivität führte.

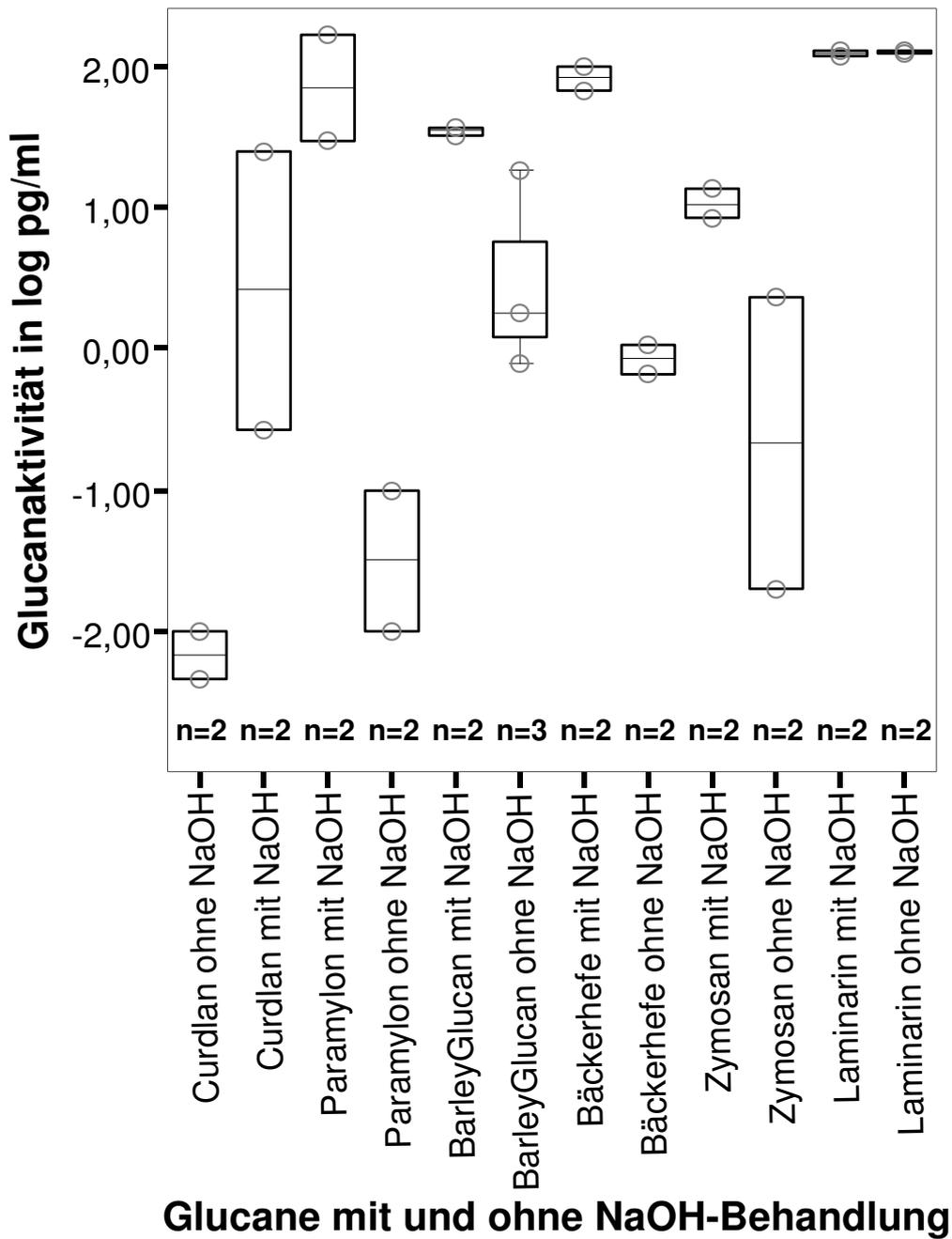


Abbildung 10: Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die Reaktivität von Glucanen im glucanspezifischen LAL-Test (Angegeben ist die Aktivität in pg/ml bezogen auf das Standardglucan Pachyman, die von 1 ng/ml Glucan ausgelöst wird.)

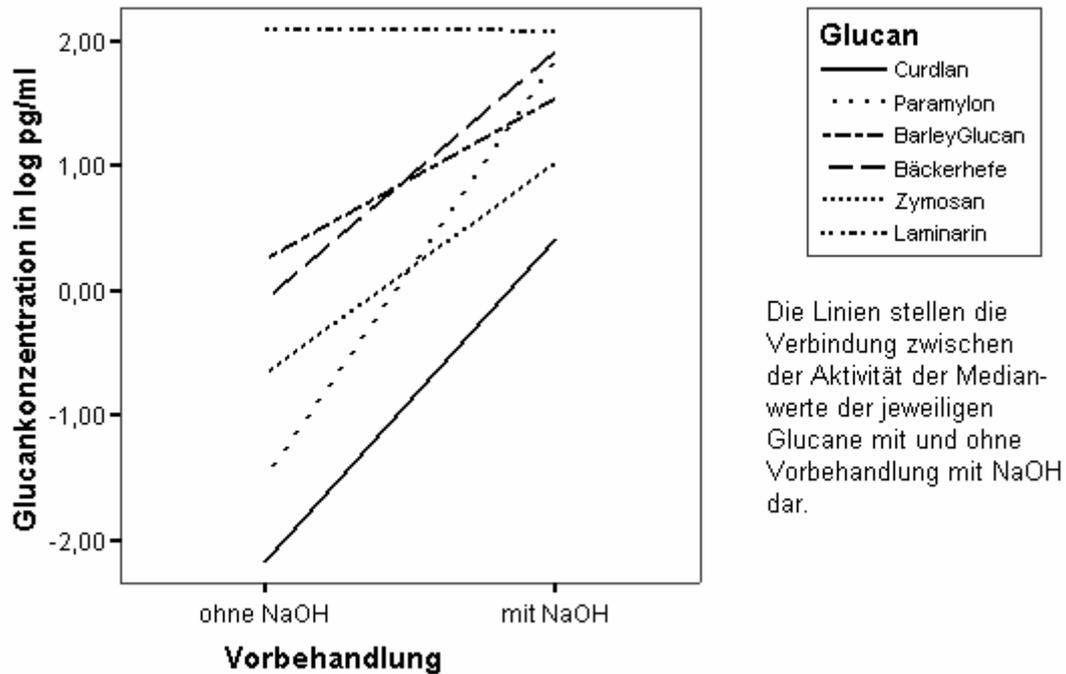


Abbildung 11: Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die Reaktivität von Glucanen im glucanspezifischen LAL-Test (Angegeben ist die Glucankonzentration in log pg/ml, die der Aktivität von 1 ng/ml Pachyman entspricht.)

Tabelle 8: Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die Reaktivität von Glucanen im glucanspezifischen LAL-Test, angegeben ist die Glucankonzentration in pg/ml bzw. in log pg/ml, die der Aktivität von 1 ng/ml Pachyman entspricht

Glucan	n		Aktivität					
			Median		Minimum		Maximum	
			pg/ml	log pg/ml	pg/ml	log pg/ml	pg/ml	log pg/ml
Curdlan	1	2	12,40	0,41	0,27	-0,57	24,53	1,39
	2	2	0,007	-2,17	0,00	-2,35	0,01	-2,00
Paramylon	1	2	99,10	1,85	29,77	1,47	168,42	2,23
	2	2	0,055	-1,50	0,01	-2,00	0,10	-1,00
BarleyGlucan	1	2	34,69	1,54	32,18	1,51	37,19	1,57
	2	3	1,78	0,25	0,78	-0,11	18,13	1,26
Bäckerhefe	1	2	84,05	1,92	67,59	1,83	100,50	2,00
	2	2	0,87	-0,72	0,67	-0,17	1,07	0,03
Zymosan	1	2	10,83	1,02	8,30	0,92	13,36	1,13
	2	2	1,18	-0,66	0,02	-1,70	2,34	0,37
Laminarin	1	2	121,39	2,08	116,26	2,07	126,52	2,10
	2	2	125,64	2,10	122,49	2,09	128,78	2,11

1 = mit NaOH

2 = ohne NaOH

n = Anzahl der Bestimmungen

4.3 Konzentration an einatembaren Staub, Glucanen, Endotoxinen, Schimmelpilzen und Bakterien in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen sowie deren proinflammatorische Potenz

4.3.1 Vorversuche zur Anwendung des glucanspezifischen LAL-Test zur Glucanbestimmung in Bioaerosolproben

Die Abbildung 12 zeigt den Einfluss verschiedener Aufbereitungsverfahren auf den im glucanspezifischen LAL-Test gemessenen Glucangehalt. Bei drei der vier Proben konnte nach der Behandlung mit NaOH der höchste Gehalt nachgewiesen werden, während die unbehandelten Proben zu den niedrigsten Ergebnissen führten. Der Unterschied zwischen den unbehandelten Proben und den mit NaOH-aufbereiteten Proben war im Wilcoxon-Test statistisch signifikant. Der Einfluss der Autoklavierungsdauer war unterschiedlich. Die Autoklavierungsdauer von 60 min lieferte in einer Untersuchung den höchsten gemessenen Glucanwert, in einer Untersuchung den zweihöchsten Wert und in zwei Untersuchungen den zweitniedrigsten Glucanwert im Vergleich mit den anderen Aufbereitungsmethoden. Die Autoklavierungsdauer von 15 Minuten lieferte im Vergleich mit den anderen Aufbereitungsmethoden zweimal den zweihöchsten und zweimal den zweitniedrigsten gemessenen Glucanwert. Somit konnte in den durch Autoklavierung vorbehandelten Proben immer ein höherer Glucanwert als in den unbehandelten Proben nachgewiesen werden, aber nur in einem Fall ein höherer Wert als nach Vorbehandlung mit NaOH.

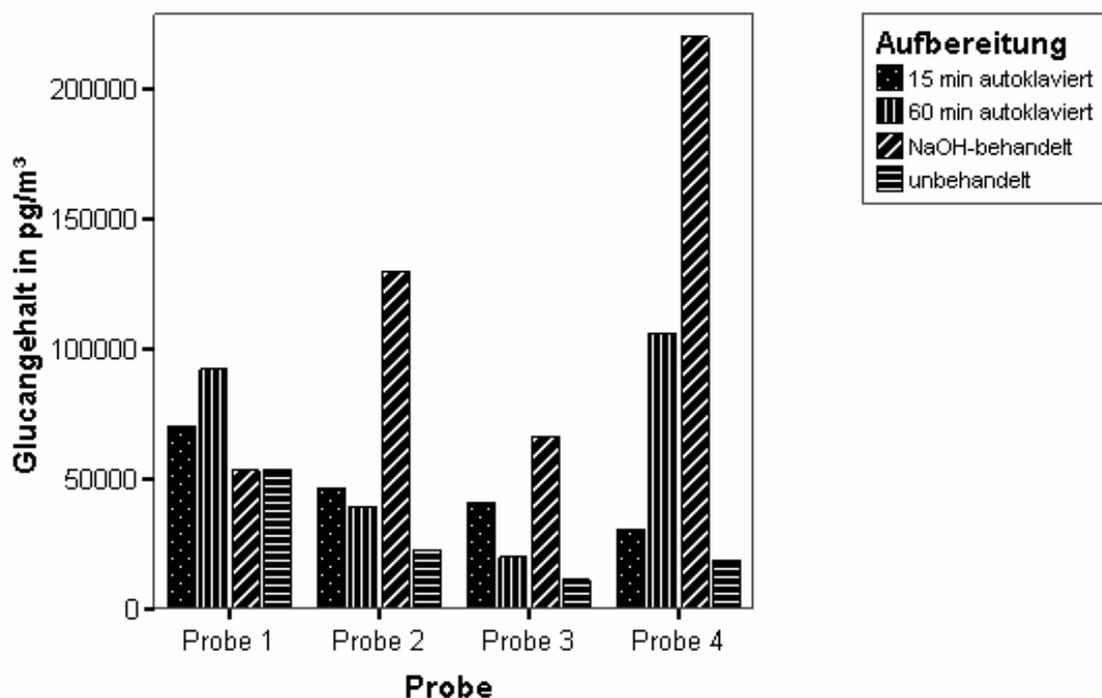


Abbildung 12: Einfluss verschiedener Aufbereitungsverfahren auf den mittels eines glucanspezifischen LAL-Tests nachweisbaren Glucangehalt in Bioaerosolproben

4.3.2 Konzentration an einatembaren Staub, Glucanen, Endotoxinen, Schimmelpilzen und Bakterien in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen sowie die proinflammatorische Potenz dieser Proben

In Tabelle 9 sind die Glucan- und Schimmelpilzkonzentrationen sowie der Gesamtstaubgehalt aus verschiedenen Tierställen aufgeführt. Dabei schwankten die Werte in Abhängigkeit von der Tierart und der Einstreu. Die Schimmelpilzkonzentration war in Ställen mit Einstreu mit einem Medianwert von $1,1 \times 10^4$ KBE/m³ höher als in den einstreulosen Ställen mit einem Medianwert von $1,2 \times 10^2$ KBE/m³ (s. Abbildung 15). Dieser Einfluss war beim Glucangehalt mit einem Median von $7,4 \times 10^4$ pg/m³ für einstreulose Ställe und $9,7 \times 10^4$ pg/m³ nicht feststellbar wie Abbildung 14 zeigt. Allerdings weisen die Ergebnisse auf tierartige Unterschiede beim luftgetragenen Glucangehalt hin (s. Abbildung 13). Es konnten in den Pferdeställen mit einem Medianwert von $4,5 \times 10^5$ pg/m³ und den Geflügelställen mit einem Medianwert von $1,3 \times 10^5$ pg/m³ die höchsten Glucangehalte nachgewiesen werden. Die niedrigsten Glucangehalte mit einem Medianwert von $1,7 \times 10^3$ pg/m³ wurden in dem Schafstall gemessen.

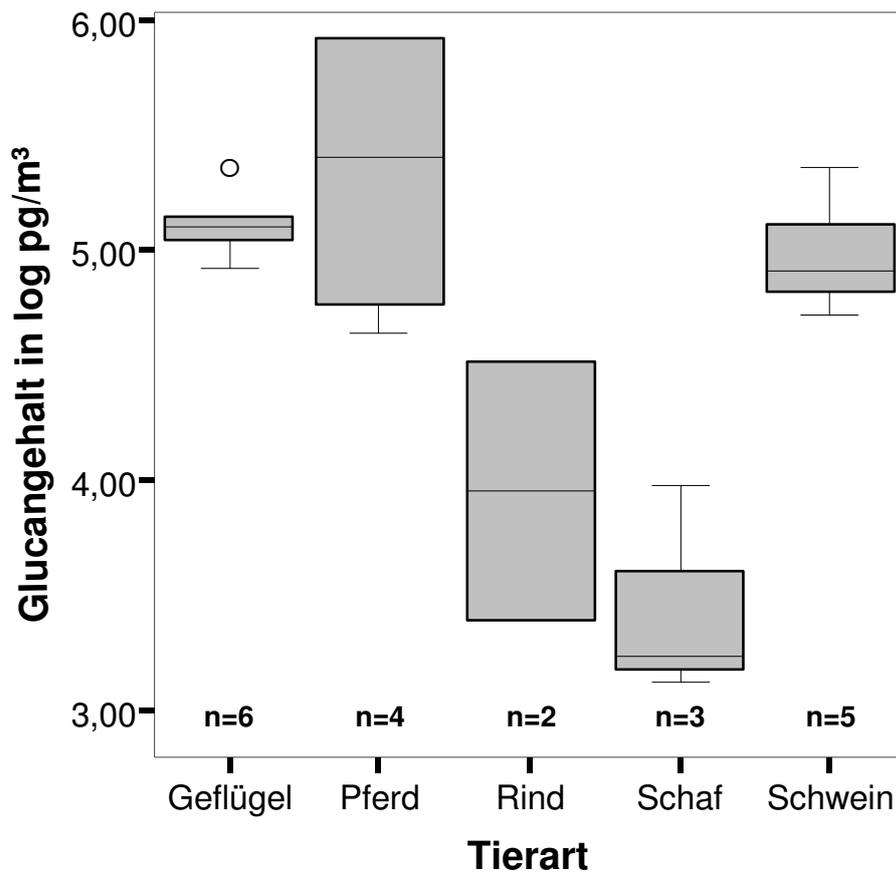


Abbildung 13: Luftgetragener Glucangehalt in verschiedenen Tierställen differenziert nach Tierarten (n = Anzahl der Untersuchungen bei der jeweiligen Tierart)

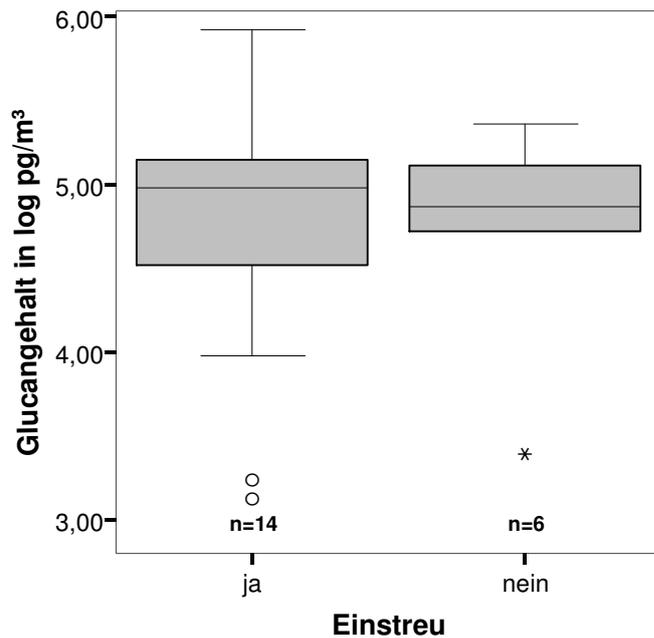


Abbildung 14: Luftgetragener Glucangehalt in verschiedenen Tierställen differenziert nach Ställen mit und ohne Einstreu (n= Anzahl der Untersuchungen in Tierställen mit bzw. ohne Einstreu)

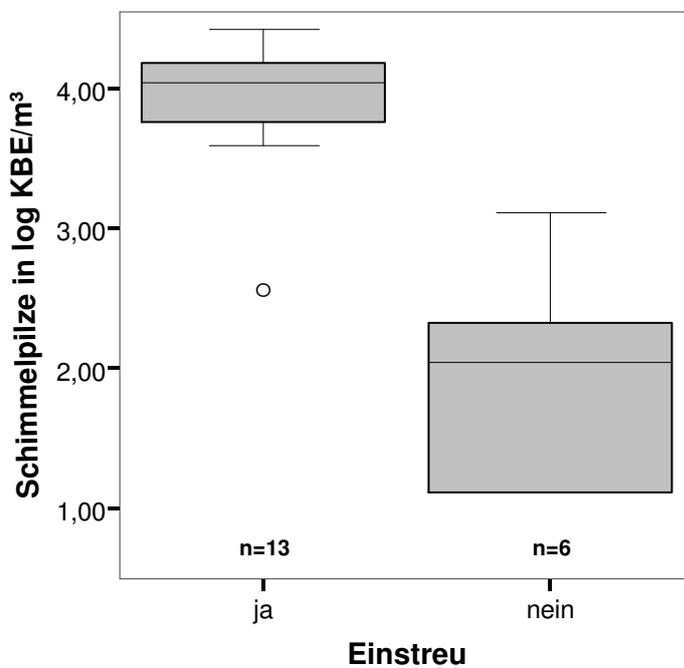


Abbildung 15: Luftgetragene Schimmelpilzkonzentration in verschiedenen Tierställen aufgeteilt nach Ställen mit und ohne Einstreu (n= Anzahl der Untersuchungen in Tierställen mit bzw. ohne Einstreu)

Ergebnisse

Tabelle 9: Gesamtstaub, Glucan- und Schimmelpilzkonzentration in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen

Nr.	Tierart	Einstreu	Glucan-konzentration		Schimmelpilz-konzentration		einatembarer Staub	
			pg/m ³	log pg/m ³	KBE/m ³	log KBE/m ³	mg/m ³	log mg/m ³
1	Schwein	keine	5,3x10 ⁴	4,72	1,5x10 ²	2,18	3,2	0,51
2	Schwein	keine	6,6x10 ⁴	4,82	1,3x10 ¹	1,11	2,4	0,38
3	Schwein	keine	1,3x10 ⁵	5,11	1,3x10 ¹	1,11	3,2	0,51
4	Schwein	keine	2,3x10 ⁵	5,36	8,0x10 ¹	1,90	1,8	0,26
5	Schwein	keine	8,1x10 ⁴	4,91	2,1x10 ²	2,32	1,4	0,15
6	Pferd	Stroh	8,4x10 ⁵	5,92	1,5x10 ⁴	4,18	1,9	0,28
7	Pferd	Stroh	8,2x10 ⁵	5,91	1,5x10 ⁴	4,18	2,0	0,30
8	Pferd	Stroh	7,7x10 ⁴	4,89	8,5x10 ³	3,93	0,66	-0,18
9	Pferd	Stroh	4,4x10 ⁴	4,64	2,6x10 ⁴	4,41	0,66	-0,18
10	Geflügel	Sägemehl	1,4x10 ⁵	5,15	5,9x10 ³	3,77	20,95	1,32
11	Geflügel	Sägemehl	2,3x10 ⁵	5,36	1,1x10 ⁴	4,04	19,35	1,29
12	Geflügel	Sägemehl	1,3x10 ⁵	5,11	5,7x10 ³	3,76	9,78	0,99
13	Geflügel	Sägemehl	8,4x10 ⁴	4,92	4,5x10 ³	3,65	8,25	0,92
14	Geflügel	Sägemehl	1,1x10 ⁵	5,04	3,9x10 ³	3,59	3,2	0,51
15	Geflügel	Sägemehl	1,2x10 ⁵	5,08	3,7x10 ²	2,57	4,3	0,63
16	Schaf	Stroh	1,3x10 ³	3,13	1,3x10 ⁴	4,11	0,32	-0,18
17	Schaf	Stroh	1,7x10 ³	3,23	1,1x10 ⁴	4,04	0,16	-0,80
18	Schaf	Stroh	9,5x10 ³	3,98	n.u.	n.u.	0,06	-1,22
19	Rind	Stroh	3,3x10 ⁴	4,52	1,7x10 ⁴	4,22	0,95	-0,02
20	Rind	keine	2,5x10 ³	3,40	1,3x10 ³	3,11	0,16	-0,80
	Minimum		1,3x10 ³	3,13	1,3x10 ¹	1,11	0,06	-1,22
	Maximum		8,4x10 ⁵	5,92	2,6x10 ⁴	4,41	20,95	1,32
	Median		8,3x10 ⁴	4,92	5,7x10 ³	3,76	1,95	0,29

n. U. = nicht untersucht

In der Abbildung 16 sind die Beziehungen des luftgetragenen Schimmelpilz- und Glucangehalt in den untersuchten Tierställen in Form eines Streudiagramms dargestellt. Signifikante Korrelationen nach Spearman konnten zwischen diesen beiden Parametern nicht festgestellt werden.

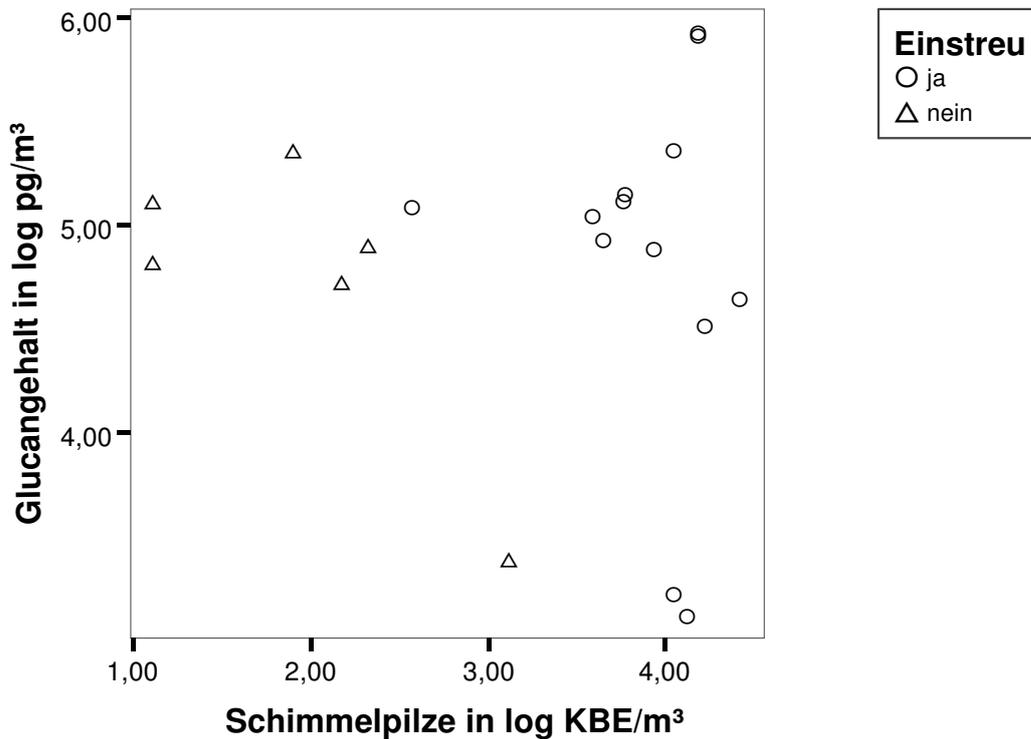


Abbildung 16: Streudiagramm zur Darstellung der Beziehungen zwischen Schimmelpilz- und Glucangehalten in der Stallluft differenziert nach Ställen mit und ohne Einstreu

Tabelle 10 zeigt den Endotoxingehalt, die Gesamtkoloniezahl, die gram-negative Gesamtkoloniezahl und die proinflammatorische Potenz des Gesamtstaubes mit und ohne Vorbehandlung mit PB. Es sind Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten und den einstreuhaltigen und einstreulosen Ställen erkennbar.

In den Geflügelställen konnten in der Stallluft die höchsten Endotoxinkonzentrationen und die höchste Gesamtkoloniezahl gemessen werden (Median $1,5 \times 10^3$ KBE/m³ bzw. $2,5 \times 10^6$ KBE/m³). Am niedrigsten war der Endotoxingehalt im Schafstall mit einem Median von 4,6 EU/m³. Die niedrigste Gesamtkoloniezahl war in den Rinderställen mit einem Median von $9,2 \times 10^4$ KBE/m³ messbar. Die höchste Konzentration an gram-negativen Keimen wurde in Rinderställen nachgewiesen (Median $3,6 \times 10^2$ KBE/m³). Mit einem Median von $7,1 \times 10^0$ KBE/m³ war dieser Parameter in den Schweineställen am niedrigsten (s. Abbildung 21). Die proinflammatorische Potenz des einatembaren Staubs konnte in allen Proben durch den Zusatz des Endotoxininhibitors PB deutlich gehemmt werden, wie die Medianwerte von 455,47 EEU/m³ ohne Zusatz von PB und 69,44 EEU/m³ nach Zusatz von PB zeigen. Somit führte der Zusatz von PB zu einer durchschnittlichen Reduktion der proinflammatorischen Potenz um 85%.

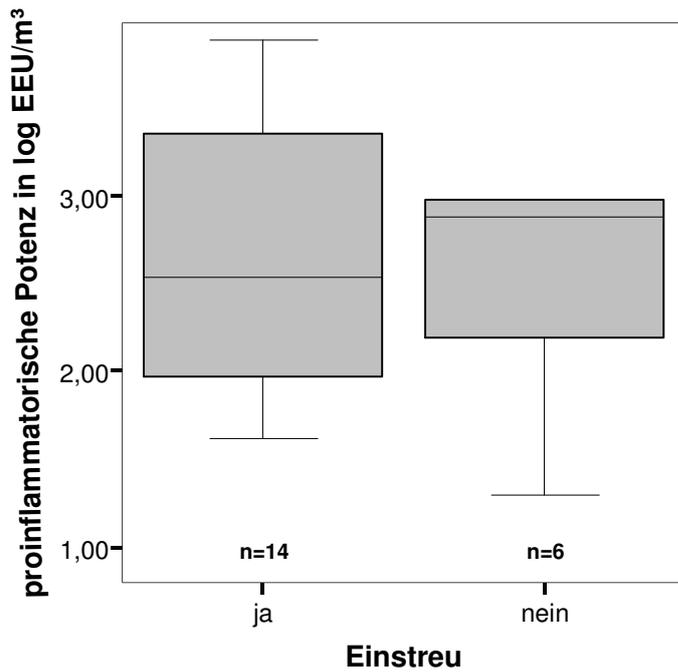


Abbildung 17: Proinflammatorische Potenz des einatembaren Staubes aus verschiedenen Tierställen differenziert nach Ställen mit und ohne Einstreu (n = Anzahl der Untersuchungen in Tierställen mit bzw. ohne Einstreu)¹

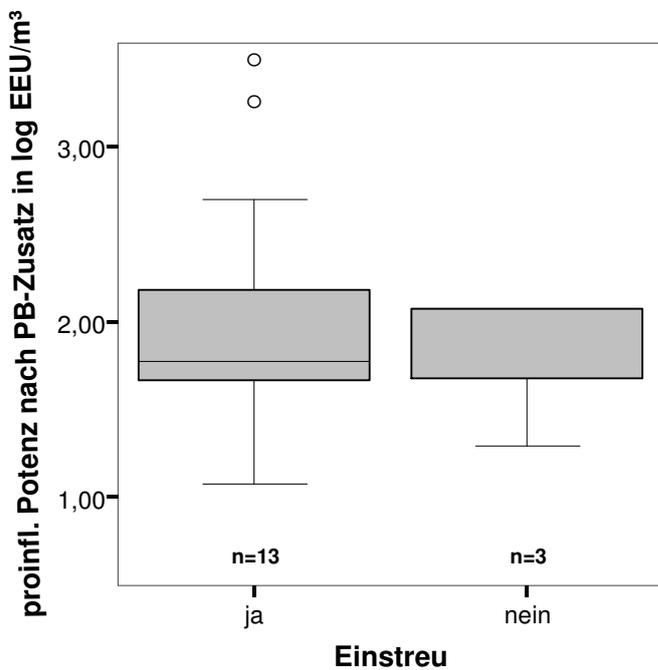


Abbildung 18: Nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Potenz des einatembaren Staubes aus verschiedenen Tierställen differenziert nach Ställen mit und ohne Einstreu (n = Anzahl der Untersuchungen in Tierställen mit und ohne Einstreu)¹

¹ Die Untersuchungsergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Eckardt zur Verfügung gestellt.

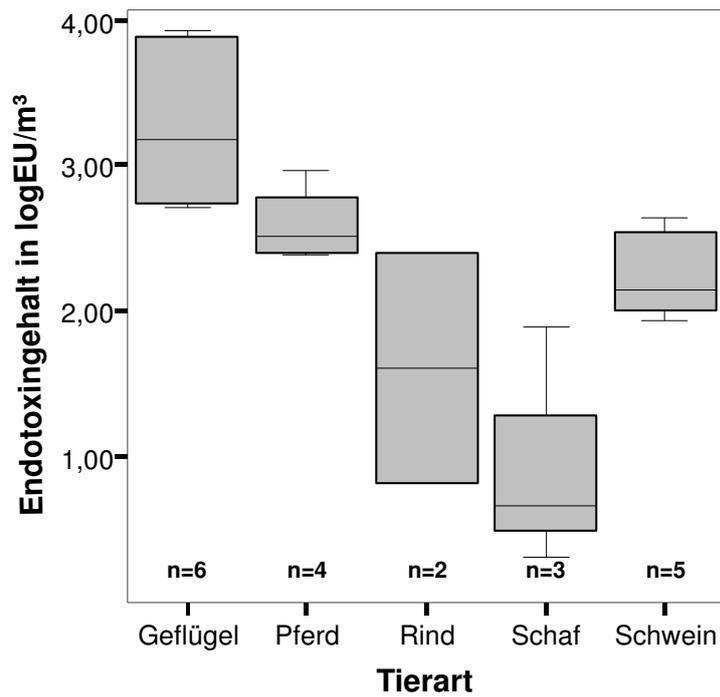


Abbildung 19: Luftgetragene Endotoxinkonzentration in verschiedenen Tierställen differenziert nach Tierarten (n = Anzahl der Untersuchungen bei der jeweiligen Tierart)

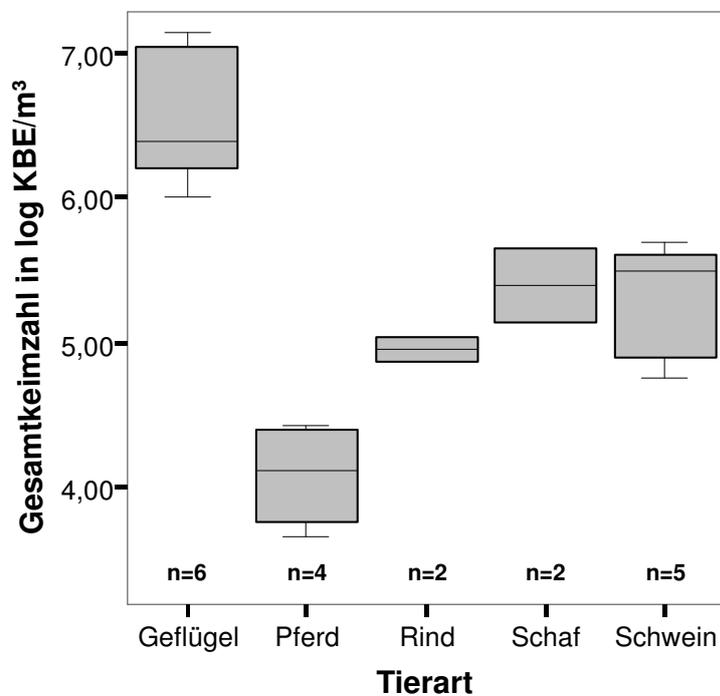


Abbildung 20: Luftgetragene Gesamtkeimzahl in verschiedenen Tierställen differenziert nach Tierarten (n= Anzahl der Untersuchungen bei der jeweiligen Tierart)

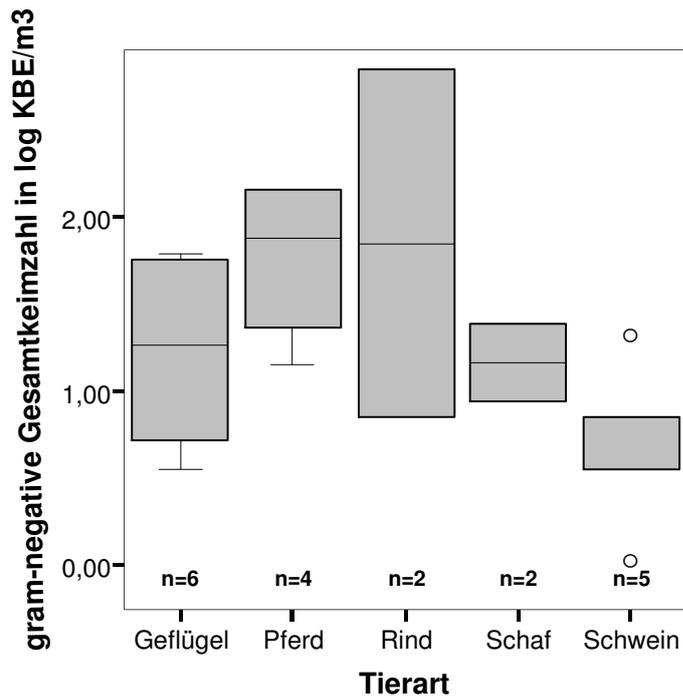


Abbildung 21: Luftgetragene gram-negative Gesamtkeimzahl in verschiedenen Tierställen differenziert nach Tierarten (n = Anzahl der Untersuchungen bei der jeweiligen Tierart)

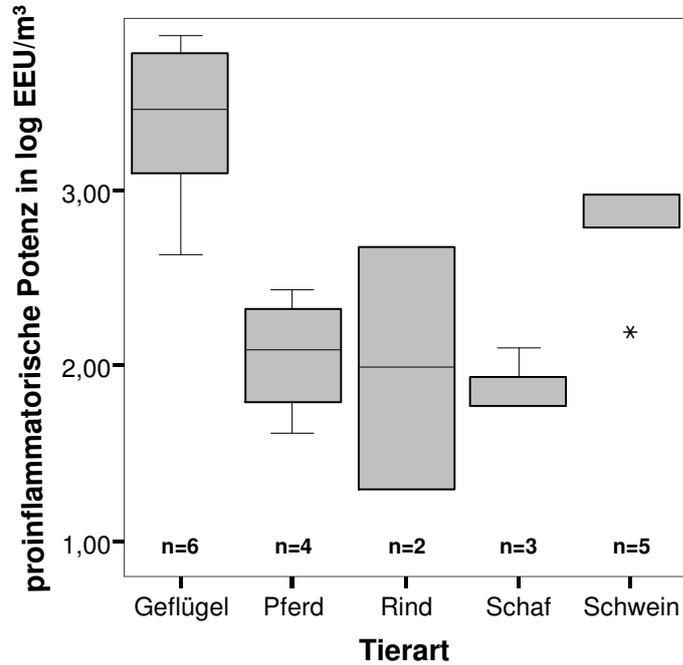


Abbildung 22: Proinflammatorische Potenz des einatembaren Staubes aus verschiedenen Tierställen differenziert nach Tierarten (n = Anzahl der Untersuchungen bei der jeweiligen Tierart)¹

¹ Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Eckardt zur Verfügung gestellt

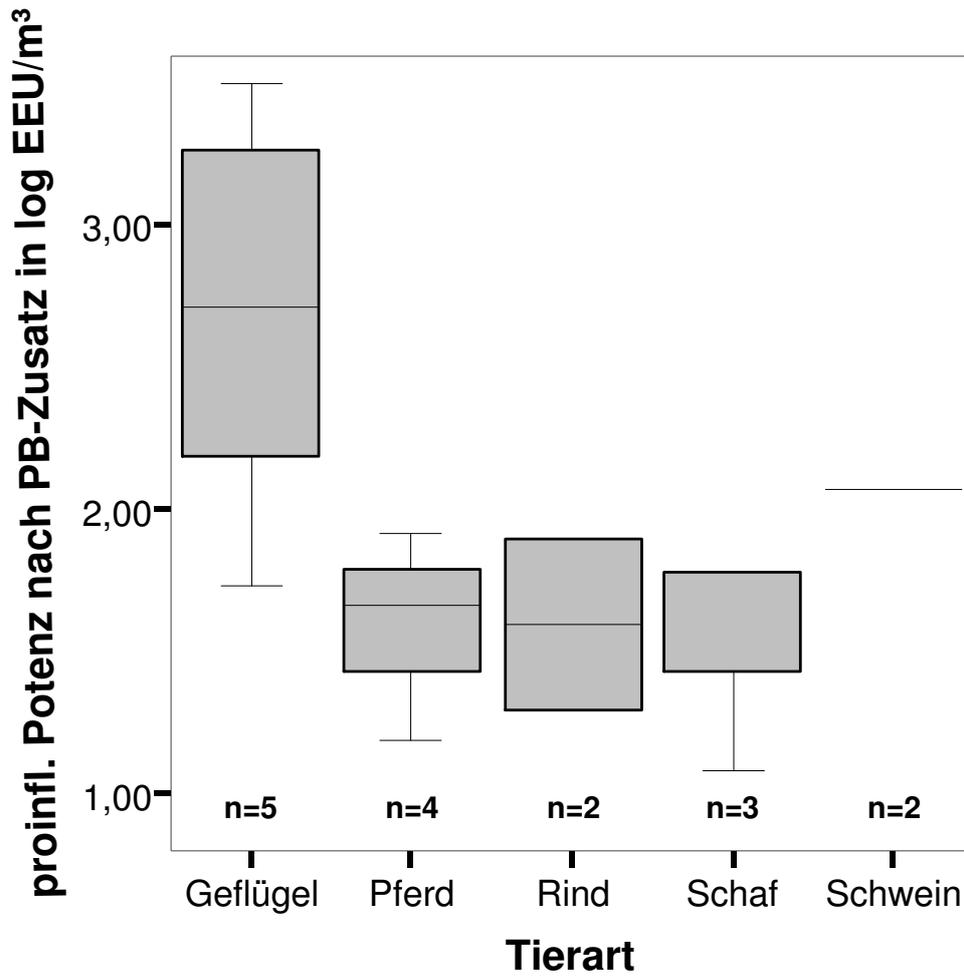


Abbildung 23: Nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Potenz des einatembaren Staubes aus verschiedenen Tierställen differenziert nach Tierarten (n = Anzahl der Untersuchungen bei der jeweiligen Tierart)¹

¹ Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Eckardt zur Verfügung gestellt

Tabelle 10: Endotoxinkonzentration, Gesamtkoloniezahl, gram-negative Gesamtkoloniezahl und die Konzentration an proinflammatorisch aktiven Stoffen in Bioaerosolen aus verschiedenen Tierställen

Nr.	Tierart	Endotoxin-konzentration			Gesamtkolonie-zahl		Gram-negative Gesamtkoloniezahl		Proinflammatorische Potenz ¹		Proinflammatorische Potenz + PB ¹	
		pg/m ³	EU/m ³	log EU/m ³	KBE/m ³	log KBE/m ³	KBE/m ³	log KBE/m ³	EEU/m ³	log EEU/m ³	EEU/m ³	log EEU/m ³
1	Schwein	3,5 x 10 ⁴	3,5 x 10 ²	2,54	7,9 x 10 ⁴	4,90	7,1 x 10 ⁰	0,85	952,35	2,98	119,00	2,08
2	Schwein	4,4 x 10 ⁴	4,4 x 10 ²	2,64	4,0 x 10 ⁵	5,60	2,1 x 10 ¹	1,33	952,35	2,98	119,00	2,08
3	Schwein	1,4 x 10 ⁴	1,4 x 10 ²	2,15	5,8 x 10 ⁴	4,76	3,5 x 10 ⁰	0,55	952,35	2,98	n.a.	n.a.
4	Schwein	1,0 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	2,00	5,0 x 10 ⁵	5,70	7,1 x 10 ⁰	0,85	153,60	2,19	n.a.	n.a.
5	Schwein	8,6 x 10 ³	8,6 x 10 ¹	1,93	3,1 x 10 ⁵	5,49	1,1 x 10 ¹	0,03	611,15	2,79	n.a.	n.a.
6	Pferd	9,2 x 10 ⁵	9,2 x 10 ³	2,96	2,7 x 10 ⁴	4,43	1,5 x 10 ²	2,16	274,70	2,44	45,70	1,66
7	Pferd	3,9 x 10 ⁴	3,9 x 10 ²	2,59	2,4 x 10 ⁴	4,38	1,5 x 10 ²	2,16	93,40	1,97	46,70	1,67
8	Pferd	2,4 x 10 ⁴	2,4 x 10 ²	2,38	4,7 x 10 ³	3,67	1,4 x 10 ¹	1,15	164,20	2,22	82,10	1,91
9	Pferd	2,7 x 10 ⁴	2,7 x 10 ²	2,43	7,3 x 10 ³	3,86	3,9 x 10 ¹	1,59	41,00	1,61	15,50	1,19
10	Geflügel	7,7 x 10 ⁵	7,7 x 10 ³	3,89	1,1 x 10 ⁷	7,04	3,5 x 10 ⁰	0,55	6144,50	3,79	1843,50	3,27
11	Geflügel	8,4 x 10 ⁵	8,4 x 10 ³	3,92	1,4 x 10 ⁷	7,15	4,7 x 10 ¹	1,67	7619,00	3,88	3175,00	3,50
12	Geflügel	1,9 x 10 ⁵	1,9 x 10 ³	3,28	1,0 x 10 ⁶	6,00	6,1 x 10 ¹	1,79	434,75	2,64	54,30	1,73
13	Geflügel	5,4 x 10 ⁴	5,4 x 10 ²	2,73	2,5 x 10 ⁶	6,40	7,1 x 10 ⁰	0,85	3666,9	3,56	n.a.	n.a.
14	Geflügel	1,2 x 10 ⁵	1,2 x 10 ³	3,06	2,4 x 10 ⁶	6,38	5,3 x 10 ⁰	0,72	2267,55	3,36	510,20	2,71
15	Geflügel	5,1 x 10 ⁴	5,1 x 10 ²	2,71	1,6 x 10 ⁶	6,20	5,7 x 10 ¹	1,76	1242,20	3,09	155,30	2,19
16	Schaf	2,1 x 10 ²	2,1 x 10 ⁰	0,31	4,5 x 10 ⁵	5,65	8,8 x 10 ⁰	0,95	59,52	1,77	59,52	1,77
17	Schaf	4,6 x 10 ²	4,6 x 10 ⁰	0,66	1,4 x 10 ⁵	5,15	2,5 x 10 ¹	1,39	59,52	1,77	59,52	1,77
18	Schaf	7,8 x 10 ³	7,8 x 10 ¹	1,89	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	126,98	2,10	11,91	1,08
19	Rind	2,5 x 10 ⁴	2,5 x 10 ²	2,40	7,4 x 10 ⁴	4,87	7,1 x 10 ²	2,85	634,92	2,68	79,36	1,90
20	Rind	6,6 x 10 ²	6,6 x 10 ⁰	0,82	1,1 x 10 ⁵	5,04	7,1 x 10 ⁰	0,85	19,84	1,30	19,84	1,30
	Minimum	2,1 x 10 ²	2,1 x 10 ⁰	0,31	4,7 x 10 ³	3,67	1,1 x 10 ⁰	0,03	19,84	1,30	11,91	1,08
	Maximum	8,4 x 10 ⁵	8,4 x 10 ³	3,92	1,4 x 10 ⁷	7,15	7,7 x 10 ⁴	2,85	7619,00	3,88	3175,00	3,50
	Median	3,1 x 10 ⁴	3,1 x 10 ²	2,49	3,1 x 10 ⁵	5,50	1,4 x 10 ¹	1,15	445,47	2,66	69,44	1,84

n.a. = nicht auswertbar u.N. = unter der Nachweisgrenze n.u. = nicht untersucht

¹ Die Ergebnisse wurden freundlicherweise von Frau Eckardt zur Verfügung gestellt

4.4 Konzentrationen an Glucanen, Schimmelpilzen und Bakterien in potentiellen Glucanquellen aus verschiedenen Tierställen

Der Glucangehalt in den untersuchten potentiellen Glucanquellen lag zwischen 1,1 und 285,4 µg/g. Wie aus Tabelle 11 ersichtlich ist in der Legehennenhaltung das Futter als wichtige Glucanquelle anzusehen. Auch in der Reitpferdehaltung wurde der höchste Glucanwert für Hafer gemessen. Dieser Wert stellte mit 285,4 µg/g den höchsten gemessenen Wert dar. Im Schafstall war das Heu mit einer Glucankonzentration von 23,9 µg/g die wichtigste Glucanquelle. Der höchste Glucangehalt im Rinderstall wurde mit 53,5 µg/g in der Einstreu gemessen. Abbildung 24 zeigt im Überblick, dass die höchsten Werte in den Pflanzenmaterialien Heu, Stroh und Futter nachgewiesen wurden.

Der Schimmelpilzgehalt in den untersuchten Materialien lag zwischen $1,0 \times 10^2$ und 9×10^5 KBE/g. Dabei wurden besonders hohe Werte in der Größenordnung von 10^5 KBE/g tierartenunabhängig im Heu und Stroh nachgewiesen.

Die aerobe Gesamtkoloniezahl der untersuchten Materialien lag zwischen $3,5 \times 10^4$ und $2,2 \times 10^9$ KBE/g. Die höchsten Gehalte konnten dabei im Kot und der Stroheinstreu der Schafe und Rinder nachgewiesen werden.

Die aerobe gram-negative Gesamtkeimzahl lag zwischen $1,3 \times 10^4$ und $2,2 \times 10^8$ KBE/g. Die höchsten Werte in der Größenordnung von 10^8 KBE/g wurden dabei im Kot der Legehennen und Reitpferde nachgewiesen.

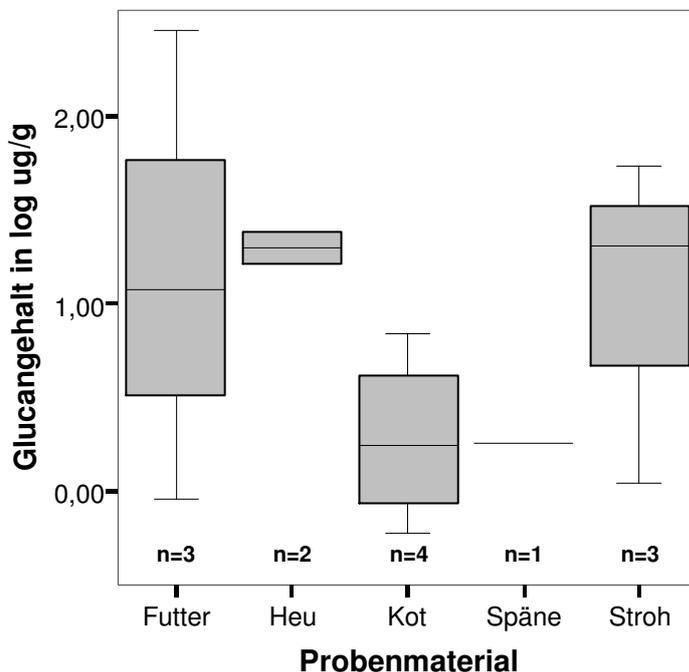


Abbildung 24: Glucangehalt in verschiedenen potentiellen Glucanquellen differenziert nach dem Probenmaterial (n = Anzahl der untersuchten Proben)

Tabelle 11: Glucan-, Schimmelpilz- und Bakterienkonzentration in potentiellen Glucanquellen

Nr.	Probenart	Tierart	Glucan- gehalt		Schimmel- pilzgehalt		Gesamt- koloniezahl		Gram-negative Gesamtkolonie zahl	
			µg/g	log µg/g	KBE/g	log KBE/g	KBE/g	log KBE/g	KBE/g	log KBE/g
1	Kot	Legehenne	6,8	0,83	$2,5 \times 10^4$	4,38	$1,0 \times 10^9$	6,00	$1,5 \times 10^8$	7,18
2	Futter	Legehenne	11,7	1,07	$5,3 \times 10^2$	2,72	$2,5 \times 10^5$	5,40	$1,3 \times 10^4$	4,11
3	Späne	Reitpferd	1,8	0,26	$2,9 \times 10^3$	3,46	$3,5 \times 10^4$	4,54	u. N.	u.N.
4	Stroh	Reitpferd	20,1	1,30	$2,8 \times 10^5$	5,45	$1,5 \times 10^6$	6,18	$3,9 \times 10^7$	6,59
5	Hafer	Reitpferd	285,4	2,46	$1,5 \times 10^4$	4,18	$6,3 \times 10^5$	4,80	$2,3 \times 10^6$	6,36
6	Heu	Reitpferd	16,2	1,21	$2,5 \times 10^5$	5,40	$1,5 \times 10^6$	6,18	$3,1 \times 10^6$	5,49
7	Kot	Reitpferd	2,5	0,40	$8,5 \times 10^3$	3,93	$1,0 \times 10^8$	8,00	$2,2 \times 10^8$	7,34
8	Stroh	Schaf	1,1	0,04	$8,5 \times 10^5$	5,93	$1,9 \times 10^9$	9,28	$3,5 \times 10^4$	4,54
9	Heu	Schaf	23,9	1,38	$9,0 \times 10^5$	5,95	$1,2 \times 10^6$	6,08	$2,7 \times 10^4$	4,43
10	Kot	Schaf	1,2	0,08	$1,0 \times 10^2$	2,00	$3,2 \times 10^8$	8,51	$5,0 \times 10^4$	4,70
11	Futter	Rind	0,9	-0,05	$3,5 \times 10^4$	4,54	$4,8 \times 10^6$	6,68	$2,0 \times 10^6$	6,30
12	Stroh	Rind	53,5	1,73	$2,6 \times 10^5$	5,41	$2,2 \times 10^9$	9,34	$6,5 \times 10^5$	5,81
13	Kot	Rind	0,6	-0,22	$3,5 \times 10^4$	4,54	$1,5 \times 10^8$	8,18	$8,8 \times 10^5$	5,94
	Minimum		0,6	-0,22	$1,0 \times 10^2$	2,00	$3,5 \times 10^4$	4,54	$1,3 \times 10^4$	4,11
	Maximum		285,4	2,46	$9,0 \times 10^5$	5,95	$2,2 \times 10^9$	9,34	$2,2 \times 10^8$	7,34
	Median		6,8	0,84	$3,5 \times 10^4$	4,54	$1,5 \times 10^6$	6,18	$7,7 \times 10^5$	5,88

In Abbildung 25 sind die Beziehungen zwischen Glucan- und Schimmelpilzgehalt in potentiellen Glucanquellen in Form eines Streudiagramms dargestellt. Es konnte keine signifikante Korrelation nach Spearman zwischen dem Schimmelpilz- und dem Glucangehalt in den verschiedenen potentiellen Glucanquellen aus den untersuchten Tierställen festgestellt werden. Der Korrelationskoeffizient (Spearman) beträgt: 0,228.

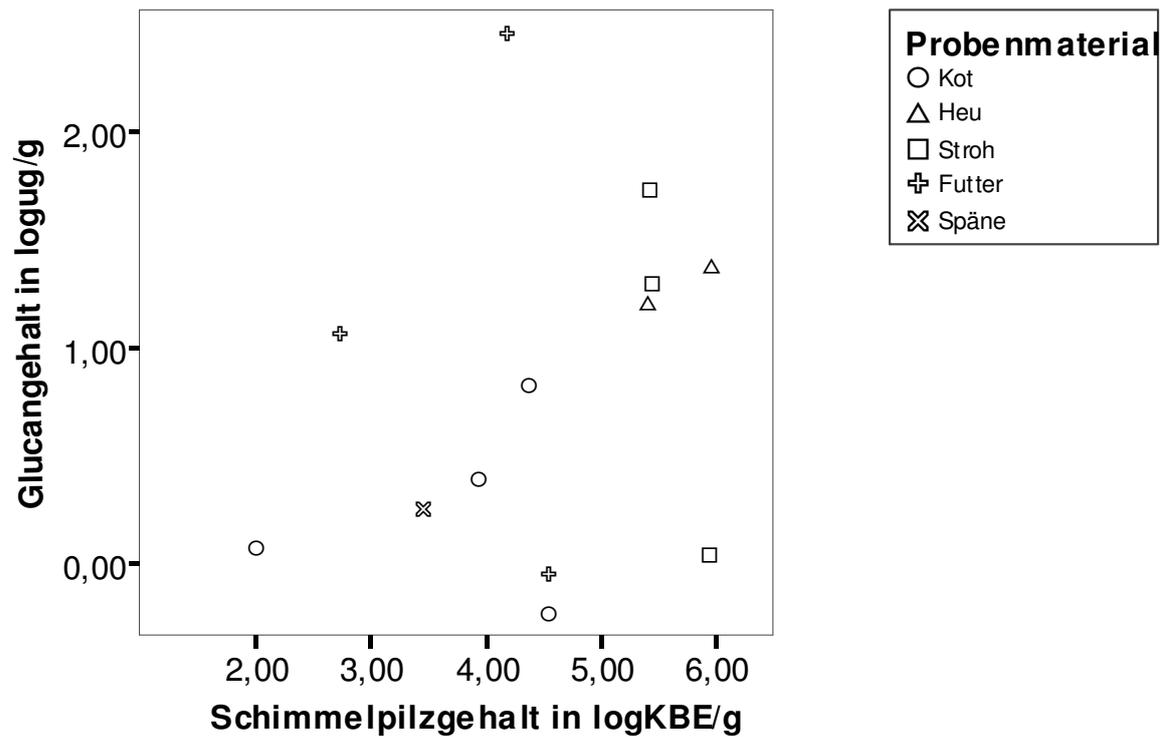


Abbildung 25: Streudiagramm zur Darstellung der Beziehungen zwischen Schimmelpilz- und Glucangehalt in potentiellen Glucanquellen in Abhängigkeit vom Probenmaterial

5 Diskussion

5.1 Proinflammatorische Potenz kommerziell erhältlicher Glucane

5.1.1 Struktur-Wirkungsbeziehungen

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung der proinflammatorischen Potenz kommerziell erhältlicher Glucane. Dafür wurde die proinflammatorische Aktivität verschiedener kommerziell erhältlicher Glucane anhand der IL-1 β -Ausschüttung in einem humanen Vollbluttest untersucht. Hierbei zeigte sich eine unterschiedlich starke proinflammatorische Aktivität der folgenden Reihenfolge: Curdlan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > BarleyGlucan > Paramylon > Laminarin (s. Tabelle 13). Diese Reaktivitätsunterschiede können anhand von Strukturunterschieden der verschiedenen Glucane erklärt werden. Besonders auffällig war, dass die proinflammatorische Aktivität von Laminarin in allen Untersuchungen unterhalb der unteren Nachweisgrenze des Vollbluttestes lag und somit in dem vorliegenden Testsystem keine proinflammatorische Aktivität für Laminarin nachgewiesen werden konnte. Dieses ist durch das geringe Molekulargewicht von 7×10^3 g/mol in Kombination mit einer Einfachhelix als Tertiärstruktur (Rice et al., 2004) zu erklären. Es erfolgt zwar eine Bindung des Laminarinmoleküls an den Glucanrezeptor, allerdings führt diese Bindung nicht zur Freisetzung des Nuklear Faktors κ_B und somit kommt es nicht zu einer Interleukinfreisetzung. Zur Freisetzung von IL-1 β und anderen Zytokinen nach Bindung an den Glucanrezeptor ist ein Molekulargewicht von mindestens 10^4 g/mol (Brown und Gordon, 2005) notwendig. Da die anderen untersuchten Glucane alle ein Molekulargewicht im Bereich von 10^5 g/mol haben führten sie zur Freisetzung von Zytokinen im Vollbluttest. Die unterschiedliche Stärke der Freisetzung ist in der Konformation und der daran gekoppelten verschieden großen Rezeptoraffinität der Glucane begründet. Für die biologische Aktivität ist neben dem Molekulargewicht hauptsächlich die Raumstruktur bedeutsam, in welcher sich die untersuchten Glucane unterscheiden. Dazu wird in der Literatur diskutiert, ob Glucane mit Verzweigungen, lineare Glucane oder Glucane als Dreifachhelix die größte biologische Aktivität haben (Czop und Austen, 1985b; Kulicke et al., 1997; Hirata et al., 1998; Cleary et al., 1999; Kataoka et al., 2002). Im humanen Vollbluttest zeigte Curdlan die höchste proinflammatorische Aktivität. Curdlan ist ein lineares β -1,3-D-Glucan mit einigen 1,6-Bindungen, dessen Tertiärstruktur eine Mischung aus einer Einfach- und Dreifachhelix (McIntosh et al., 2005) darstellt. Young et al. (2003) beschrieben, dass partiell geöffnete Konformationen der Dreifachhelix biologisch aktiver sind als intakte Dreifachhelices. Dieses bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse, da die proinflammatorische Aktivität von Curdlan höher war als die Aktivität von Bäckerhefe, einem verzweigten Glucan, das bei vergleichbarem Molekulargewicht, als Tertiärstruktur eine intakte Dreifachhelix ausbildet. Hierbei handelt es sich um die typische Tertiärstruktur verzweigter Glucane und die in der Natur am weitesten verbreitete Form (Mueller et al., 2000). Die nächsthöhere proinflammatorische Aktivität nach Curdlan wiesen die verzweigten β -1,3-D-Glucane Zymosan und Bäckerhefe auf. Die Glucane Zymosan und Glucan aus Bäckerhefe entsprechen sich in ihrem β -1,3-D-Glucan. Zymosan enthält allerdings zusätzlich noch einen Mannananteil. Mannan kann ebenfalls eine Zytokinausschüttung stimulieren, dies wird über den Mannoserezeptor vermittelt (Yamamoto et al., 1997; Tada et al., 2002) und von daher ist die proinflammatorische Aktivität von Zymosan höher als von Glucan aus

Bäckerhefe alleine (Williams et al., 1986; Tada et al., 2002). Da die Konformation von Zymosan und Glucan aus Bäckerhefe (intakte Dreifachhelix) jedoch weitaus starrer als die von Curdlan (partiell geöffnete Konformation der Dreifachhelix) ist, ist deren biologische Aktivität geringer. In der Reaktivitätsreihenfolge schließt sich dann BarleyGlucan an. Bei der Einordnung der Reaktivität von BarleyGlucan ist neben der Konformation der Dreifachhelix zusätzlich zu beachten, dass es sich bei BarleyGlucan um ein β -1,3-1,4-Glucan handelt. Mueller et al. (2000) beschrieben eine Spezifität des Glucanrezeptors für β -1,3-Glucane und dass dieser Rezeptor auf U 937-Zellen kein BarleyGlucan bindet. Czop und Austen (1985b) dagegen beschrieben eine Bindung des β -1,3-1,4 BarleyGlucans an den Rezeptor für β -1,3-Glucane. Die vorliegenden Untersuchungen zeigten eine Stimulation der Zytokinausschüttung durch BarleyGlucan, die allerdings geringer war als die anderer Glucane mit Dreifachhelix, so dass vermutet werden kann, dass BarleyGlucan aufgrund seiner 1,3-1,4-Bindungen nur an einen Teil der vorhandenen Glucanrezeptoren bindet bzw. die durch die Rezeptorbindung ausgelöste Signaltransduktion schwächer als bei den vorher genannten Glucanen mit einer Dreifachhelix ist. Die geringste noch nachweisbare proinflammatorische Aktivität wies das lineare β -1,3-D-Glucan Paramylon auf. Der Hauptunterschied zu Curdlan liegt in der Tertiärstruktur, bei der es sich bei Paramylon um eine Einfachhelix handelt. Dieser Strukturunterschied ist mit den bei Curdlan vereinzelt vorkommenden 1,6-Bindungen zu erklären, welche die Ausbildung einer Dreifachhelix bei diesem Glucan bedingen. Paramylon entspricht somit in seiner Tertiärstruktur also Laminarin, allerdings verfügt es über ein höheres Molekulargewicht und auf Grundlage dessen führt es zu einer messbaren Zytokinausschüttung. Diese ist aber geringer als bei den in einer Dreifachhelix vorkommenden Glucanen. Damit wird erneut der Einfluss von Molekulargewicht und Tertiärstruktur auf die proinflammatorische Aktivität von Glucanen deutlich. Dieser ist noch einmal zusammenfassend in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12 : Einfluss von Molekulargewicht und Tertiärstruktur auf die proinflammatorische Aktivität kommerziell erhältlicher Glucane

Curdlan:	
<ul style="list-style-type: none"> • hohes Molekulargewicht • Einfach- und Dreifachhelix 	
Zymosan:	
<ul style="list-style-type: none"> • hohes Molekulargewicht • Dreifachhelix • Mannananteil 	
Bäckerhefe:	
<ul style="list-style-type: none"> • hohes Molekulargewicht • Dreifachhelix 	
BarleyGlucan:	
<ul style="list-style-type: none"> • hohes Molekulargewicht • Dreifachhelix • β-1,3-1,4-Glucan 	
Paramylon:	
<ul style="list-style-type: none"> • hohes Molekulargewicht • Einfachhelix 	
Laminarin:	
<ul style="list-style-type: none"> • geringes Molekulargewicht • Einfachhelix 	

Da über die Endotoxinfreiheit der untersuchten kommerziell erhältlichen Glucane keine Angaben verfügbar waren, erfolgte die Bestimmung der proinflammatorischen Aktivität der Glucane auch nach Zusatz von Polymyxin B. Dabei handelt es sich um einen potenten Endotoxininhibitor, wobei 1 µg/ml Polymyxin B die Aktivität von 100 ng/ml Endotoxin neutralisieren kann (Cooperstock, 1974; Kataoka et al., 2002). In diesen Untersuchungen war die proinflammatorische Aktivität von Curdlan und Paramylon deutlich erniedrigt, während bei BarleyGlucan, Bäckerhefe, Zymosan und Laminarin keine Änderung der proinflammatorischen Aktivität im Vollbluttest nachweisbar war. Somit war für die letzteren Glucane kein Einfluss von Polymyxin B nachweisbar und die ermittelte proinflammatorische Aktivität beruht nicht auf einer Verunreinigung durch Endotoxine, sondern auf der Wirkung dieser Glucane. Bei Curdlan und Paramylon ist davon auszugehen, dass diese mit Endotoxinen verunreinigt waren und infolge dessen ein Reaktivitätsverlust nach Zusatz des Endotoxininhibitors Polymyxin B feststellbar war. Es war allerdings auch weiterhin eine proinflammatorische Aktivität dieser Glucane nachweisbar. Hierbei ist aber zu betonen, dass die PB-bedingte Abnahme der proinflammatorischen Aktivität bei Curdlan und Paramylon nicht so groß war, dass sie zu einer Änderung der oben beschriebenen Reaktivitätsreihenfolge der untersuchten Glucane im Vergleich mit den Versuchsergebnissen ohne Zusatz von PB führte. Somit ist aufgrund dieser Ergebnisse davon auszugehen, dass die oben beschriebenen Struktur-Wirkungsbeziehungen auf die Eigenschaften der getesteten Glucane und nicht auf etwaige Endotoxinverunreinigungen zurückzuführen sind.

5.1.2. Einfluss von NaOH auf die proinflammatorische Aktivität von Glucanen

Des Weiteren wurde der Einfluss einer Vorbehandlung mit NaOH auf die proinflammatorische Aktivität von Glucanen im humanen Vollbluttest untersucht. Der Zusatz von NaOH dient der Überführung der Glucane in eine wasserlösliche Form, da es hier zu einer Umwandlung der Dreifachhelixstruktur in eine Einfachhelix kommt. Entsprechend den Ausführungen zu den Struktur-Wirkungsbeziehungen im Kapitel 5.1.1 müsste dieses mit einer Abnahme der proinflammatorischen Aktivität der behandelten Glucane im Vollbluttest verbunden sein (Saito et al., 1991; Rylander et al., 1999). Die hier durchgeführten Untersuchungen ergaben aber keine Änderung der proinflammatorischen Aktivität von Curdlan, Glucan aus Bäckerhefe, Zymosan und Laminarin nach Behandlung mit NaOH. Dagegen war bei Paramylon tendenziell eine Erhöhung und bei BarleyGlucan tendenziell eine Erniedrigung der proinflammatorischen Aktivität feststellbar. Diese Aktivitätsänderungen bewegten sich aber im Bereich der Schwankungsbreite des Testsystems, so dass hier ebenfalls davon ausgegangen werden muss, dass die NaOH-Behandlung zu keiner Aktivitätsbeeinflussung führte. Folgende Gründe sind für den hier festgestellten fehlenden Einfluss der durchgeführten NaOH-Behandlung auf die proinflammatorische Aktivität der Glucane möglich:

1. Die durchgeführte NaOH-Behandlung ist zu schwach, um zu einer deutlichen Beeinflussung der Tertiärstruktur der Glucane zu führen. Dagegen spricht aber, dass dieselbe Behandlung zu einer deutlichen Reaktivitätsänderung im glucanspezifischen LAL-Test führte (siehe Kapitel 5.2). Allerdings kann in diesem Zusammenhang nicht ausgeschlossen werden, dass beide Testsysteme unterschiedlich stark auf Strukturveränderungen der getesteten Glucane reagieren.

2. Es ist außerdem möglich, dass die NaOH-Behandlung zu einer Beeinflussung der Glucane und damit zu einer Reaktivitätsabnahme im Vollbluttest führte, diese aber nur so gering war, dass sie mittels der hier durchgeführten semiquantitativen Testdurchführung nicht erfasst werden konnte.

Aufgrund der oben genannten Überlegungen sollten die Untersuchungen zum Einfluss einer NaOH-Behandlung auf die proinflammatorische Aktivität von Glucanen mittels einer quantitativen Variante des Vollbluttestes durchgeführt werden oder es sollte zumindest im semiquantitativen Testsystem mit dualen anstatt dekadischen Probenverdünnungsschritten gearbeitet werden. Weiterhin könnten methodische Variationen des NaOH-Behandlung (Einwirkzeit und -konzentration) geprüft werden.

5.2 Reaktivität der Glucane in einem glucanspezifischen LAL-Test

Neben der proinflammatorischen Aktivität im Vollbluttest wurde die Reaktivität der kommerziell erhältlichen Glucane in einem glucanspezifischen LAL-Test untersucht (s. Tabelle 1). Dabei wurde die Reaktivität der untersuchten Glucane auf die Reaktivität von dem linearen, wasserlöslichen Glucan Pachyman bezogen. Es erfolgte wieder der Vergleich zwischen unbehandelten und mit NaOH-behandelten Glucanen. Die unbehandelten Glucane zeigten dabei folgende Reaktivität: Laminarin > BarleyGlucan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > Paramylon > Curdlan. Nach der Aufbereitung mit NaOH war eine erhöhte Aktivität mit Ausnahme von Laminarin feststellbar. Damit wird die Sonderstellung der Reaktivität von Laminarin wieder deutlich, während im Vollbluttest die Reaktivität jeweils unter der Nachweisgrenze lag, zeigte Laminarin im Glucateelltest eine starke Reaktivität, die aber nicht durch eine NaOH-Aufbereitung beeinflusst wurde. Die anderen untersuchten Glucane zeigten eine deutlich stärkere Reaktion nach Behandlung mit NaOH. Die NaOH-Behandlung führt, wie bereits erwähnt, zu einer Überführung der Dreifachhelixstruktur in eine Einfachhelix (Saito et al., 1991). Damit werden die Glucane in eine wasserlösliche Form überführt, die eine Voraussetzung für den Nachweis im Glucateell-Test ist (Rylander und Carvalho, 2006). Da Laminarin bereits als Einfachhelix vorliegt und somit wasserlöslich ist, hat die NaOH-Behandlung keinen Einfluss auf die Reaktivität von Laminarin. Somit führten die Strukturunterschiede der kommerziell erhältlichen Glucane, die zu Unterschieden im physikalischen Verhalten führen, auch im Glucateelltest zu Reaktionsunterschieden.

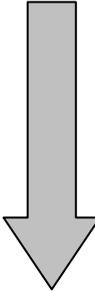
5.3 Vergleich der Reaktivität von Glucanen im Vollblut- und glucanspezifischen LAL-Test

Die Reaktionsrangfolge im glucanspezifischen LAL-Test ohne NaOH-Behandlung (Laminarin > BarleyGlucan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > Paramylon > Curdlan) unterschied sich deutlich von der Reaktionsreihenfolge im Vollbluttest (Curdlan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > BarleyGlucan > Paramylon > Laminarin). Dadurch wird die Verschiedenheit der Testsysteme deutlich. Während die Wasserlöslichkeit eines Glucans im humanen Vollbluttest

keine primäre Voraussetzung für die Auslösung einer proinflammatorischen Aktivität darstellt, da die β -glucanerkennenden Rezeptoren sowohl lösliche als auch partikuläre Glucane erkennen (Steele et al., 2003; Brown und Gordon, 2005), ist diese für eine Reaktivität im GlucateLL-Test unabdingbar. Hierdurch erklärt sich die hohe Reaktivität von Laminarin (Einfachhelix) im GlucateLL-Test. Im Vollbluttest dagegen konnte für Glucane in der Raumstruktur der Dreifachhelix, die zu zunehmender Wasserunlöslichkeit führt, eine höhere proinflammatorische Aktivität als bei Glucanen mit einer Einfachhelix (wasserlöslich) nachgewiesen werden.

Diese Struktur-Wirkungsbeziehungen sind bei der Bewertung des Glucangehaltes in Bioaerosolproben beim Nachweis mittels des GlucateLLtests zu beachten, denn anhand der vorliegenden Ergebnisse scheinen Glucane im GlucateLLtest unabhängig von ihrer Potenz Entzündungsprozesse auszulösen erkannt zu werden. Bei den durchgeführten Untersuchungen führten Glucane mit einer hohen proinflammatorischen Potenz im humanen Vollbluttest zu einer niedrigen Aktivität im GlucateLLtest und umgekehrt. Somit ist eine Vergleichbarkeit dieser Systeme nicht gegeben und Bestimmungen der Konzentration an luftgetragenen Glucanen mittels des GlucateLLtests lassen keine direkten Rückschlüsse auf die entzündungsauslösende Potenz dieser luftverunreinigenden Stoffe zu. Weiterhin ist bei der Anwendung des GlucateLLtest zu berücksichtigen, dass dieser nur Glucane in wasserlöslicher Form erfasst, diese in der Luft aber hauptsächlich in wasserunlöslicher Form vorliegen (Rylander und Carvalheiro, 2006) und es ohne entsprechende Vorbehandlung der Bioaerosolproben somit zu einer deutlichen Unterbewertung des Glucangehaltes kommen würde (s. auch Kapitel 5.4.1).

Tabelle 13: Vergleich Rangfolge der absteigenden Reaktivitäten kommerziell erhältlicher Glucane im humanen Vollbluttest und im glucanspezifischen LAL-Test

humaner Vollbluttest		glucanspezifischer LAL-Test
Curdlan		Laminarin
Zyosan		BarleyGlucan
Bäckerhefe		Zyosan
BarleyGlucan		Bäckerhefe
Paramylon		Paramylon
Laminarin		Curdlan

5.4 Glucane in Bioaerosolen aus Tierställen

5.4.1 Konzentration von Glucanen in der Luft von Tierställen

Zur Bestimmung der Konzentration luftgetragener Glucane war eine Überführung der Glucane in eine wasserlösliche Form notwendig, da Glucane in Bioaerosolen nur zu 10% in wasserlöslicher Form vorkommen und für den Nachweis im glucanspezifischen LAL-Test eine wasserlösliche Form notwendig ist (Rylander und Carvalheiro, 2006). Deshalb wurden

verschiedene Vorversuche zur Glucanisolierung durchgeführt. Dabei wurden die höchsten nachweisbaren Glucangehalte in drei der vier getesteten Proben nach der Aufbereitung mit NaOH gemessen. Aus diesem Grunde wurden alle weiteren Proben für die Bestimmung des Glucangehaltes mit NaOH aufbereitet.

Der Median des Glucangehaltes aus den Proben des einatembaren Staubes aller Tierställe betrug $8,3 \times 10^4$ pg/m³. Dabei zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierställen. Die höchsten Werte wurden in den Pferde- und Geflügelställen ($8,4 \times 10^5$ pg/m³ und $2,3 \times 10^5$ pg/m³) nachgewiesen. Die niedrigsten Glucangehalte konnten mit $1,3 \times 10^3$ pg/m³ im Schafstall gemessen werden. Dieses waren jeweils Ställe mit Einstreu, die mit einem Median von $1,1 \times 10^4$ KBE/m³ eine hohe Konzentration luftgetragener Schimmelpilze aufwiesen. Somit scheint die Einstreu auf den luftgetragenen Glucangehalt keinen so deutlichen Einfluss zu haben, wie auf den luftgetragenen Schimmelpilzgehalt (s. auch Kapitel 5.4.2). Für den auf den einatembaren Staub bezogenen Glucangehalt konnte die höchste Konzentration mit einem Median $2,6 \times 10^5$ pg/mg in den Pferdeställen nachgewiesen werden. Dieser Wert lag für die anderen Tierställen in der Größenordnung von 10^4 pg/mg. Somit ist der Glucangehalt pro mg einatembaren Staub mit Ausnahme der Pferdeställe, die jedoch auch die höchsten absoluten Glucangehalte aufwiesen, relativ konstant. Außerdem konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration an luftgetragenen Glucanen und der Konzentration an einatembarem Staub nachgewiesen werden (s. auch Kapitel 5.4.3).

Weiterhin wurde die Konzentration von Glucanen in potentiellen Quellen für luftgetragene Glucane (Kot, Futter und Einstreu) untersucht. Dabei wies Hafer mit 285,4 µg/g den höchsten Glucangehalt auf. Die nächsthöheren Werte mit einem Median von 20,1 µg/g wurden in Heu und Stroh gefunden. Die niedrigsten Werte wiesen mit einem Median von 1,9 µg/g Kot und mit 1,8 µg/g Späne auf. Hierbei ist davon auszugehen, dass die in den potentiellen Quellen gefundenen Glucane nicht nur aus einer Schimmelpilzbesiedelung dieser Materialien stammen, sondern auch aus den Pflanzen selbst, da diese Substanzen auch in Pflanzen vorkommen (Chew et al., 2001). Bei den im Hafer vorkommenden Glucanen handelt es sich beispielsweise um β-1,3-1,4-Glucane, die schwerpunktmäßig in den Körnern vorkommen (Roubroeks et al., 2000). Dieses Glucan verfügt ebenfalls über eine proinflammatorische Potenz wie die Untersuchungen mit kommerziell erhältlichen Barley-Glucan im Vollbluttest gezeigt haben und ist ebenfalls im Glucatest reaktiv.

5.4.2 Beziehungen zwischen luftgetragenen Glucanen und luftgetragenen Schimmelpilzen in den untersuchten Tierställen

Die wichtigste Quelle für β-1,3-D-Glucane sind die Zellwände von Schimmelpilzen (Williams, 1994; Williams, 1996). Aus diesem Grunde wurden die Beziehungen zwischen der Konzentration an Glucanen und kultivierbaren Schimmelpilzen in den Bioaerosolproben und den potentiellen Quellen für luftgetragene Glucane untersucht.

Bei der Betrachtung der Schimmelpilzkonzentrationen in den verschiedenen Tierställen fällt auf, dass der Schimmelpilzgehalt in den Tierställen mit Einstreu mit einem Median von $1,1 \times 10^4$ KBE/m³ höher ist als in den einstreulosen Tierställen mit einem Median von $1,2 \times 10^2$ KBE/m³. Somit bestätigen die vorliegenden Untersuchungen die allgemein bekannte Tatsache, dass Einstreu zu einer höheren Schimmelpilzkonzentration in Tierställen führt (Matthes, 1979; Rieger, 2001; Hartung et al., 2004).

Eine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration an kultivierbaren Schimmelpilzen und dem Glucangehalt konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis weist auch darauf hin, dass in Tierställen weitere bedeutsame Glucanquellen wie z.B. Futter- und Einstreumaterialien existieren könnten. Eine weitere Erklärung für die fehlende Korrelation ist, dass die Bestimmung der Schimmelpilzkonzentration mittels Kultivierung nur vermehrungsfähige Schimmelpilze erfasst, während Glucane mittels glucanspezifischen LAL-Test auch in abgestorbenen Schimmelpilzen und Schimmelpilzbestandteilen nachgewiesen werden, da sie auch in dieser Form ihre biologische Wirksamkeit behalten (Rylander, 2001).

Außerdem wurden die potentiellen Glucanquellen Kot, Futter und Einstreu aus den beprobten Tierställen auf potentielle Zusammenhänge zwischen Glucan- und kultivierbaren Schimmelpilzgehalt untersucht. Der Glucangehalt in diesen potentiellen Glucanquellen aus verschiedenen Tierställen lag zwischen 0,6 µg/g und 285,4 µg/g mit einem Medianwert von 6,8 µg/g. Die untersuchten Proben sind wie bereits oben erwähnt in mehrfacher Hinsicht als potentielle Glucanquellen zu bezeichnen, denn einerseits können die Glucane aus den Pflanzen selbst stammen, andererseits sind insbesondere Heu und Stroh häufig mit Schimmelpilzen besiedelt, wie der Medianwert von $5,8 \times 10^5$ KBE/g für Heu und $2,8 \times 10^5$ KBE/g für Stroh zeigt. Somit stellte sich auch hier die Frage, ob der Glucangehalt in den potentiellen Glucanquellen evtl. durch die Konzentration an vermehrungsfähigen Schimmelpilzen beschrieben werden kann. Dagegen spricht die fehlende signifikante Korrelation zwischen Glucan- und Schimmelpilzgehalt in den Glucanquellen.

Insgesamt weisen die hier vorliegenden Untersuchungen darauf hin, dass mittels der Glucanbestimmung im Glucatelltest in Tierställen weder auf die Konzentration von vermehrungsfähigen Schimmelpilzen im luftgetragenen Zustand oder verschiedenen anderen Materialien (Kot, Futter, Einstreu) geschlossen werden kann und umgekehrt. Somit stellt die Glucanbestimmung mittels Glucatelltest keine Alternative zur Bestimmung von luftgetragenen Schimmelpilzen in Tierställen mittels Kultivierung dar. Hierfür dürfte u.a. die Existenz weiterer Glucanquellen außer Schimmelpilzen, z.B. verschiedene Futtermaterialien, verantwortlich sein. Eine ähnliche Beobachtung machten Ronald et al. (2003) bei Untersuchungen in Sägewerken. In diesem Fall erwies sich der Holzstaub als große potentielle Glucanquelle.

5.4.3 Beziehungen zwischen luftgetragenen Glucanen und einatembaren Staub, sowie luftgetragenen Endotoxinen und Bakterien

Der Glucangehalt in Tierställen wird wie bereits erwähnt durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Deshalb wurden als weitere lufthygienische Parameter der einatembare Staub, die Endotoxinkonzentration, die Gesamtkoloniezahl und die gram-negative Gesamtkoloniezahl bestimmt und die Beziehungen dieser Luftinhaltsstoffe zu den luftgetragenen Glucanen untersucht.

Bei den Konzentrationen der luftverunreinigenden Stoffe Endotoxine, Bakterien und Staub zeigten sich deutliche Einflüsse der Haltungstechnologie, die höchsten Werte konnten jeweils in den Ställen mit Einstreu gemessen werden. Diese Tatsache ist bereits seit längerem aus anderen Untersuchungen bekannt (Müller et al., 1976; Matthes, 1979; Rieger, 2001). Eine Korrelation zwischen der Gesamtkoloniezahl und dem Glucangehalt bzw. der

gram-negativen Gesamtkoloniezahl und dem Glucangehalt konnte nicht nachgewiesen werden. Dies kann u.a. auch dadurch erklärt werden, dass Bakterien keine potentiellen Glucanquellen darstellen.

Zwischen dem einatembaren Staub und der Glucankonzentration konnte eine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Korrelationsanalyse nach Spearman, $r = 0,683$; $p=0,01$). Diese Korrelation weist darauf hin, dass luftgetragene Stäube und luftgetragene Glucane in Tierställen erstens ähnliche potentielle Quellen haben und zweitens der Übergang dieser Substanzen in den luftgetragenen Zustand auch in ähnlichen Verhältnissen zueinander erfolgt.

Außerdem war eine signifikante Korrelation zwischen den luftgetragenen Glucanen und den luftgetragenen Endotoxinen feststellbar. Dieses weist, wie bei der Korrelation zwischen luftgetragendem Staub und luftgetragenen Glucanen, auf ähnliche potentielle Quellen (z.B. Futter sowohl mit Glucanen als auch Endotoxinen kontaminiert) und Quellstärken hin.

5.4.4 Bedeutung von Glucanen bei der Auslösung von nichtinfektiösen entzündlichen Atemwegserkrankungen

Als wichtige Auslöser von nichtinfektiösen entzündlichen Atemwegserkrankungen (z.B. Organic Dust Toxic Syndrome) werden in der Literatur u.a. Endotoxine und Glucane beschrieben (Rylander et al., 1992; Hoppenheidt und Mücke, 1998; Wouters et al., 2006). Die hier vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass beide Substanzen in ähnlichen Konzentrationen (Masse pro Volumen) in der Luft von Tierställen vorkommen. Für die Auslösung entzündlicher Reaktionen im Atmungstrakt ist neben der Konzentration dieser Stoffe aber vor allem deren proinflammatorisches Potential von Bedeutung. Zur Charakterisierung des proinflammatorischen Potentials dieser Stoffe wurden in der vorliegenden Studie daher verschiedene Untersuchungen in einem humanen Vollbluttest durchgeführt. Als erstes erfolgte dazu die Charakterisierung der proinflammatorischen Aktivität von Glucanen und Endotoxinen. Hierbei wurde festgestellt, dass die proinflammatorische Aktivität von Endotoxinen bei gleicher eingesetzter Stoffmenge mindestens 1000-fach stärker ist als die proinflammatorische Aktivität von Glucanen (siehe Abbildung 7). Die quantitative Bedeutung der Endotoxine für die proinflammatorische Potenz von Bioaerosolen aus Tierställen wurde in den Experimenten mit PB deutlich. PB ist ein spezifischer Endotoxininhibitor (Danner et al., 1989). Durch Vorbehandlung der Bioaerosolproben mit PB wird deren endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität gehemmt, die noch verbleibende proinflammatorische Aktivität wird durch entzündungsauslösende Stoffe außer Endotoxine wie z.B. Glucane und Tannine bedingt (nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität) (Eckardt, 2007). Nach Vorbehandlung der hier untersuchten Bioaerosolproben zeigte sich im Mittel (Median) eine Reduktion der proinflammatorischen Aktivität dieser Proben um 83,3%. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass Endotoxine, obwohl sie in ähnlichen Mengenkonzentrationen wie Glucane in der Luft von Tierställen vorkommen, den Hauptanteil der proinflammatorischen Aktivität dieser Bioaerosole bedingen.

Die in der Luft der Tierställe mittels des glucanspezifischen LAL-Tests nachgewiesene Glucankonzentration lag mit 10^4 bis 10^5 pg/m^3 z.T. deutlich über den Glucangehalten der Außenluft, der in eigenen Untersuchungen zwischen 10^2 bis 10^3 pg/m^3 schwankte. Es kann

somit zumindest teilweise von einer erhöhten Glucanbelastung in den Tierställen gegenüber der Außenluft gesprochen werden. In humanmedizinischen Studien konnten Atembeschwerden ab Glucankonzentrationen von 10 ng/m^3 in der Raumluft festgestellt werden (Rylander et al., 1992; Rylander et al., 1998; Rylander und Lin, 2000). Damit könnten die in den Tierställen nachgewiesenen Konzentrationen eine gesundheitliche Bedeutung haben. Die humanmedizinischen Studien beziehen sich jedoch hauptsächlich auf Beschwerden durch eine erhöhte Glucanbelastung in Gebäuden mit Feuchtigkeitsschäden. Hierbei kommt es zu der Ausbildung einer speziellen Schimmelpilzflora, insbesondere *Stachybotrys chartarum*, *A. versicolor* und *P. aurantiogriseum* (Andersson et al., 1997). In wieweit das proinflammatorische Potential von Glucanen, die von diesen Schimmelpilzarten abstammen, mit dem von Glucanen wie sie in Tierställen vorkommen vergleichbar ist, ist zurzeit nicht bekannt. Aus diesem Grunde bleibt es zu prüfen, ob beim Personal in Tierställen Atemwegsbeschwerden auch durch Glucankonzentrationen von $\geq 10 \text{ ng/m}^3$ ausgelöst werden.

Aufgrund der in dieser Untersuchung erhobenen Daten ist also anzunehmen, dass Glucane an der Auslösung von Entzündungsgeschehen im Respirationstrakt von Menschen und Tieren in Tierställen beteiligt sein können, ihr proinflammatorisches Potential aber insbesondere im Vergleich mit Endotoxinen, gering ist. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Möglichkeit potentieller Wechselwirkung zwischen Endotoxinen und Glucanen besteht. Diese sollten systematisch untersucht werden, denn in der Literatur gibt es Hinweise für eine Beeinflussung der Endotoxinwirkung durch Glucane. Fogelmark et al. (1994) berichten, dass die experimentelle aerogene Exposition mit *E. coli* - LPS und Curdlan zu einer deutlich stärkeren Einwanderung von Entzündungszellen im Respirationstrakt führte als die alleinige Exposition mit den Einzelkomponenten. Weiterhin ist ebenfalls bekannt, dass Glucane die Immunantwort, z.B. die Funktion der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie die Zytokinexpression durch die Makrophagen, nach Inhalation von organischem Staub und insbesondere den darin enthaltenen Endotoxinen, potenzieren können (Williams, 1997).

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Charakterisierung der proinflammatorischen Aktivität von β -1,3-D-Glucanen und deren Quantifizierung in luftgetragenen Stäuben aus Tierställen.

Mittels eines humanen Vollbluttestes wurde die proinflammatorische Aktivität verschiedener Glucane bestimmt. Hierbei zeigte sich folgende Reaktivitätsreihenfolge: Curdlan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > BarleyGlucan > Paramylon > Laminarin. Als wichtige Einflussfaktoren auf die proinflammatorische Aktivität der β -1,3-D-Glucane stellten sich das Molekulargewicht und die Raumstruktur heraus, wobei ein hohes Molekulargewicht in Kombination mit einer geöffneten Dreifachhelix (Curdlan) die höchste proinflammatorische Aktivität bedingt. Glucane ohne geöffnete Dreifachhelix, wie z.B. Glucan aus Bäckerhefe, zeigten dagegen eine geringere proinflammatorische Aktivität. Die fehlende proinflammatorische Aktivität von Laminarin beruht hauptsächlich auf dem niedrigen Molekulargewicht, das unterhalb des Mindestgewichts zur Zytokinausschüttung liegt und der Einfachhelix als Raumstruktur. Weiterhin führt die Einfachhelix als Raumstruktur in Kombination mit einem höheren Molekulargewicht, wie es bei Paramylon der Fall ist nur zu einer geringen Zytokininduktion.

Der glucanspezifische LAL-Test wird in der Literatur häufig als Nachweissystem zur Quantifizierung von Glucanen in verschiedenen Medien u.a. auch Bioaerosolproben beschrieben. Die Reaktivitätsreihenfolge der untersuchten Glucane in diesem Testsystem war: Laminarin > BarleyGlucan > Zymosan > Glucan aus Bäckerhefe > Paramylon > Curdlan und unterschied sich somit deutlich von der Reaktivitätsreihenfolge im humanen Vollbluttest. Laminarin, welches sich im Vollbluttest durch keine nachweisbare Aktivität auszeichnete, zeigte dagegen im glucanspezifischen LAL-Test die höchste Reaktivität. Aus diesem Grunde führte auch die Vorbehandlung von glucanhaltigen Bioaerosolproben mit NaOH, welches die Dreifachhelix von Glucanen in eine Einfachhelix überführt, zu höheren Nachweisraten im glucanspezifischen LAL-Test. Aufgrund der somit fehlenden grundlegenden Vergleichbarkeit der hier getesteten Nachweissysteme können durch die Bestimmung der Konzentration luftgetragener Glucane mittels glucanspezifischen LAL-Test keine direkten Rückschlüsse auf deren proinflammatorische Potenz gezogen werden.

Die Konzentration an luftgetragenen Glucanen, welche mittels des glucanspezifischen LAL-Tests in den untersuchten Tierställen bestimmt wurde, betrug im Mittel (Median) $8,3 \times 10^4$ pg/m³. Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Konzentration an luftgetragenen Glucanen und den luftgetragenen Schimmelpilzen nachgewiesen werden. Außerdem bestand keine Korrelation zwischen der Glucan- und der Schimmelpilzkonzentration in den untersuchten Pflanzenmaterialien (Hafer, Heu und Stroh). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass durch die Glucanbestimmung mittels glucanspezifischen LAL-Test in Tierställen weder auf die Konzentration von vermehrungsfähigen Schimmelpilzen im luftgetragenen Zustand noch in verschiedenen anderen Materialien geschlossen werden kann und umgekehrt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass diese Glucane nicht nur aus luftgetragenen Schimmelpilzen bzw. den Schimmelpilzen, welche verschiedene potentielle Quellen besiedeln, stammen, sondern

dass diese Pflanzenmaterialien (Futter, Einstreu) selbst eine Quelle für diese Substanzen darstellen.

Die Konzentration (Masse pro Volumen) an luftgetragenen Glucanen und Endotoxinen lag in den untersuchten Tierställen in einer ähnlichen Größenordnung. Im humanen Vollbluttest konnte aber eine um mindestens 1000-fach stärkere proinflammatorische Aktivität für Endotoxine im Vergleich zu Glucanen nachgewiesen werden. Außerdem führte die Behandlung von Bioaerosolproben aus Tierställen mit dem Endotoxininhibitor PB im Mittel (Median) zu einer Reduktion der proinflammatorischen Aktivität um 83,3 %. Damit weisen beide Ergebnisse daraufhin, dass Glucane, obwohl sie in der Luft von Tierställen in ähnlichen Konzentrationen wie Endotoxine vorkommen, einen bedeutend geringeren Anteil an der proinflammatorischen Gesamtaktivität von Bioaerosolen aus Tierställen haben als Endotoxine.

7 Summary

Characterisation of the proinflammatory potency of glucans in a whole blood model

This work deals with the examination of the proinflammatory activity of the β -(1→3)-D-glucans and its detection in airborne dusts out of animal stables.

A proinflammatory activity could be proved by means of the human whole blood assay. The following reaction order resulted: curdlan > zymosan > glucan from bakers yeast > barley glucan > paramylon > laminarin. The molecular weight and the room structure turned out to be important influence factors on the proinflammatory activity of the β -(1→3)-D-glucans. A high molecular weight into combination with an open triple helix (curdlan) caused the highest proinflammatory activity. Glucans without an open triple helix, e.g. glucan from bakers yeast showed a lower proinflammatory activity. The missing proinflammatory activity of laminarin is based on the low molecular weight which is below the minimum weight related to the release of cytokines. Furthermore the single helix as conformation in combination with a high molecular weight leads to a low induction of cytokines. This is the case at paramylon.

The glucan-specific LAL-Test is frequently described as a proof system for the quantification of glucans in different media and also in bioaerosol samples. The reaction order in this test system was laminarin > barley glucan > zymosan > glucan from bakers yeast > paramylon > curdlan and differed considerably from the reaction order in the human whole blood assay. Laminarin which did not stand out due to any provable activity in the whole blood assay stand out showed the highest reactivity in the glucan-specific LAL test. For this reason the pretreatment with NaOH of bioaerosol samples containing glucans which carry over the triple helix of the glucan into a single helix led to higher proof rates in the glucan-specific LAL test. Due to the therefore missing comparability of these two systems no direct conclusions can be drawn by the determination of the concentration of airborne glucans by means of glucan-specific LAL-Test on the proinflammatory potency.

The concentration in airborne glucans was on an average (median) 8.3×10^4 pg/m³. The glucans were determined by means of the glucan specific LAL-Test in the examined animal stables. The highest values of airborne glucans could be proved in horses and poultry stables and the lowest value was measured in sheep stables. No correlation could be proved between the airborne glucan and the airborne moulds at the bioaerosol samples examined here. In addition, no correlation consisted in the examined plants (oats, hay, straw) between the glucan and mould concentration. These results point out that from the glucan determination in animal stables by means of a glucan-specific LAL test it cannot be concluded neither that there is a concentration of moulds capable of being reproduced in airborne condition nor on different other materials and vice versa. A possible explanation is that these glucans are not only from airborne moulds or moulds which settle on different potential sources but that these plant materials represent a source themselves.

In the examined animal stables the concentration (crowd per volume) in airborne glucans and endotoxins is in a similar order of magnitude. In the human whole blood assay it could be proved an at least 1000 fold stronger potency for endotoxins in comparison with glucans. In addition, the treatment of bioaerosol samples led to a reduction of the proinflammatory

Summary

activity around on an average (median) 83.3% with the endotoxin inhibitor PB. The results point out that glucans make a considerably less contribution to the proinflammatory complete activity to bioaerosols out of animal stables than endotoxins although they happen to be in the air of animal stables in a similar amount of concentrations as endotoxins.

8 Literaturverzeichnis*

- Adachi, Y.; Ishii, T.; Ikeda, Y.; Hoshino, A.; Tamura, H.; Aketagawa, J.; Tanaka, S.; Ohno, N. (2004):
Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1.
Infect Immun 72(7). S. 4159-71.
- Adachi, Y.; Okazaki, M.; Ohno, N.; Yadomae, T. (1994):
Enhancement of cytokine production by macrophages stimulated with (1-->3)-beta-D-glucan, grifolan (GRN), isolated from *Grifola frondosa*.
Biol Pharm Bull 17(12). S. 1554-60.
- Adhikari, A.; Sen, M. M.; Gupta-Bhattacharya, S.; Chanda, S. (2004):
Airborne viable, non-viable, and allergenic fungi in a rural agricultural area of India: a 2-year study at five outdoor sampling stations.
Sci Total Environ 326(1-3). S. 123-41.
- Airaksinen, S.; Heiskanen, M. L.; Heinonen-Tanski, H.; Laitinen, J.; Laitinen, S.; Linnainmaa, M.; Rautiala, S. (2005):
Variety in dustiness and hygiene quality of peat bedding.
Ann Agric Environ Med 12(1). S. 53-9.
- Aketagawa, J.; Tanaka, S.; Tamura, H.; Shibata, Y.; Saito, H. (1993):
Activation of limulus coagulation factor G by several (1-->3)-beta-D-glucans: comparison of the potency of glucans with identical degree of polymerization but different conformations.
J Biochem (Tokyo) 113(6). S. 683-6.
- Akramiene, D.; Kondrotas, A.; Didziapetriene, J.; Kevelaitis, E. (2007):
Effects of beta-glucans on the immune system.
Medicina (Kaunas) 43(8). S. 597-606.
- Albrecht, A.; Frenzel, E.; Schies, U. (2005):
Einsatz von filtrierendem Atemschutz bei Exposition von Schimmelpilzen.
Tiefbau 10. S. 583-588.
- Andersen, A. A. (1958):
New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles.
J Bacteriol 76(5). S. 471-84.

* Zeitschriftentitelabkürzungen gemäß: Lists of Journals indexed in Index Medicus.

Andersson, M. A.; Nikulin, M.; Koljalg, U.; Andersson, M. C.; Rainey, F.; Reijula, K.; Hintikka, E. L.; Salkinoja-Salonen, M. (1997):
Bacteria, molds, and toxins in water-damaged building materials.
Appl Environ Microbiol 63(2). S. 387-93.

Anonym (2002).
Leitfaden zur Vorbeugung, Untersuchung, Bewertung und Sanierung von
Schimmelpilzwachstum in Innenräumen. V. D. B. S.
Innenraumlufthygienekommission des Umweltbundesamtes. Berlin,
Umweltbundesamt, Innenraumlufthygienekommission des Umweltbundesamtes: 1-
80.

Anonym (2004):
VDI 4253, Blatt 2 Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilzkonzentration
in der Luft.
Berlin: Beuth Verlag.

Anonym (2005):
VDI 4252, Blatt 3: Aktive Probennahme von Bioaerosolen.
Berlin: Beuth Verlag.

Baekbo, P. (1990):
Air quality in Danish pigs herds.
In: Int. Pig Vet. Soc. 11th Congr.
Lausanne. S. 395.

Beck, J. P.; Heutelbeck, A.; Dunkelberg, H. (2007):
Volatile organic compounds in dwelling houses and stables of dairy and cattle farms
in Northern Germany.
Sci Total Environ 372(2-3). S. 440-54.

Beijer, L.; Thorn, J.; Rylander, R. (2003):
Mould exposure at home relates to inflammatory markers in blood.
Eur Respir J 21(2). S. 317-22.

Bondeson, J.; Browne, K. A.; Brennan, F. M.; Foxwell, B. M.; Feldmann, M. (1999):
Selective regulation of cytokine induction by adenoviral gene transfer of I κ B α into human macrophages: lipopolysaccharide-induced, but not zymosan-induced,
proinflammatory cytokines are inhibited, but IL-10 is nuclear factor- κ B
independent.
J Immunol 162(5). S. 2939-45.

Brachmann, P. S.; Ehrlich, R.; Eichenwald, H. F.; Gabelli, V. J.; Kethley, T. W.; Meldin, S. H.;
Maltmann, J. R.; Middlebrook, G.; Mierton, J. D.; Silver, I. H. Wolfe, E. K. (1964):
Standart sampler for assay of airborne microorganisms.
Science 144. S. 1295.

- Brown, G. D.; Gordon, S. (2005):
Immune recognition of fungal beta-glucans.
Cell Microbiol 7(4). S. 471-9.
- Brown, G. D., Gordon, S. (2003)
Fungal beta-glucans and mammalian immunity
Immunity 19. S. 311-315
- Brown, G. D.; Taylor, P. R.; Reid, D. M.; Willment, J. A.; Williams, D. L.; Martinez-Pomares, L.; Wong, S. Y.; Gordon, S. (2002):
Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages.
J Exp Med 196(3). S. 407-12.
- Bünger, J.; Antlauf-Lammers, M.; Schulz, T. G.; Westphal, G. A.; Müller, M. M.; Ruhnau, P.; Hallier, E. (2000a):
Health complaints and immunological markers of exposure to bioaerosols among
biowaste collectors and compost workers.
Occup Environ Med 57. S. 458-464.
- Bünger, J.; Möller, A.; Hallier, E. (2000b):
Tumorerkrankungen durch Mikroorganismen am Arbeitsplatz.
Dortmund, Berlin.
- Bünger, J.; Westphal, G.; Mönnich, A.; Hinnendahl, B.; Hallier, E.; Müller, M. (2004):
Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins.
Toxicology 202. S. 199-211.
- Carol, A.; Feghali, D.; Timothy, M. (1997):
Cytokines in acute and chronic inflammation.
Frontiers in Bioscience 2 1. S. 12-26.
- Chew, G. L.; Douwes, J.; Doekes, G.; Higgins, K. M.; van Strien, R.; Spithoven, J.;
Brunekreef, B. (2001):
Fungal extracellular polysaccharides, beta (1-->3)-glucans and culturable fungi in
repeated sampling of house dust.
Indoor Air 11(3). S. 171-8.
- Clark, S.; Rylander, R.; Larsson, L. (1983):
Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust in poultry and swine confinement
buildings.
Am Ind Hyg Assoc J 44(7). S. 537-41.
- Clarke, A. F.; Madelin, T. (1987):
Technique for assessing respiratory health hazards from hay and other source
materials.
Equine Vet J 19(5). S. 442-447.

- Cleary, J. A.; Kelly, G. E.; Husband, A. J. (1999):
The effect of molecular weight and beta-1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)-beta-D-glucan.
Immunol Cell Biol 77(5). S. 395-403.
- Cooley, J. D.; Wong, W. C.; Jumper, C. A.; Straus, D. C. (1998):
Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome.
Occup Environ Med 55(9). S. 579-84.
- Cooperstock, M. S. (1974):
Inactivation of endotoxin by polymyxin B.
Antimicrob Agents Chemother 6(4). S. 422-5.
- Corrier, D. E. (1991):
Mycotoxigenesis: mechanisms of immunosuppression.
Vet Immunol Immunopathol 30(1). S. 73-87.
- Czop, J. K.; Austen, K. F. (1985a):
Generation of leukotrienes by human monocytes upon stimulation of their beta-glucan receptor during phagocytosis.
Proc Natl Acad Sci U S A 82(9). S. 2751-5.
- Czop, J. K.; Austen, K. F. (1985b):
Properties of glycans that activate the human alternative complement pathway and interact with the human monocyte beta-glucan receptor.
J Immunol 135(5). S. 3388-93.
- Danner, R. L.; Joiner, K. A.; Rubin, M.; Patterson, W. H.; Johnson, N.; Ayers, K. M.; Parrillo, J. E. (1989):
Purification, toxicity, and antiendotoxin activity of polymyxin B nonapeptide.
Antimicrob Agents Chemother 33(9). S. 1428-34.
- Dinarello, C. A. (2000):
Proinflammatory cytokines.
Chest 118(2). S. 503-8.
- Donham, K.J. (1991):
Association of environmental air contaminations with disease and productivity in swine.
Am J Vet Res 52. S.1723-30.
- Dörfler, H. (1989):
Lexikon der Mykologie.
Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. - ISBN: 3-437-20413-0.

- Dott, W.; Fischer, G.; Müller, T.; Thißen, R.; Wiesmüller, G. (2004).
Belastung der Arbeitnehmer bei Schimmelpilzsanierungsarbeiten in Innenräumen.
München, Tiefbau-Berufsgenossenschaft: 1-71.
- Douwes, J. (2005):
(1-->3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence.
Indoor Air 15(3). S. 160-9.
- Douwes, J.; Doekes, G.; Montijn, R.; Heederik, D.; Brunekreef, B. (1996):
Measurement of beta(1-->3)-glucans in occupational and home environments with an
inhibition enzyme immunoassay.
Appl Environ Microbiol 62(9). S. 3176-82.
- Douwes, J.; McLean, D.; van der Maarl, E.; Heederik, D.; Pearce, N. (2000a):
Worker exposures to airborne dust, endotoxin and beta(1,3)-glucan in two New
Zealand sawmills.
Am J Ind Med 38(4). S. 426-30.
- Douwes, J.; Thorne, P.; Pearce, N.; Heederik, D. (2003):
Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects.
Ann Occup Hyg 47(3). S. 187-200.
- Douwes, J.; Wouters, I.; Dubbeld, H.; van Zwieten, L.; Steerenberg, P.; Doekes, G.;
Heederik, D. (2000b):
Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers: A relation
with bio-aerosol exposure.
Am J Ind Med 37(5). S. 459-68.
- Douwes, J.; Zuidhof, A.; Doekes, G.; van der Zee, S. C.; Wouters, I.; Boezen, M. H.;
Brunekreef, B. (2000c):
(1-->3)-beta-D-glucan and endotoxin in house dust and peak flow variability in
children.
Am J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 1). S. 1348-54.
- Eckardt, K. (2007):
Charakterisierung der endotoxinbedingten proinflammatorischen Aktivität von
Bioaerosolen aus Tierställen.
In: 2. Doktorandensymposium.
Berlin, Mensch und Buch Verlag. - ISBN: 978-3-86664-235-5. -.
- Eduard, W.; Douwes, J.; Mehl, R.; Heederik, D.; Melbostad, E. (2001):
Short term exposure to airborne microbial agents during farm work: exposure-
response relations with eye and respiratory symptoms.
Occup Environ Med 58(2). S. 113-8.

- Egert, J. (1999):
Schimmelpilze in Innenräumen: Wachstumsbedingungen, gesundheitliche Gefährdung, Bekämpfung.
In: Feuchttag 99 - Umwelt-Meßverfahren-Anwendungen.
Berlin, DGZFP- Berichtsband BB 69 CD.
- Engstad, C. S.; Engstad, R. E.; Olsen, J. O.; Osterud, B. (2002):
The effect of soluble beta-1,3-glucan and lipopolysaccharide on cytokine production and coagulation activation in whole blood.
Int Immunopharmacol 2(11). S. 1585-97.
- Falch, B. H.; Espevik, T.; Ryan, L.; Stokke, B. T. (2000):
The cytokine stimulating activity of (1-->3)-beta-D-glucans is dependent on the triple helix conformation.
Carbohydr Res 329(3). S. 587-96.
- Fennrich, S.; Fischer, M.; Hartung, T.; Lexa, P.; Montag-Lessing, T.; Sonntag, H. G.; Weigandt, M.; Wendel, A. (1998):
[Evaluation and further development of a pyrogenicity assay based on human whole blood].
Altex 15(3). S. 123-128.
- Fennrich, S.; Zucker, B. A.; Hartung, T. (2000):
Beispiel eines neuen Einsatzbereiches des humanen Vollbluttests : Entwicklung eines Messverfahrens zur Abschätzung der gesundheitlichen Gefährdung durch luftgetragene mikrobielle Verunreinigungen.
Altex 18. S. 41-46.
- Fischer, G.; Dott, W. (2003):
Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene.
Arch Microbiol 179(2). S. 75-82.
- Fischer, G.; Muller, T.; Schwalbe, R.; Ostrowski, R.; Dott, W. (2000):
Exposure to airborne fungi, MVOC and mycotoxins in biowaste-handling facilities.
Int J Hyg Environ Health 203(2). S. 97-104.
- Fischer, G.; Thißen, R.; Hinz, R.-K.; Hollbach, N.; Schmitz, C.; Dott, W. (2005):
Luftgetragene Schimmelpilze in der Umwelt des Menschen - gesundheitliche Relevanz und Möglichkeiten der Risikobewertung.
Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft 65(9). S. 335-340.
- Fogelmark, B.; Rylander, R. (1997):
(1,3)-β-D-glucan in Some Indoor Air Fungi.
Indoor Built Environ 6. S. 291-294.

- Fogelmark, B.; Sjostrand, M.; Rylander, R. (1994):
Pulmonary inflammation induced by repeated inhalations of beta(1,3)-D-glucan and endotoxin.
Int J Exp Pathol 75(2). S. 85-90.
- Foto, M.; Plett, J.; Berghout, J.; Miller, J. D. (2004):
Modification of the Limulus ameocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments.
Anal Bioanal Chem 379(1). S. 156-62.
- Frasnelli, M. E.; Tarussio, D.; Chobaz-Peclat, V.; Busso, N.; So, A. (2005):
TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice.
Arthritis Res Ther 7(2). S. R370-9.
- Gantner, B. N.; Simmons, R. M.; Canavera, S. J.; Akira, S.; Underhill, D. M. (2003):
Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2.
J Exp Med 197(9). S. 1107-17.
- Gantner, B. N.; Simmons, R. M.; Underhill, D. M. (2005):
Dectin-1 mediates macrophage recognition of Candida albicans yeast but not filaments.
Embo J 24(6). S. 1277-86.
- Garrett, M. H.; Rayment, P. R.; Hooper, M. A.; Abramson, M. J.; Hooper, B. M. (1998):
Indoor airborne fungal spores, house dampness and associations with environmental factors and respiratory health in children.
Clin Exp Allergy 28(4). S. 459-67.
- Gehring, U.; Douwes, J.; Doekes, G.; Koch, A.; Bischof, W.; Fahlbusch, B.; Richter, K.; Wichmann, H. E.; Heinrich, J. (2001):
Beta(1->3)-glucan in house dust of German homes: housing characteristics, occupant behavior, and relations with endotoxins, allergens, and molds.
Environ Health Perspect 109(2). S. 139-44.
- Gorny, R. L.; Dutkiewicz, J. (2002):
Bacterial and fungal aerosols in indoor environment in Central and Eastern European countries.
Ann Agric Environ Med 9(1). S. 17-23.
- Graham, L. M.; Tsoni, S. V.; Willment, J. A.; Williams, D. L.; Taylor, P. R.; Gordon, S.; Dennehy, K.; Brown, G. D. (2006):
Soluble Dectin-1 as a tool to detect beta-glucans.
J Immunol Methods 314(1-2). S. 164-9.

- Hahn, P. Y.; Evans, S. E.; Kottom, T. J.; Standing, J. E.; Pagano, R. E.; Limper, A. H. (2003):
Pneumocystis carinii cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism.
J Biol Chem 278(3). S. 2043-50.
- Hartung, E.; Ollesch, K.; Haussermann, A.; Rieger, M.; Diefenbach, H.; Sundrum, A.; Ebke, M.; Lohmeyer, M. (2004):
Stallluftqualität und Arbeitsplatzbelastung in Mastschweinehaltungsverfahren.
Landtechnik 59(4). S. 220 - 221.
- Hartung, T.; Löwer, J.; Montag, T.; Wendel, A. (1999):
Pyrogentestung mit Vollblut.
In: Status-Workshop Pyrogentestung mit Vollblut.
Langen.
- Hauswirth, D. W.; Sundry, J. S. (2004):
Bioaerosols and innate immune responses in airway diseases.
Curr Opin Allergy Clin Immunol 4(5). S. 361-6.
- Hayes, R. B.; van Nieuwenhuize, J. P.; Raatgever, J. W.; ten Kate, F. J. (1984):
Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality.
Food Chem Toxicol 22(1). S. 39-43.
- Heldal, K. K.; Halstensen, A. S.; Thorn, J.; Djupesland, P.; Wouters, I.; Eduard, W.; Halstensen, T. S. (2003):
Upper airway inflammation in waste handlers exposed to bioaerosols.
Occup Environ Med 60(6). S. 444-50.
- Herre, J.; Marshall, A. S.; Caron, E.; Edwards, A. D.; Williams, D. L.; Schweighoffer, E.; Tybulewicz, V.; Reis e Sousa, C.; Gordon, S.; Brown, G. D. (2004):
Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages.
Blood 104(13). S. 4038-45.
- Hiipakka, D. W.; Buffington, J. R. (2000):
Resolution of sick building syndrome in a high-security facility.
Appl Occup Environ Hyg 15(8). S. 635-43.
- Hirata, N.; Tsuzuki, A.; Ohno, N.; Saita, M.; Adachi, Y.; Yadomae, T. (1998):
Cytokine synthesis of human monocytes stimulated by triple or single helical conformer of an antitumour (1->3)-beta-D-glucan preparation, sonifilan.
Zentralbl Bakteriell 288(3). S. 403-13.

- Hoffman, O. A.; Olson, E. J.; Limper, A. H. (1993):
Fungal beta-glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in response to bacterial lipopolysaccharide.
Immunol Lett 37(1). S. 19-25.
- Hoffmann, S.; Peterbauer, A.; Schindler, S.; Fennrich, S.; Poole, S.; Mistry, Y.; Montag-Lessing, T.; Spreitzer, I.; Loschner, B.; van Aalderen, M.; Bos, R.; Gommer, M.; Nibbeling, R.; Werner-Felmayer, G.; Loitzl, P.; Jungi, T.; Brcic, M.; Brugger, P.; Frey, E.; Bowe, G.; Casado, J.; Coecke, S.; de Lange, J.; Mogster, B.; Naess, L. M.; Aaberge, I. S.; Wendel, A. Hartung, T. (2005):
International validation of novel pyrogen tests based on human monocytoid cells.
J Immunol Methods 298(1-2). S. 161-73.
- Hohl, T. M.; Van Epps, H. L.; Rivera, A.; Morgan, L. A.; Chen, P. L.; Feldmesser, M.; Pamer, E. G. (2005):
Aspergillus fumigatus Triggers Inflammatory Responses by Stage-Specific beta-Glucan Display.
PLoS Pathog 1(3). S. e30.
- Hoopmann, H.; Hehl, O.; Werfel, T. (2005):
Effekte von Bioaerosolemissionen aus Tierställen auf asthmatische und allergische Symptome bei Kindern.
Umweltmed. Forsch. Prax. 10(5). S. 334-337.
- Hoppenheidt, K. (2002):
Bioaerosole als Bestandteil von Feinstäuben.
In: Wirkung und Erfassung von Fein- und Ultrafeinstäuben.
Braunschweig, 14.02.2002. -.
- Hoppenheidt, K.; Mücke, W. (1998):
Ursache, Messung und Bewertung von Luftverunreinigungen in Innenräumen.
In: Bioaerosole in Innenräumen.
Wackersdorf.
- Hussein, H. S.; Brasel, J. M. (2001):
Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals.
Toxicology 167(2). S. 101-34.
- Ibrahim-Granet, O.; Philippe, B.; Boleti, H.; Boisvieux-Ulrich, E.; Grenet, D.; Stern, M.; Latge, J. P. (2003):
Phagocytosis and intracellular fate of Aspergillus fumigatus conidia in alveolar macrophages.
Infect Immun 71(2). S. 891-903.

- Ishibashi, K.; Miura, N. N.; Adachi, Y.; Ohno, N.; Yadomae, T. (2001):
Relationship between solubility of grifolan, a fungal 1,3-beta-D-glucan, and production of tumor necrosis factor by macrophages in vitro.
Biosci Biotechnol Biochem 65(9). S. 1993-2000.
- Janusz, M. J.; Austen, K. F.; Czop, J. K. (1987):
Lysosomal enzyme release from human monocytes by particulate activators is mediated by beta-glucan inhibitable receptors.
J Immunol 138(11). S. 3897-901.
- Jarvis, B. B.; Miller, J. D. (2005):
Mycotoxins as harmful indoor air contaminants.
Appl Microbiol Biotechnol 66(4). S. 367-72.
- Jo, W. K.; Kang, J. H. (2006):
Workplace exposure to bioaerosols in pet shops, pet clinics, and flower gardens.
Chemosphere 65(10). S. 1755 - 61.
- Kataoka, K.; Muta, T.; Yamazaki, S.; Takeshige, K. (2002):
Activation of macrophages by linear (1right-arrow3)-beta-D-glucans. Implications for the recognition of fungi by innate immunity.
J Biol Chem 277(39). S. 36825-31.
- Keller, R.; Senkpiel, K.; Ohgke, H. (1998):
Geruchsbelastungen durch Schimmelpilze in Innenräumen - Sind sie objektivierbar.
Umweltmed. Forsch. Prax. 3(4). S. 215.
- Kirchhorn, S. R.; Garry, V. F. (2000):
Agricultural lung diseases.
Environ Health Perspect 108 Suppl 4. S. 705-12.
- Koch, A.; Heilemann, K. J.; Bischof, W.; Heinrich, J.; Wichmann, H. E. (2000):
Indoor viable mold spores--a comparison between two cities, Erfurt (eastern Germany) and Hamburg (western Germany).
Allergy 55(2). S. 176-80.
- Krüger, T.; Sigsgaard, T.; Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2004):
Ex vivo induction of cytokines by mould components in whole blood of atopic and non-atopic volunteers.
Cytokines 25. S. 73-84.

- Kulicke, W. M.; Lettau, A. I.; Thielking, H. (1997):
Correlation between immunological activity, molar mass, and molecular structure of different (1-->3)-beta-D-glucans.
Carbohydr Res 297(2). S. 135-43.
- Kurup, V. P.; Xia, J. Q.; Cramer, R.; Rickaby, D. A.; Choi, H. Y.; Fluckiger, S.; Blaser, K.; Dawson, C. A.; Kelly, K. J. (2001):
Purified recombinant *A. fumigatus* allergens induce different responses in mice.
Clin Immunol 98(3). S. 327-36.
- Linaker, C.; Smedley, J. (2002):
Respiratory illness in agricultural workers.
Occup Med (Lond) 52(8). S. 451-9.
- Linsel, G. (2001):
Bioaerosole - Entstehung und biologische Wirkung.
In: sicherer Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen und Zytostatika.
Braunschweig.
- Linsel, G.; Klug, K.; Otto, C.; Pliko, S. (2005):
Endotoxinbelastung in der Geflügelzucht.
In: Workshop "Luftqualität und Vollbluttest".
BAuA Berlin.
- Lowe, E.; Rice, P.; Ha, T.; Li, C.; Kelley, J.; Ensley, H.; Lopez-Perez, J.; Kalbfleisch, J.; Lowman, D.; Margl, P.; Browder, W.; Williams, D. (2001):
A (1-->3)-beta-D-linked heptasaccharide is the unit ligand for glucan pattern recognition receptors on human monocytes.
Microbes Infect 3(10). S. 789-97.
- Lugauskas, A.; Krikstaponis, A.; Sveistyte, L. (2004):
Airborne fungi in industrial environments--potential agents of respiratory diseases.
Ann Agric Environ Med 11(1). S. 19-25.
- Luhm, J.; Langenkamp, U.; Hensel, J.; Frohn, C.; Brand, J. M.; Hennig, H.; Rink, L.; Koritke, P.; Wittkopf, N.; Williams, D. L.; Mueller, A. (2006):
Beta-(1-->3)-D-glucan modulates DNA binding of nuclear factors kappaB, AT and IL-6 leading to an anti-inflammatory shift of the IL-1beta/IL-1 receptor antagonist ratio.
BMC Immunol 7. S. 5.
- Lull, C.; Wichers, H. J.; Savelkoul, H. F. (2005):
Anti-inflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites.
Mediators Inflamm 2005(2). S. 63-80.

- Macher, J. M.; Huang, F. Y.; Flores, M. (1991):
A two-year study of microbiological indoor air quality in a new apartment.
Arch Environ Health 46(1). S. 25-9.
- Madelin, T. M.; Clarke, A. F.; Mair, T. S. (1991):
Prevalence of serum precipitating antibodies in horses to fungal and thermophilic actinomycete antigens: effects of environmental challenge.
Equine Vet J 23(4). S. 247-52.
- Mambula, S. S.; Sau, K.; Henneke, P.; Golenbock, D. T.; Levitz, S. M. (2002):
Toll-like receptor (TLR) signaling in response to *Aspergillus fumigatus*.
J Biol Chem 277(42). S. 39320-6.
- Mandryk, J.; Alwis, K. U.; Hocking, A. D. (1999):
Work-related symptoms and dose-response relationships for personal exposures and pulmonary function among woodworkers.
Am J Ind Med 35(5). S. 481-90.
- Matthes, S. (1979):
Art und Zusammensetzung der Luftverunreinigungen in der Nutztierhaltung und ihre Wirkung in der Stallumgebung.
Dtsch Tierarztl Wochenschr 86. S. 262 - 265.
- McCann, F.; Carmona, E.; Puri, V.; Pagano, R. E.; Limper, A. H. (2005):
Macrophage internalization of fungal beta-glucans is not necessary for initiation of related inflammatory responses.
Infect Immun 73(10). S. 6340-9.
- McIntosh, M.; Stone, B. A.; Stanisich, V. A. (2005):
Curdlan and other bacterial (1->3)-beta-D-glucans.
Appl Microbiol Biotechnol 68(2). S. 163-73.
- Milton, D. K.; Alwis, K. U.; Fiset, L.; Muilenberg, M. (2001):
Enzyme-linked immunosorbent assay specific for (1->6) branched, (1->3)-beta-D-glucan detection in environmental samples.
Appl Environ Microbiol 67(12). S. 5420-4.
- Mücke, W.; Lemen, C. H. (1999):
Schimmelpilze-Vorkommen-Gesundheitsgefahren-Schutzmaßnahmen.
Landsberg: ecomed. - ISBN: 3-609-68000-9.

Mueller, A.; Raptis, J.; Rice, P. J.; Kalbfleisch, J. H.; Stout, R. D.; Ensley, H. E.; Browder, W.; Williams, D. L. (2000):

The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line.
Glycobiology 10(4). S. 339-46.

Müller, A.; Rice, P. J.; Ensley, H. E.; Coogan, P. S.; Kalbfleisch, J. H.; Kelley, J. L.; Love, E. J.; Portera, C. A.; Ha, T.; Browder, I. W. Williams, D. L. (1996):

Receptor Binding and Internalisation of a Water-Soluble (1,3)-β-D-Glucan Biologic Response Modifier in Two Monocyte/Macrophage Cell Lines.
The Journal of Immunology 156(9). S. 3418-3425.

Müller, W.; Gärtner, E.; Strauch, D. (1976):

Die Luftkeimflora in Geflügel- und Schweineställen.
Dtsch Tierarztl Wochenschr 83. S. 373 - 377.

Muta, T.; Seki, N.; Takaki, Y.; Hashimoto, R.; Oda, T.; Iwanaga, A.; Tokunaga, F.; Iwanaga, S. (1995):

Purified horseshoe crab factor G. Reconstitution and characterization of the (1-->3)-beta-D-glucan-sensitive serine protease cascade.
J Biol Chem 270(2). S. 892-7.

Nakagawa, Y.; Maeda, H.; Murai, T. (2002):

Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test system and with the rabbit pyrogen test.
Clin Diagn Lab Immunol 9(3). S. 588-97.

Nakagawa, Y.; Ohno, N.; Murai, T. (2003):

Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes.
J Infect Dis 187(4). S. 710-3.

Nardoni, S.; Mancianti, F.; Sgorbin, M.; Taccini, F.; Corazza, M. (2005):

Identification and seasonal distribution of airborne fungi in three horse stables in Italy.
Mycopathologia 160. S. 29-34.

Netea, M. G.; Van der Graaf, C.; Van der Meer, J. W.; Kullberg, B. J. (2004):

Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors.
Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23(9). S. 672-6.

Nowak, D. (1998):

[Health effects of airborne pollutants, particularly in swine confinement stalls, from the viewpoint of occupational medicine].
Dtsch Tierarztl Wochenschr 105(6). S. 225-34.

- Odabasi, Z.; Mattiuzzi, G.; Estey, E.; Kantarjian, H.; Saeki, F.; Ridge, R. J.; Ketchum, P. A.; Finkelman, M. A.; Rex, J. H.; Ostrosky-Zeichner, L. (2004):
Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome.
Clin Infect Dis 39(2). S. 199-205.
- Ohno, N.; Emori, Y.; Yadomae, T.; Saito, K.; Masuda, A.; Oikawa, S. (1990):
Reactivity of Limulus amoebocyte lysate towards (1----3)-beta-D-glucans.
Carbohydr Res 207(2). S. 311-8.
- Ohno, N.; Furukawa, M.; Miura, N. N.; Adachi, Y.; Motoi, M.; Yadomae, T. (2001):
Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei*.
Biol Pharm Bull 24(7). S. 820-8.
- Olson, E. J.; Standing, J. E.; Griego-Harper, N.; Hoffman, O. A.; Limper, A. H. (1996):
Fungal beta-glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages.
Infect Immun 64(9). S. 3548-54.
- Onderdonk, A. B.; Cisneros, R. L.; Hinkson, P.; Ostroff, G. (1992):
Anti-infective effect of poly-beta 1-6-glucotriosyl-beta 1-3-glucopyranose glucan in vivo.
Infect Immun 60(4). S. 1642-7.
- Pang, Z.; Otaka, K.; Maoka, T.; Hidaka, K.; Ishijima, S.; Oda, M.; Ohnishi, M. (2005):
Structure of beta-glucan oligomer from laminarin and its effect on human monocytes to inhibit the proliferation of U937 cells.
Biosci Biotechnol Biochem 69(3). S. 553-8.
- Pasanen, A. L.; Kalliokoski, P.; Pasanen, P.; Salmi, T.; Tossavainen, A. (1989):
Fungi carried from farmers' work into farm homes.
Am Ind Hyg Assoc J 50(12). S. 631-3.
- Pelizon, A. C.; Kaneno, R.; Soares, A. M.; Meira, D. A.; Sartori, A. (2005):
Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*.
Physiol Res 54(5). S. 557-64.
- Pickering, J. W.; Sant, H. W.; Bowles, C. A.; Roberts, W. L.; Woods, G. L. (2005):
Evaluation of a (1->3)-beta-D-glucan assay for diagnosis of invasive fungal infections.
J Clin Microbiol 43(12). S. 5957-62.

- Pirie, R. S.; Collie, D. D.; Dixon, P. M.; McGorum, B. C. (2003):
Inhaled endotoxin and organic dust particulates have synergistic proinflammatory effects in equine heaves (organic dust-induced asthma).
Clin Exp Allergy 33(5). S. 676-83.
- Platt, S. D.; Martin, C. J.; Hunt, S. M.; Lewis, C. W. (1989):
Damp housing, mould growth, and symptomatic health state.
Bmj 298(6689). S. 1673-8.
- Radon, K.; Opravil, U.; Hartung, J.; Szadkowski, D.; Nowak, D. (1999):
Work-related Respiratory Disorders and Farming Characteristics Among Cattle Farmers in Northern Germany.
Am J Ind Med 36. S. 444-449.
- Radon, K.; Schulze, A.; VanStrien, R.; Ehrenstein, V.; Praml, G.; Nowak, D. (2005):
Atemwegsgesundheit und Allergiestatus bei jungen Erwachsenen in ländlichen Regionen Niedersachsens - Niedersächsische Lungenstudie NiLS.
Umweltmed. Forsch. Prax. 10(5). S. 335.
- Ramazzini, B. (1940)
De morbis artificum diatriba. The University of Chicago Press. Chicago.
- Rapp, H. J.; Weiss, R.; Bockisch, F. J.; Becker, M.; Stechele, M. (1991):
[Studies in riding arenas and on different riding path surfaces with respect to respiratory tract contamination in horses. Air hygiene studies in riding arenas].
Tierarztl Prax 19(1). S. 74-81.
- Revankar, S. G. (2003):
Clinical implications of mycotoxins and Stachybotrys.
Am J Med Sci 325(5). S. 262-74.
- Rice, P. J.; Lockhart, B. E.; Barker, L. A.; Adams, E. L.; Ensley, H. E.; Williams, D. L. (2004):
Pharmacokinetics of fungal (1-3)- β -D-glucans following intravenous administration in rats.
Int. Immunopharmacology 4. S. 1209 - 1215.
- Rieger, M. (2001):
Biologische Belastungen der Beschäftigten in der Landwirtschaft.
Wuppertal, Bergische Universität GH Wuppertal. 312 S.
- Riggi, S. J.; Di Luzio, N. R. (1961):
Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan.
Am J Physiol 200. S. 297-300.

- Roeder, A.; Kirschning, C. J.; Rupec, R. A.; Schaller, M.; Weindl, G.; Korting, H. C. (2004):
Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity.
Med Mycol 42(6). S. 485-98.
- Rolle, M.; Mayer, A. (1993):
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen,
Agrarwissenschaftler und Interessierte aus benachbarten Fachgebieten: Lehrbuch für
Praxis und Studium. - 6.
Stuttgart: Enke. - ISBN: 3-432-84686.
- Romani, L. (2004):
Immunity to fungal infections.
Nat Rev Immunol 4(1). S. 1-23.
- Ronald, L. A.; Davies, H. W.; Bartlett, K. H.; Kennedy, S. M.; Teschke, K.; Spithoven, J.;
Dennekamp, M.; Demers, P. A. (2003):
Beta(1-->3)-glucan exposure levels among workers in four British Columbia sawmills.
Ann Agric Environ Med 10(1). S. 21-9.
- Roth, L.; Frank, H.; Kormann, K. (1990):
Giftpilze-Pilzgifte/Schimmelpilze-Mykotoxine; Vorkommen, Inhaltsstoffe, Pilzallergien,
Nahrungsmittelvergiftungen.
Landsberg/Lech: Ecomed Verlag. - ISBN: 3-609-64730-2.
- Roubroeks, J. P.; Skjak-Braek, G.; Ryan, L.; Christensen, B. E. (2000):
Molecular weight dependency on the production of the TNF stimulated by fractions of
rye (1-->3),(1-->4)-beta-D-glucan.
Scand J Immunol 52(6). S. 584-7.
- Rylander, R. (1996):
Airway Responsiveness and Chest Symptoms after Inhalation of Endotoxin or (1,3)- β -
D-Glucan.
Indoor Built Environ 5. S. 106-111.
- Rylander, R. (1999a):
Indoor Air-Related Effects and Airborne (1-3)- β -d-Glucan.
Environmental Health Perspectives 107(Suppl. 3).
- Rylander, R. (2001):
The role of endotoxin and (1,3)- β -D-glucan as synergistic agents in lung inflammation
and allergy.
In: Second World Equine Airways Symposium.
Edinburgh, Scotland. S. 9.

- Rylander, R.; Carvalheiro, M. F. (2006):
Airways inflammation among workers in poultry houses.
Int Arch Occup Environ Health 79(6). S. 487-90.
- Rylander, R.; Fogelmark, B. (1994):
Inflammatory responses by inhalation of endotoxin and (1-->3)-beta-D-glucan.
Am J Ind Med 25(1). S. 101-2.
- Rylander, R.; Lin, R. H. (2000):
(1-->3)-beta-D-glucan - relationship to indoor air-related symptoms, allergy and
asthma.
Toxicology 152(1-3). S. 47-52.
- Rylander, R.; Norrhall, M.; Engdahl, U.; Tunsater, A.; Holt, P. G. (1998):
Airways inflammation, atopy, and (1--> 3)-beta-D-glucan exposures in two schools.
Am J Respir Crit Care Med 158(5 Pt 1). S. 1685-7.
- Rylander, R.; Person, K.; Goto, H.; Yuasa, K.; Tanaka, S. (1992):
Airborne beta-1,3-Glucan May be Related to Symptoms in Sick Building.
Indoor Environ 1. S. 263-267.
- Rylander, R.; Thorn, J.; Attefors, R. (1999b):
Airways inflammation among workers in a paper industry.
Eur Respir J 13(5). S. 1151-7.
- Saito, H.; Yoshioka, Y.; Uehara, N.; Aketagawa, J.; Tanaka, S.; Shibata, Y. (1991):
Relationship between conformation and biological response for (1----3)-beta-D-
glucans in the activation of coagulation factor G from limulus amebocyte lysate and
host-mediated antitumor activity. Demonstration of single-helix conformation as a
stimulant.
Carbohydr Res 217. S. 181-90.
- Sato, K.; Yang, X. L.; Yudate, T.; Chung, J. S.; Wu, J.; Luby-Phelps, K.; Kimberly, R. P.;
Underhill, D.; Cruz, P. D., Jr.; Ariizumi, K. (2006):
Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor
gamma chain to induce innate immune responses.
J Biol Chem 281(50). S. 38854-66.
- Scharf, P. (2005):
Einfluss einer biologischen Abluftreinigungsanlage auf die Emission von
Mikroorganismen und Endotoxinen aus einem Entenmaststall.
Berlin, Freie Universität. 115 S.

- Schenker, M. (1998):
Respiratory health hazards in agriculture.
Am J Respir Crit Care Med 158. S. 1-76.
- Schindler, S.; Asmus, S.; vonAulock, S.; Wendel, A.; Hartung, T.; Fennrich, S. (2004):
Cryopreservation of human whole blood for pyrogenicity testing.
J Immunol Methods 294. S. 89-100.
- Schütze, U. (2002):
Sammlung und Differenzierung von luftgetragenen Schimmelpilzen in Tierställen.
Berlin, Freie Universität. 171 S.
- Seedorf, J.; Hartung, J.; Schröder, M.; Linkert, K. H.; Phillips, V. R.; Holden, M. R.; Sneath, R. W.; Short, J. L.; White, R. P.; Pedersen, S.; Takai, H.; Johnsen, J. O.; Metz, J. H. M.; Groot Koerkamp, P. W. G.; Uenk, G. H. Wathes, C. M. (1998):
Concentrations and Emissions of Airborne Endotoxins and Microorganisms in Livestock Buildings in Northern Europe.
J Agric Engng Res 70. S. 97 - 109.
- Sha, Q.; Truong-Tran, A. Q.; Plitt, J. R.; Beck, L. A.; Schleimer, R. P. (2004):
Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists.
Am J Respir Cell Mol Biol 31(3). S. 358-64.
- Singh, J. (2005):
Toxic Moulds and Indoor Air.
Indoor Built Environ 14. S. 229 - 234.
- Sjostrand, M.; Rylander, R. (1997):
Pulmonary cell infiltration after chronic exposure to (1-->3)-beta-D-glucan and cigarette smoke.
Inflamm Res 46(3). S. 93-7.
- Skaug, M. A.; Eduard, W.; Stormer, F. C. (2001):
Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia.
Mycopathologia 151(2). S. 93-8.
- Smoragiewicz, W.; Cossette, B.; Boulard, A.; Krzysztyniak, K. (1993):
Trichothecene mycotoxins in the dust of ventilation systems in office building.
Int Arch Occup Environ Health 55. S. 113-117.
- Soltys, J.; Quinn, M. T. (1999):
Modulation of endotoxin- and enterotoxin-induced cytokine release by in vivo treatment with beta-(1,6)-branched beta-(1,3)-glucan.
Infect Immun 67(1). S. 244-52.

- Sorensen, K. K.; Melkko, J.; Smedsrod, B. (1998a):
Scavenger-receptor-mediated endocytosis in endocardial endothelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*.
J Exp Biol 201(Pt 11). S. 1707-18.
- Sorenson, W. G.; Shahan, T. A.; Simpson, J. (1998b):
Cell wall preparations from environmental yeasts: effect on alveolar macrophage function in vitro.
Ann Agric Environ Med 5(1). S. 65-71.
- Steele, C.; Marrero, L.; Swain, S.; Harmsen, A. G.; Zheng, M.; Brown, G. D.; Gordon, S.; Shellito, J. E.; Kolls, J. K. (2003):
Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor.
J Exp Med 198(11). S. 1677-88.
- Steele, C.; Rapaka, R. R.; Metz, A.; Pop, S. M.; Williams, D. L.; Gordon, S.; Kolls, J. K.; Brown, G. D. (2005):
The Beta-Glucan Receptor Dectin-1 Recognizes Specific Morphologies of *Aspergillus fumigatus*.
PLoS Pathog 1(4). S. e42.
- Sweeney, M. J.; Dobson, A. D. (1998):
Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species.
Int J Food Microbiol 43(3). S. 141-58.
- Tada, H.; Nemoto, E.; Shimauchi, H.; Watanabe, T.; Mikami, T.; Matsumoto, T.; Ohno, N.; Tamura, H.; Shibata, K.; Akashi, S.; Miyake, K.; Sugawara, S. Takada, H. (2002):
Saccharomyces cerevisiae- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner.
Microbiol Immunol 46(7). S. 503-12.
- Tanaka, H.; Saikai, T.; Sugawara, H.; Takeya, I.; Tsunematsu, K.; Matsuura, A.; Abe, S. (2002):
Workplace-related chronic cough on a mushroom farm.
Chest 122(3). S. 1080-5.
- Thorn, J.; Beijer, L.; Rylander, R. (1998):
Airways inflammation and glucan exposure among household waste collectors.
Am J Ind Med 33(5). S. 463-70.
- Thorn, J.; Beijer, L.; Rylander, R. (2001):
Effects after inhalation of (1-->3)-beta-D-glucan in healthy humans.
Mediators Inflamm 10(4). S. 173-8.

- Thorn, J.; Rylander, R. (1998):
Airways inflammation and glucan in a rowhouse area.
Am J Respir Crit Care Med 157(6 Pt 1). S. 1798-803.
- Thorne, P.; Duchaine, C.; Douwes, J.; Eduard, W.; Gorny, R. L.; Jacobs, R. R.; Reponen, T.; Schierl, R.; Szponar, B. (2004):
Working Group Report 4: Exposure Assessment for Biological Agents.
Am J Ind Med 46. S. 419-422.
- Von Aulock, S. (2005):
Varianz von Blutspendern.
In: Workshop Luftqualität und Vollbluttest.
BAuA Berlin.
- Van Gucht, S.; van Reeth, K.; Pensaert, M. (2003):
Interaction between Porcine Reproductive-Respiratory Syndrome Virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease.
J Clin Microb 41. S.960-966
- Vujanovic, V.; Smoragiewicz, W.; Krzysztyniak, K. (2001):
Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air.
Environ Toxicol 16(1). S. 1-8.
- Wan, G. H.; Li, C. S. (1999):
Indoor endotoxin and glucan in association with airway inflammation and systemic symptoms.
Arch Environ Health 54(3). S. 172-9.
- Ward, M.; Couetil, L. (2005):
Climatic and aeroallergen risk factors for chronic obstructive pulmonary disease in horses.
Am J Vet Res 66. S. 818-824.
- Weber, H. (1993):
Allgemeine Mykologie.
Jena: Gustav Fischer Verlag. - ISBN: 3-334-60391.
- Webster, A. J.; Clarke, A. F.; Madelin, T. M.; Wathes, C. M. (1987):
Air hygiene in stables. 1: Effects of stable design, ventilation and management on the concentration of respirable dust.
Equine Vet J 19(5). S. 448-53.

- Weigandt, M. (2000):
Der Humane Vollblut-Pyrogentest.
Heidelberg, Ruprecht-Karls-Universität. 139 S.
- Williams, D. L. (1994):
(1-3)- β -D-Glucans.
In: Organic Dust, Exposure, Effects and Prevention. / R. Rylander, nd R. R. Jacobs
(Hrsg.). Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo: Lewis Publishers. - ISBN: 978-
0873716994. - S. 83 - 85.
- Williams, D. L. (1996):
Overview of (1-3)- β -D-glucan chemistry, immunology and toxicology.
In: 20th cotton and other other organic dusts research conference, Beltwide Cotton
Conferences.
Memphis, TN, National Cotton Council. -. S. 285 - 288.
- Williams, D. L. (1997):
Overview of (1-3)-beta-D-glucan immunobiology.
Med Inflamm 6. S. 247-250.
- Williams, J. D.; Topley, N.; Alobaidi, H. M.; Harber, M. J. (1986):
Activation of human polymorphonuclear leucocytes by particulate zymosan is related
to both its major carbohydrate components: glucan and mannan.
Immunology 58(1). S. 117-24.
- Willment, J. A.; Gordon, S.; Brown, G. D. (2001):
Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced
isoforms.
J Biol Chem 276(47). S. 43818-23.
- Willment, J. A.; Lin, H. H.; Reid, D. M.; Taylor, P. R.; Williams, D. L.; Wong, S. Y.; Gordon,
S.; Brown, G. D. (2003):
Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-
CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone,
and lipopolysaccharide.
J Immunol 171(9). S. 4569-73.
- Willment, J. A.; Marshall, A. S.; Reid, D. M.; Williams, D. L.; Wong, S. Y.; Gordon, S.; Brown,
G. D. (2005):
The human beta-glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to
murine Dectin-1 on primary cells.
Eur J Immunol 35(5). S. 1539-47.

- Wouters, I. M.; Spaan, S.; Douwes, J.; Doekes, G.; Heederik, D. (2006):
Overview of Personal Occupational Exposure Levels to Inhalable Dust, Endotoxin, β (1-3)-Glucan and Fungal Extracellular Polysaccharides in the Waste Management Chain.
Ann Occup Hyg 50(1). S. 39-53.
- Würtz, H.; Sigsgaard, T.; Valbjorn, O.; Doekes, G.; Meyer, H. W. (2005):
The dustfall collector - a simple passive tool for long-term collection of airborne dust: a project under the Danish Mould in Buildings program (DAMIB).
Indoor Air 15 (Suppl 9). S. 33-40.
- Yamamoto, Y.; Klein, T. W.; Friedman, H. (1997):
Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1 β (MIP-1 β), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages.
Infect Immun 65(3). S. 1077-82.
- Yike, I.; Rand, T. G.; Dearborn, D. G. (2005):
Acute inflammatory responses to *Stachybotrys chartarum* in the lungs of infant rats: time course and possible mechanisms.
Toxicol Sci 84(2). S. 408-17.
- Young, S. H.; Robinson, V. A.; Barger, M.; Frazer, D. G.; Castranova, V.; Jacobs, R. R. (2003):
Partially opened triple helix is the biologically active conformation of 1- \rightarrow 3- β -glucans that induces pulmonary inflammation in rats.
J Toxicol Environ Health A 66(6). S. 551-63.
- Zhang, L.; Li, X.; Xu, X.; Zeng, F. (2005):
Correlation between antitumor activity, molecular weight, and conformation of lentinan.
Carbohydr Res 340(8). S. 1515-21.
- Zimmermann, J. W.; Lindermuth, J.; Fish, P. A.; Palace, G. P.; Stevenson, T. T.; DeMong, D. E. (1998):
A Novel Carbohydrate-Glycosphingolipid Interaction between a β -(1,3)-Glucan Immunomodulator, PGG-Glucan and Lactosylceramide of Human Leukocytes.
J Biol Chem 273(34). S. 22014-22020.
- Zucker, B. A. (2004)
Luftgetragene Endotoxine in Tierställen: Konzentrationen, Quellen, Umweltstabilität und Bewertung der Markerfunktion zur Beurteilung gesundheitlicher Gefahren infolge organischer Staubbelastungen
Habilitation, Berlin, Freie Universität, 248 S.

- Zucker, B. A.; Bonin, H.; Müller, W. (2005):
[Relationship between the concentration of different bioaerosol components and the general hygienic condition in two pig fattening houses].
Berl Münch Tierärztl Wochenschr 118(5-6). S. 224-8.
- Zucker, B. A.; Linsel, G.; Fennrich, S.; Kindinger, I.; Hartung, T., Müller, W. (2002):
Characterization of organic dust exposure by using a human whole blood assay.
Landbauforschung Völkenrode 235. S. 125-128.
- Zucker, B.-A.; Linsel, G.; Fennrich, S.; Müller, W. (2004):
Die Charakterisierung der entzündungsauslösenden Potenz von Bioaerosolen mittels Interleukinfreisetzung aus humanem Vollblut.
Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft 64. S. 153-158.
- Zucker, B. A.; Scharf, P.; Kersten, C. (2006):
Determination of the inflammatory potential of bioaerosols from a duck-fattening unit by using a limulus amoebocyte lysate assay and human whole blood cytokine response.
J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 53(4). S. 176-80.
- Zucker, B. A.; Trojan, S.; Müller, W. (2000):
Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses.
J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 47(1). S. 37-46.

9 Anhang

Tabelle 14: Durchführung des IL-1 β -ELISA

Arbeitsschritt	Reagenzien	Puffer
Beschichten	Coating-Antikörper (1 μ g/ml) in Coating Buffer 50 μ l/well	Coatingpuffer: 0,03 M Natriumcarbonat + 0,068 M Natriumhydrogencarbonat
Inkubation über Nacht bei 4 $^{\circ}$ C		
Blockieren	200 μ l/well PBS/ 3% BSA	PBS/3%BSA
2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren		
2-mal waschen		Waschpuffer (1l PBS pH 7,0 + 0,2 ml Tween 20)
Zugabe des Antigens	50 μ l/well der Überstände aus der Vollblutinkubation und des IL-1 β -Standard	PBS/3%BSA
Zugabe des Tracers	50 μ l/well Tracer-Antikörper (0,1 μ g/ml) in PBS/3%BSA	PBS/3%BSA
2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren		
6-mal waschen		Waschpuffer (s.oben)
Zugabe von POD	100 μ l/well POD (50 ng/ml) in PBS/3% BSA	PBS/3%BSA
30 min Inkubation bei Raumtemperatur		
8-mal waschen		Waschpuffer (s.oben)
Zugabe von TMB	100 μ l/well TMB	
20 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln		
Abstoppen der Reaktion	50 μ l/well 1 M H ₂ SO ₄	
Ablesen mit ELISA-Reader bei 450 nm		

Tabelle 15 : Durchführung des IL-6-ELISA

Arbeitsschritt	Reagenzien	Puffer
Beschichten	Coating-Antikörper (1µg/ml) in Coating Buffer 100µl/well	PBS 4% pH 7,4
Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur		
Blockieren	300 µl/well Blocking Buffer	4% BSA, 5% Saccharose in PBS
1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren		
Zugabe des Antigens	50 µl/well der Überstände aus der Vollblutinkubation und des IL-6-Standard	PBS 4% pH 7,4
1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren		
3-mal waschen		Waschpuffer: PBS pH 7,4 + 1ml Tween 20/l
Zugabe des Tracers	50 µl/well Tracer-Antikörper (0,1µg/ml) in PBS/4%BSA	PBS/4%BSA pH 7,4
1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren		
3-mal waschen		Waschpuffer (s.oben)
Zugabe von POD	100 µl/well POD (50 ng/ml) in PBS/4% BSA	PBS/4%BSA pH 7,4
30 min Inkubation bei Raumtemperatur		
3-mal waschen		Waschpuffer (s.oben)
Zugabe von TMB	100 µl/well TMB	
20 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln		
Abstoppen der Reaktion	100 µl/well 0,18 M H ₂ SO ₄	
AbleSEN mit ELISA-Reader bei 450nm		

Tabelle 16: Durchführung des GlucateLL-Tests

Arbeitsschritt	Reagenzien
Reagenzien herstellen	<ul style="list-style-type: none"> • Pachyman-Standard: vorgegebene Menge Reagenzwasser zugeben und 1 min schütteln • GlucateLLreagenz mit 2,8 ml Pyrosol rekonstituieren • Stopplösung: 1N HCL-Lösung und Natriumnitrit • Diazo-Reagenz: 4 ml Reagenzwasser in das Fläschchen Ammoniumsulfamat geben und das Fläschchen N-Methyl-Pyrrolidinon zu dem Fläschchen NEDA geben
Standard herstellen	Jeweils 500 µl Reagenzwasser vorlegen und beginnend aus der Pachyman-Stammlösung (100 pg/ml) 500 µl übertragen (Ergibt Standardreihe in den Konzentrationen 50 pg/ml, 25 pg/ml, 12,5 pg/ml, 6,25 pg/ml)
Plattenbelegung	50 µl/well Probe bzw. Standard anschließend Zugabe von 50µl/well GlucateLL-Reagenz
Platte abdecken, schütteln und für 25 min bei 37°C inkubieren	
Reaktionsstopp	50 µl/well Stopplösung
Auslösung der Farbreaktion	50 µl/well Ammoniumsulfamat anschließend 50 µl/well NEDA
Ablesen im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 540-550 nm und Reaktionsauswertung	

Tabelle 17: Durchführung des LAL-Tests

Arbeitsschritt	Reagenzien
Reagenzien vorbereiten	LAL-Substrat in 6,5 ml LAL-Wasser lösen LAL-Lysat in 3,0 ml LAL-Wasser lösen Standard und Spike aus CSE herstellen
Plattenbelegung	50 µl/well Probe bzw. Standard
Platte im Brutschrank vorwärmen	
Zugabe von 50 µl Lysat/well, 15minütige Inkubation bei 37°C	LAL-Lysat
Zugabe von 100µl Substrat/well, sechsminütige Inkubation bei 37°C	LAL-Substrat
Reaktionsstopp	100 µl 25%ige Essigsäure
Messung im Mikrotiterplattenlesegerät bei 405nm und Reaktionsauswertung	

Publikationen

- Poster
- Hinz, Stefanie:
Luftgetragene Glucane in Tierställen: Konzentration und Bewertung der proinflammatorischen Aktivität.

Doktoranden-Symposium.
Berlin, 23.6.2006
1. Doktoranden-Symposium
2006: Mensch und Buch, 2006. - S. 37
ISBN:3-89820-793-5
- Zucker, B.; Eckardt, K.; Hinz, S.:
Proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen in Tierställen.
Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) Tagung der
Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie.
Wetzlar, 14.-17.6.2006
Abstr. in : Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120(1-2), 2007
S. 22, P32
- Vorträge
- Hinz, Stefanie:
Konzentration und Bewertung der proinflammatorischen Aktivität
luftgetragener Glucane in Tierställen.

2. Doktoranden-Symposium.
Berlin, 8.6.2007
2. Doktoranden-Symposium
Berlin: Mensch und Buch , 2007. - S. 13
ISBN:978-3-86664-235-5
- Hinz, S.; Eckardt, K.; Zucker, B. A. :
Untersuchungen zur proinflammatorischen Aktivität von Glucanen und
Endotoxinen in Bioaerosolproben aus Tierställen.

Mikrobielle Luftverunreinigungen.
Freising-Weihenstephan, 11./12.10.2007
KRdL-Schriftenreihe 39
S. 114-119
ISBN:3-931384-60-8

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Bert-André Zucker für die Überlassung des Themas, die maßgebliche und freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die wissenschaftlichen Anregungen.

Den Mitarbeiterinnen des Instituts für Tier- und Umwelthygiene möchte ich für die freundliche Zusammenarbeit danken. Der Dank gilt besonders Frau K. Fiedler und Frau H. Jansen für die tatkräftige Unterstützung bei der Untersuchung meiner Proben.

Ich bedanke mich bei den beteiligten Betrieben für die Möglichkeit die Probennahme durchzuführen.

Außerdem möchte ich Dr. Gunnar Linsel und Frau K. Klug vom Bundesinstitut für Arbeitsmedizin für die wissenschaftlichen Anregungen und die Blutabnahmen danken.

Mein Dank gilt außerdem dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Ein besonderer Dank gilt auch meinen Eltern und meinem Bruder, die mich unermüdlich unterstützt haben und ohne die die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Selbstständigkeitserklärung

Selbstständigkeitserklärung:

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22.07.2008

Stefanie Hinz