

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

**Charakterisierung der endotoxinbedingten
proinflammatorischen Aktivität von Bioaerosolen
aus Tierställen**

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

vorgelegt von
Kathrin Eckardt
Tierärztin aus
Königs Wusterhausen

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3264

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 Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Michael Schmidt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Aerosols; Air Quality; Animal Housing; Blood; Cytokines; Endotoxins; Inflammation;
Limulus; Lipopolysaccharides; Stables

Tag der Promotion: 06.02.2009

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: 978-3-86664-583-7

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.

© Oleg Tarasov - Fotolia.com

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© mensch und buch verlag 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meiner Familie

INHALT	Seite
1. Einleitung und Zielsetzung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Allgemeine Definitionen	2
2.2 Allgemeine gesundheitliche Wirkungen von Aerosolen	5
2.2.1 Aufnahme, Transport und Ablagerung von Aerosolen in den Atmungsorganen	6
2.2.2 Individuelle Disposition des belasteten Organismus	6
2.2.3 Zusammensetzung des Aerosols	7
2.3 Bioaerosole	7
2.3.1 Krankheitsbilder durch Bioaerosolbelastungen	8
2.3.1.1 Allergien	9
2.3.1.2 Asthma bronchiale	10
2.3.1.3 Chronische Bronchitis	10
2.3.1.4 Organic Dust Toxic Syndrome	11
2.4 Proinflammatorische Agentien in Bioaerosolen	12
2.4.1 Aufbau der Zellwand von gramnegativen Bakterien	12
2.4.2 Endotoxine	13
2.4.2.1 Wirkung der Endotoxine	14
2.4.2.2 Zelluläre Mechanismen nach Endotoxinexposition	16
2.4.3 Selektive Hemmung der Endotoxinwirkung durch spezifische endotoxin- neutralisierende Substanzen	17
2.4.3.1 Polymyxin B	17
2.4.3.2 Endotoxin-Neutralizing-Protein	18
2.4.4 Quantifizierung luftgetragener proinflammatorischer Substanzen	19
2.4.4.1 Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test	19
2.4.4.2 Humaner Vollbluttest	20
2.5 Festlegungen über die Messtechnik luftgetragener Staubfraktionen	21

3. Material und Methoden	22
3.1 Vorversuche zur Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität	22
3.1.1 Wirkung von Polymyxin B	22
3.1.1.1 Ermittlung der optimalen endotoxinneutralisierenden Konzentration von PB	22
3.1.1.2 Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität eines weiteren Endotoxins	23
3.1.1.3 Einfluss von PB auf proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine	23
3.1.1.4 Einfluss von PB auf Bioaerosolproben	23
3.1.2 Wirkung von Endotoxin-Neutralizing-Protein	23
3.1.2.1 Ermittlung der optimalen endotoxinneutralisierenden Konzentration von ENP	23
3.1.2.2 Einfluss von ENP auf proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine	24
3.1.2.3 Einfluss von ENP auf Bioaerosolproben	24
3.2 Hauptversuche zur Charakterisierung der endotoxin- und nicht-endotoxinbedingten proinflammatorischen Aktivität von Bioaerosolen in Tierställen	24
3.2.1 Beschreibung der untersuchten Tierställe	24
3.2.2 Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität in den Bioaerosolproben	24
3.2.2.1 Sammlung der Bioaerosolproben	25
3.2.2.2 Durchführung des humanen Vollbluttests	26
3.3 Bestimmung der Konzentration an Endotoxinen in den Bioaerosolproben	30
3.3.1 Sammlung der Bioaerosolproben	30
3.3.2 Bestimmung der Endotoxinkonzentration mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test	30
3.4 Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Bakterien in den untersuchten Tierställen	31
3.5 Bestimmung der endotoxinbedingten und nicht-endotoxinbedingten proinflammatorischen Aktivität in potentiellen Quellen für Bioaerosole	31
3.6 Statistische Auswertung	32

4.	Ergebnisse	33
4.1	Vorversuche zur Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität	33
4.1.1	Charakterisierung der endotoxinneutralisierenden Eigenschaften von Polymyxin B	33
4.1.1.1	Ermittlung der optimalen Konzentration von Polymyxin B	33
4.1.1.2	Einfluss von PB auf <i>E.coli</i> -LPS 0113:H10	34
4.1.1.3	Einfluss von PB auf proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine	34
4.1.1.4	Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen	34
4.1.2	Charakterisierung der endotoxinneutralisierenden Eigenschaften von Endotoxin-Neutralizing-Protein (ENP)	35
4.1.2.1	Ermittlung der optimalen Konzentration des ENP	35
4.1.2.2	Einfluss von ENP auf proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine	35
4.1.2.3	Einfluss von ENP auf die proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen	36
4.2	Hauptversuche zur Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität	37
4.2.1	Konzentration an luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffen, Endotoxinen, Staub und Bakterien in Bioaerosolen aus den untersuchten Tierställen	37
4.2.2	Gesamt-proinflammatorische - und nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität in den Bioaerosolproben	44
4.2.2.1	Beziehungen zwischen gesamt-proinflammatorischer, endotoxinbedingter-, nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität, Staubkonzentration sowie endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben	46
4.2.2.2	Vergleich der proinflammatorischen und der endotoxischen Aktivität in den untersuchten Staubfraktionen (Einatembare- und PM10-Staubfraktion)	54
4.2.2.3	Bestimmung der proinflammatorischen Aktivität ausgewählter Bioaerosolproben mittels eines humanen Vollbluttestes auf Basis der IL-6-Aktivität	56
4.2.2.3.1	Beziehungen zwischen der gesamt-proinflammatorischen Aktivität auf Basis der IL-6- und IL-1 β -Aktivitätsbestimmung	57
4.2.2.3.2	Beziehungen zwischen der endotoxischen Aktivität und der gesamt-proinflammatorischen Aktivität (IL-6) ausgewählter Bioaerosolproben	58
4.2.3	Proinflammatorische Aktivität potentieller Bioaerosolquellen aus Tierställen	59
4.2.3.1	Gesamt-proinflammatorische - und nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen	60

4.2.3.2	Beziehungen zwischen gesamt-proinflammatorischer Aktivität, endotoxinbedingter-, nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität und endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen	61
5.	Diskussion	62
5.1	Endotoxinneutralisierende Eigenschaften von Polymyxin B und Endotoxin-Neutralizing-Protein	62
5.2	Charakterisierung der Belastung der Stallluft mit luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffen, Endotoxinen, Staub und Bakterien	62
5.2.1	Endotoxinbedingte und nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität in den untersuchten Bioaerosolproben	64
5.2.2	Beziehungen zwischen endotoxinbedingter -, nicht-endotoxinbedingter - gesamt-proinflammatorischer Aktivität, Staubkonzentration und endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben	65
5.2.3	Über- und Unterbewertung der proinflammatorischen Potenz durch den LAL-Test	66
5.2.4	Verteilung der proinflammatorischen und der endotoxischen Aktivität in den untersuchten Staubfraktionen	67
5.3	Bestimmung der proinflammatorischen und der endotoxischen Aktivität von potentiellen Bioaerosolquellen	68
5.4	Tier- und umwelthygienische Aspekte zur Verminderung von Bioaerosolbelastungen in Tierställen	68
6.	Zusammenfassung	70
7.	Summary	72
8.	Literaturverzeichnis	74
9.	Anhang	94

ABKÜRZUNGEN

α	= Signifikanzniveau
Abb.	= Abbildung
AK	= Antikörper
AS	= Aminosäure
BIA	= Bundesgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz
BSA	= Bovines Serum Albumin
CD	= Cluster of Differentiation
COPD	= Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CSE	= Control Standard Endotoxin
d_{ae}	= aerodynamischer Durchmesser
d_D	= Diffusionsäquivalentdurchmesser
DIN	= Deutsches Institut für Normung
EAA	= Exogen Allergische Alveolitis
ELISA	= Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENP	= Endotoxin Neutralizing Protein
EEU	= Endotoxin Equivalent Unit
EU	= Endotoxin Unit
GKZ	= Gesamtkoloniezahl
Ig	= Immunglobulin
IL	= Interleukin
KbE	= Kolonie bildende Einheit
kDa	= Kilodalton
LAL	= Limulus-Amöbozyten-Lysat
log	= dekadischer Logarithmus
rLALF	= rekombinanter Limulus-Anti-LPS-Faktor
LBP	= Lipopolysaccharid Binding Protein
LPS	= Lipopolysaccharid
M	= Molar
MAK	= Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
mOD	= mittlere Optische Dichte
MW	= Mittelwert
n	= Anzahl
ODTS	= Organic Dust Toxic Syndrome
PB	= Polymyxin B
PBS	= Phosphate Buffer Saline
PM	= Particulate Matter
proinfl.	= proinflammatorisch
r	= Korrelationskoeffizient
rpm	= rounds per minute
s	= Standardabweichung
spp.	= Subspezies
TLR	= Toll-Like-Rezeptor
TNF	= Tumor-Nekrose-Faktor
VDI	= Verein Deutscher Ingenieure
WHO	= World Health Organization

1. Einleitung und Zielsetzung

Die Luft in Tierställen enthält Gase (z.B. Ammoniak, Kohlendioxid), Staubpartikel und Mikroorganismen wie Bakterien, Viren und Pilze. Diese auch als Bioaerosole bezeichneten organischen Stäube spielen eine große Rolle als Verursacher für diverse Atemwegserkrankungen bei Landwirten und aufgestallten Tieren. Besonders den Endotoxinen als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien wird hierbei eine große Bedeutung beigemessen, da viele im Zusammenhang mit Bioaerosolbelastungen stehende Krankheiten (z.B. Organic Dust Toxic Syndrome, Farmerlunge, chronische Bronchitis) ursächlich auch auf die Wirkung dieser Substanzen zurückgeführt werden (Rylander, 1994; Douwes et Heederik, 1997). Es ist zwar hinreichend bekannt, dass Endotoxine in Bioaerosolen aus Tierställen qualitativ gesehen die stärkste entzündungsauslösende Komponente sind, in welchem quantitativen Verhältnis sie aber zu anderen, weiterhin vorhandenen entzündungsauslösenden Substanzen (u.a. Glucane, Lipoteichonsäuren, Tannine) stehen, ist bisher nicht systematisch untersucht worden (Hoppenheidt, 2002; Zucker et al., 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die proinflammatorische Potenz von Bioaerosolen aus Tierställen, und hier insbesondere die Bedeutung der Endotoxine, genauer zu charakterisieren. Für die Untersuchungen wurden Ställe verschiedener Nutztierrichtungen ausgewählt, die repräsentativ die Belastung an luftgetragenen proinflammatorischen Stoffen in Tierställen aufzeigen sollen.

Zur Bestimmung des proinflammatorischen Potentials der Bioaerosolproben wurde ein sogenannter humaner Vollbluttest angewendet. Mit diesem Testsystem wird die Gesamtheit aller entzündungsauslösenden Strukturen anhand der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus humanem Vollblut erfasst, und er orientiert sich am Entzündungsgeschehen der belasteten Spezies. In den vorliegenden Untersuchungen sollte ebenfalls zwischen endotoxinbedingter – und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität der Bioaerosolproben durch Zusatz von spezifischen Endotoxininhibitoren differenziert werden. Dadurch ist eine Aussage darüber möglich, welchen Anteil die Endotoxine an der gesamtproinflammatorischen Aktivität der Bioaerosole besitzen.

Zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in den Bioaerosolproben wurde der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test eingesetzt, der ausschließlich Endotoxine gramnegativer Bakterien erfasst. Da diese aber die potenteste Substanzgruppe hinsichtlich einer Entzündungsauslösung im Atemtrakt darstellen, sollte ein Vergleich beider Testsysteme (Vollbluttest und LAL-Test) Informationen darüber geben, inwieweit der LAL-Test zur Beschreibung des gesamtproinflammatorischen Potentials von Bioaerosolproben aus Tierställen genutzt werden kann.

Anhand der Messung von zwei verschiedenen Staubfraktionen (einatembare Staubfraktion, PM10-Staubfraktion) sollte außerdem die Verteilung entzündungsauslösender Aktivitäten in Abhängigkeit vom aerodynamischen Durchmesser der Staubpartikel untersucht werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Allgemeine Definitionen

Einführend werden grundlegende Definitionen zur Staubproblematik gegeben, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden. Hierbei ist vor allem auf Definitionen der Deutschen Forschungs-Gemeinschaft (DFG) und des Vereins Deutscher Ingenieure (VDI) zurückgegriffen worden.

Aerosole sind mehrphasige Systeme von Gasen, insbesondere Luft und darin dispers verteilten partikelförmigen Feststoffen oder Flüssigkeiten (Anonym, 2005).

Stäube sind disperse Verteilungen fester Stoffe in Gasen, insbesondere Luft, entstanden durch mechanische Prozesse oder durch Aufwirbelung (Anonym, 2005).

Schwebstaub (total suspended particulates, TSP) bezeichnet die Aerosolkomponente der in der Luft vorhandenen Partikel bis zu einem oberen aerodynamischen Durchmesser von rund 30 μm (Anonym, 2003).

PM10 (Thorakaler Schwebstaub, thoracic particulates) umfasst Partikeln, die einen in der ISO 7708 definierten gröbselektierenden Lufteinlass passieren, der für einen aerodynamischen Durchmesser von 10 μm eine Abscheidewirksamkeit von 50% aufweist. (Anonym, 2003).

PM2.5 (Alveolengängiger Schwebstaub, respirable particulates) sind Partikel, die einen in der ISO 7708 definierten gröbselektierenden Lufteinlass passieren, der für einen aerodynamischen Durchmesser von 2,5 μm eine Abscheidewirksamkeit von 50% aufweist (Anonym, 2003).

Ultrafeine Partikel sind Teilchen mit einem thermodynamischen Durchmesser kleiner 0,1 μm . (Anonym, 2003).

Aerodynamischer Durchmesser (d_{ae}):

Der aerodynamische Durchmesser ist die bestimmende Größe für Partikeln $> 0,5 \mu\text{m}$. Er beschreibt den Durchmesser einer Kugel mit der Dichte 1 (1 g/cm^3), welche die gleiche Sinkgeschwindigkeit in ruhender oder laminar strömender Luft besitzt (Anonym, 2005).

Diffusions-Äquivalentdurchmesser (d_D):

Der Diffusions-Äquivalentdurchmesser bestimmt die Ablagerung im Atemtrakt bei isometrischen Partikeln mit Durchmessern $< 0,5 \mu\text{m}$. Er entspricht dem Durchmesser einer Kugel, die im gleichen Dispersionsmittel (am Arbeitsplatz Luft) denselben Diffusionskoeffizienten wie die untersuchte Partikel hat (Anonym, 2005).

Einatembare Staubfraktion:

Die einatembare Fraktion umfasst den Massenanteil aller Schwebstoffe, der durch Mund und Nase eingeatmet wird (Anonym, 2003). Maßgeblich sind dabei die Ansauggeschwindigkeit im Mund- und Nasenbereich sowie die Umströmungsbedingungen des Kopfes. Während kleinere Partikel ($d_{ae} < 5 \mu\text{m}$) nahezu vollständig eingeatmet werden, nimmt die Inhalierbarkeit zu größeren Partikeln hin ab (Anonym, 2005).

Alveolengängige Staubfraktion:

Hierunter wird der Aerosolanteil verstanden, der bis in die nicht mit Zilien versehenen Bereiche, d.h. die Alveolen, zilienfreie Bronchiolen und *Ductus alveolares*, der Atemwege vordringen kann, wobei eine Teilmenge dort deponiert wird. Hier findet keine mukoziliare Reinigung statt. Diese Teilmenge kann über das Interstitium (Lungenzweischengewebe) in das Lymphsystem und besonders bei ultrafeinen Partikeln auch in die Blutkapillaren übertreten (Anonym, 2005).

Bioaerosole:

Bioaerosole sind komplexe luftgetragene Partikel biologischer Herkunft oder Aktivität (Anonym, 2004^a). Bioaerosole im Sinne dieser Richtlinie (VDI 4252 Blatt 3, DIN EN 13098) sind alle im Luftraum befindlichen Ansammlungen von Partikeln, denen Pilze (Sporen, Konidien, Hyphenbruchstücke), Bakterien, Viren und / oder Pollen sowie deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte (z.B. Endotoxine, Mykotoxine) anhaften bzw. diese beinhalten oder bilden. Hierzu zählen auch beliebige Stäube, die mit biogenen Substanzen wie Enzymen, Proteinen und Toxinen behaftet sind (Linsel, 2001). Die Partikelgrößen können einen aerodynamischen Durchmesser zwischen 0,5 - 100 µm aufweisen (Hirst, 1995).

Um bei der Messung der Staubfraktionen die für die pathogenen Wirkungen relevanten Partikel erfassen zu können, müssen Probenahmegeräte eine Abscheidung der luftgetragenen Partikel in Abhängigkeit vom aerodynamischen Durchmesser gewährleisten. Die Abscheidung muss dabei außerdem der bei der Atmung auftretenden Ablagerung von Partikeln im Respirationstrakt entsprechen.

Anhand experimentell ermittelter Abscheidekurven für luftgetragene Partikel im menschlichen Respirationstrakt können fünf verschiedene Fraktionen unterschieden werden: Die einatembare Fraktion (früher als Gesamtstaub bezeichnet), die thoraxgängige Fraktion, die alveolengängige Fraktion, die extrathorakale Fraktion, welche sich aus der Differenz zwischen einatembarer und thoraxgängiger Fraktion ergibt, sowie die tracheobronchiale Fraktion. Letztere ist die Differenz zwischen thoraxgängiger und alveolärer Fraktion (Anonym, 2005).

Messgeräte, die den einatembaren Staubanteil des Aerosols erfassen, müssen demnach eine Abscheidung der Partikel gewährleisten, die der Abscheidekurve für die einatembare Fraktion des luftgetragenen Staubs folgt. Entsprechendes gilt dann für den alveolengängigen Staubanteil (früher als Feinstaub bezeichnet).

In den Abbildungen 1 - 3 sind die Aerosolanteile im Atembereich dargestellt, weiterhin wird in Abhängigkeit vom aerodynamischen Durchmesser der Partikel der Abscheidegrad bzw. die Atemwegsgängigkeit definiert, und es werden vergleichsweise typische Größenbereiche von wichtigen Bioaerosolbestandteilen angegeben.

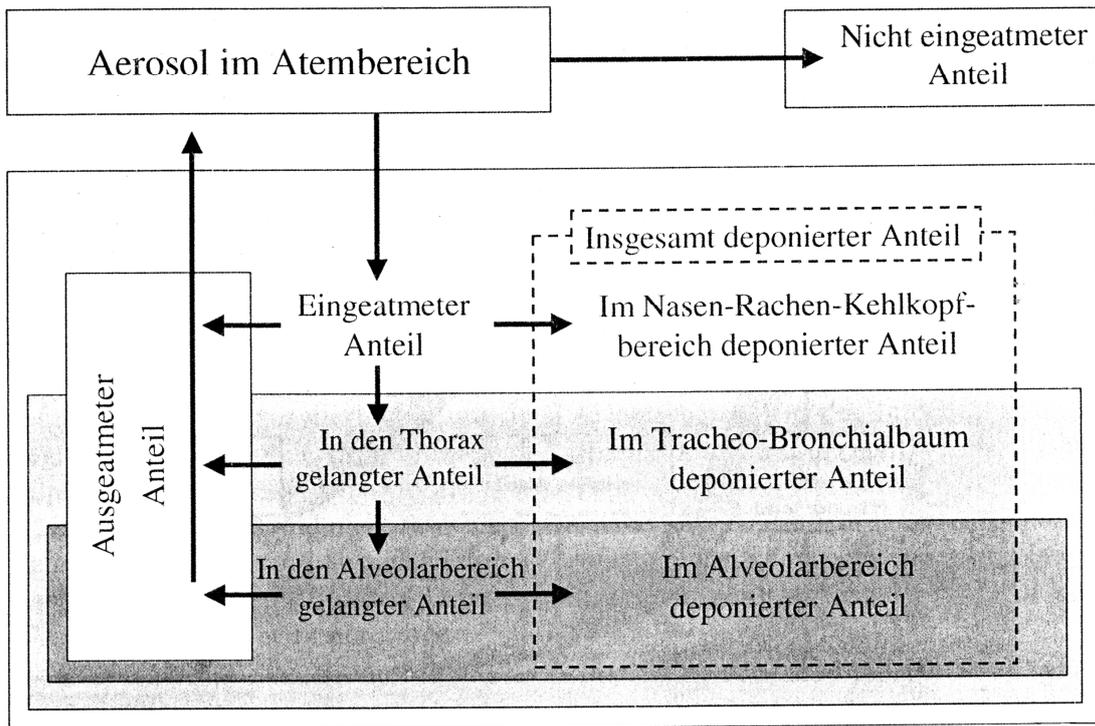


Abb. 1: Unterteilung des gesamten Aerosols im Atembereich nach arbeitsmedizinischen Kriterien und deren Deposition, nach MAK- und BAT-Werte-Liste 2005

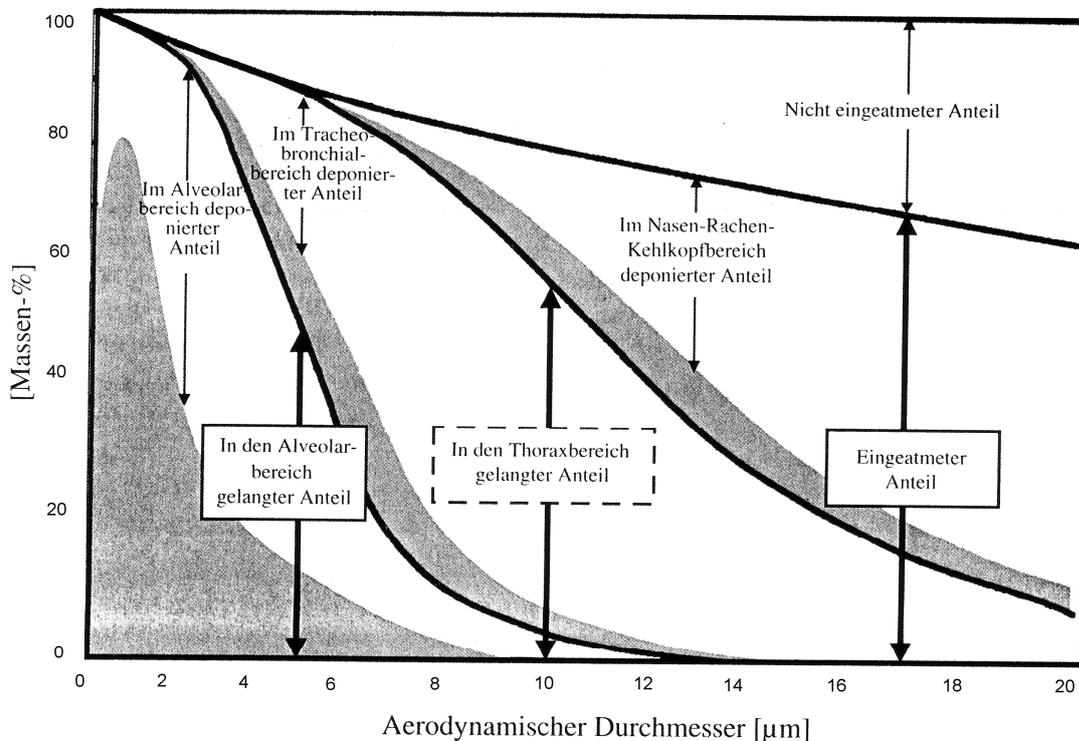


Abb. 2: Schematische Darstellung der arbeitsmedizinisch-toxikologisch relevanten Aerosolanteile in den Atmungsorganen. Neben den in den verschiedenen Bereichen deponierten Anteile sind die von dort jeweils ausgeatmeten Anteile getönt dargestellt. Nach MAK- und BAT-Werte-Liste 2005, modifiziert.

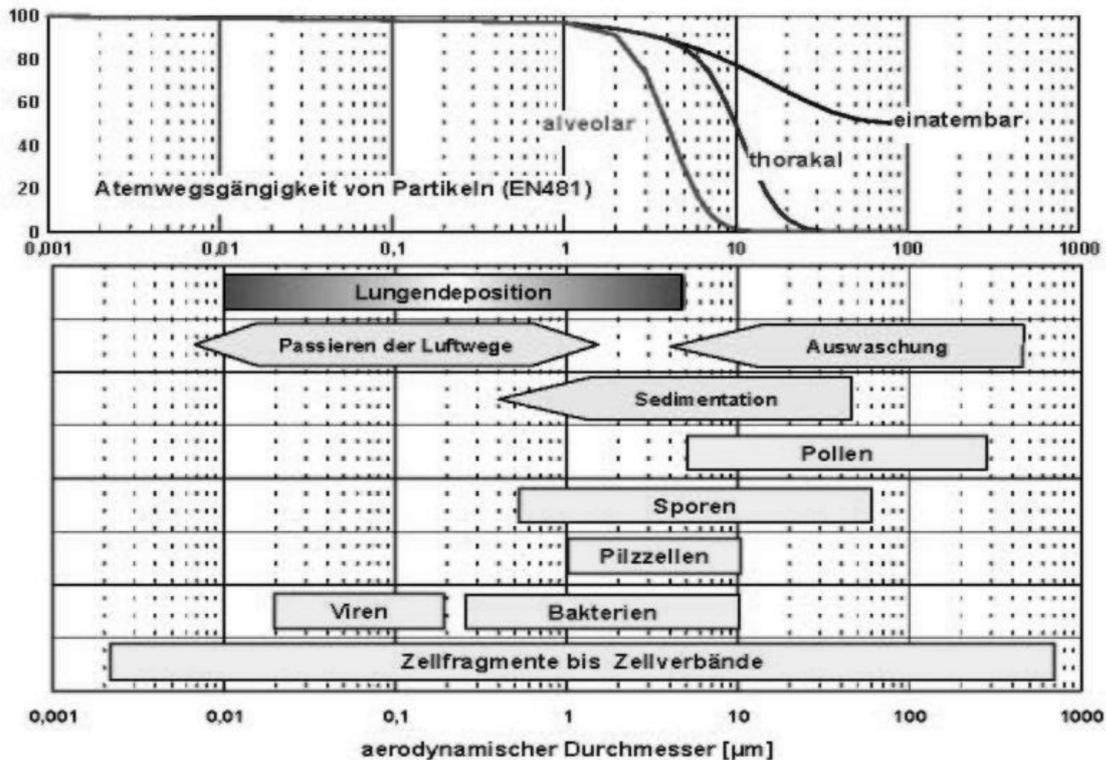


Abb. 3: Schematische Gegenüberstellung der Atemwegsgängigkeit von unterschiedlich großen Partikeln und den typischen Größenbereichen wichtiger Bioaerosolbestandteile, nach Linsel, 2001; verändert von Hoppenheidt, 2002.

2.2 Allgemeine gesundheitliche Wirkungen von Aerosolen

Aerosole haben eine direkte Einwirkung auf die äußere Haut und die zugänglichen Schleimhäute, auf das bronchopulmonale System und auf den Gastrointestinaltrakt. Aus medizinischer Sicht ist dabei die Einwirkung auf den Atemtrakt am bedeutendsten (Mehlhorn, 1979; Stetzenbach, 1997). Hierbei stehen vor allem tumorerzeugende, fibroseerzeugende, allergisierende, chemisch-irritative oder chemisch-toxische Wirkungen und Überladungseffekte im Vordergrund (Anonym, 2005). In der Tierhaltung stellen die Atemwegsinfektionen, insbesondere infektiöse respiratorische Faktorenkrankheiten, die wichtigsten durch Aerosole hervorgerufenen Erkrankungen dar, beim Stallpersonal überwiegen dagegen verschiedene obstruktive Atemwegserkrankungen. Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass lösliche und ultrafeine Partikel außerdem die Zellwände von Bronchien und Alveolen durchdringen, in die Blutbahn gelangen und dadurch systemische Wirkung entfalten. Die von diesen Partikeln möglicherweise ausgelösten Auswirkungen auf die Gesundheit beschränken sich deshalb nicht auf Atemwegserkrankungen; auch das Herz-Kreislauf-System kann betroffen sein (Seaton et al., 1995; Zanobetti et al., 2000; Kappos et al., 2003; Anonym, 2005).

Die pathophysiologische Wirkung eingeatmeter Aerosole hängt vor allem von drei Faktoren ab, die im Weiteren näher beschrieben werden:

1. Aufnahme, Transport und Ablagerung der Aerosolbestandteile im Respirationstrakt
2. Individuelle Disposition des belasteten Organismus
3. Zusammensetzung des Aerosols

2.2.1 Aufnahme, Transport und Ablagerung von Aerosolen in den Atmungsorganen

Transport und Ablagerung von Partikeln im Atemtrakt hängen von der Größe, der Form und der Dichte / Konzentration der Partikeln ab. Ebenso entscheiden Parameter wie chemische Oberflächeneigenschaften, Bioverfügbarkeit organischer Partikelkomponenten für die Interaktion mit Zellstrukturen und Wasser- oder Lipidlöslichkeit über die Eliminierung oder schädliche Retention im Organismus. Während kleinere Partikel ($d_{ae} < 5 \mu\text{m}$) nahezu vollständig eingeatmet werden, nimmt die Inhalierbarkeit zu größeren Partikeln hin ab. Aus dem eingeatmeten Anteil werden die größeren Partikeln ($d_{ae} > 15 \mu\text{m}$) nahezu ausschließlich extrathorakal, d.h. im Bereich von Nase, Rachen und Kehlkopf abgelagert. Kleinere Teilchen werden zum Teil im Tracheo-Bronchialbaum oder bei feinen bis ultrafeinen Partikeln im Alveolarraum abgelagert. Das deponierte Material kann dann als ein kontinuierlicher Stimulus für die Entzündungsreaktion agieren (Wang et al., 1997). Die Ablagerung kann sowohl bei der Ein- als auch bei der Ausatmung erfolgen. Ein Teil der eingeatmeten Partikel wird im Atemtrakt nicht deponiert und somit wieder ausgeatmet (= ausgeatmeter Anteil, siehe Abbildung 1 und 2) (Anonym, 2005).

Die wichtigsten Depositionsmechanismen im Atemtrakt sind Impaktion, Sedimentation und Diffusion. Letztere ist für Partikel bis $0,1 \mu\text{m}$ entscheidend. Diffuse Abscheidung spielt daher vor allem in kleinräumigen geometrischen Strukturen, wie sie im Alveolarbereich vorliegen, eine Rolle (Schulz, 2003). Bedeutend ist hierbei die Translokationsfähigkeit von Partikeln, die unter Umgehung der klassischen Clearance auf unterschiedliche Arten inkorporiert werden (Oberdorster et Utell, 2002). Bei diesen isometrischen Partikeln mit Durchmessern $< 0,5 \mu\text{m}$ bestimmt der Diffusions-Äquivalentdurchmesser (d_D) den Ort der Ablagerung im Atemtrakt.

Trotz ihrer geringen Masse unterliegen Partikel der Schwerkraft und sedimentieren in den Atemwegen. Aufgrund ihrer Massenträgheit können Partikel plötzlichen Änderungen der Strömungsrichtung in den Atemwegen zum Teil nicht folgen und impaktieren z.B. an der Bronchialwand (vor allem Partikel $< 2 \mu\text{m}$). Teilchen $> 2 \mu\text{m}$ werden durch Impaktion und Sedimentation vor allem extrapulmonal, d.h. in der Nase, abgeschieden (Schulz, 2003).

Lösliche Anteile der deponierten feinen bis ultrafeinen Partikeln werden resorbiert, d.h. die Partikelbestandteile werden nach deren Auflösung lokal in Zellen wirksam oder gelangen in den Blutkreislauf bzw. das Lymphsystem und können dann auch systemisch wirken.

Nicht lösliche Anteile können von Makrophagen aufgenommen (phagozytiert) werden bzw. von Epithelzellen oder aus dem Alveolarbereich in das Interstitium penetrieren. Die nicht löslichen oder nicht resorbierbaren Anteile können auch mit Hilfe des mukoziliaren Reinigungsmechanismus aus dem Tracheo-Bronchial- ebenso wie aus den Nasen-Rachen-Kehlkopf-Bereich durch Abschlucken in den Verdauungstrakt gelangen und gegebenenfalls dort wirksam werden (Kreyling, 2001; Anonym, 2005). Laut Oberdorster et al. (2004) sind ultrafeine Partikel im gesamten Körper von Labortieren nachweisbar.

2.2.2 Individuelle Disposition des belasteten Organismus

Die individuelle Disposition wird bestimmt durch das Zusammenspiel von Dosis und Dauer der Exposition, anderen Umwelteinflüssen, die additive oder synergistische Effekte bewirken können, und der genetischen Prädisposition des belasteten Organismus (Vandenbulcke et al., 2006). Letztere geht beispielsweise mit Variationen in Art und Ausmaß der inflammatorischen Reaktion der Lunge auf inhalierte Partikel einher.

Ebenso spielen individuelle Unterschiede in der Anatomie der Atemwege, das Atemmuster und auch krankhafte Veränderungen der Atmungsorgane, wie z.B. obstruktive Atemwegserkrankungen oder katarrhalische Infekte, für die Disposition des Organismus eine große

Rolle (Anonym, 2005). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Exposition gegenüber biologischen Aerosolen zu einer Verschlechterung der Atemfunktion insbesondere bei Asthmatikern führt (Michel et al., 1992). Michel et al. (1989; 1991) beschreiben, dass asthmatische Personen, die einer hohen Endotoxin-Exposition ausgesetzt sind, signifikant mehr Atembeschwerden zeigen als die anderen Versuchsgruppen. Laut einer Studie von Valcin et al. (2007) wiesen 25% der dort untersuchten, in der Landwirtschaft arbeitenden, nicht rauchenden Frauen mit chronischer Bronchitis auch eine asthmatische Vorgeschichte auf. Bei gesunden Personen hat eine akute Endotoxin-Inhalation wahrscheinlich keine Effekte auf die Lungenfunktion und die bronchiale Aktivität. Eingeatmetes Lipopolysaccharid scheint mehr Aktivität bei Personen mit bereits bestehenden entzündlichen bronchialen Erkrankungen zu haben (Michel et al., 1989). Laut Bergmann und Müsken (1994) führt inhaliertes Endotoxin in Abhängigkeit von der Dosis und der bronchialen Hyperreaktivität des einzelnen zu einer vorübergehenden Bronchokonstriktion.

2.2.3 Zusammensetzung des Aerosols

Aerosole sind physikalisch-chemisch komplexe Gemische aus festen und / oder flüssigen Schwebeteilchen und Luft. In seltenen Fällen dienen auch andere Gase als Träger. Ein Aerosol ist ein dynamisches System und unterliegt ständigen Änderungen durch Kondensation von Dämpfen an bereits vorhandenen Partikeln, Verdampfen flüssiger Bestandteile der Partikel, Koagulation von kleinen zu großen Teilchen oder Abscheidung von Teilchen an umgebenden Gegenständen. Aerosole bestehen sowohl aus primär emittierten wie aus sekundär gebildeten Komponenten natürlichen und anthropogenen Ursprungs (z.B. Ruß, geologisches Material, Abriebspartikel, biologisches Material) und sind in seiner Zusammensetzung sehr vielfältig (z.B. Schwermetalle, Sulfat, Nitrat, Ammonium, organische Kohlenstoffverbindungen, Silicate, Wasser) (Kappos et al., 2003).

Die Zusammensetzung eines Aerosols ist sehr stark abhängig von seinen potentiellen Quellen und daher sehr unterschiedlich. In der Landwirtschaft spielen dabei Bioaerosole eine entscheidende Rolle, auf die in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen wird.

2.3 Bioaerosole

Bioaerosole stellen ein komplexes Gemisch verschiedenster Stoffe organischer Herkunft dar, die bei Menschen und Tieren gesundheitliche Beeinträchtigungen vor allem aufgrund ihrer infektiösen, allergie- und entzündungsauslösenden Potenz hervorrufen (Zucker et al., 2004). Nach ihrer Herkunft lassen sich pflanzliche, tierische und mikrobielle Bioaerosolbestandteile unterscheiden (Hoppenheidt, 2002). Nach Hirst (1995) müssen die Partikel biologischen Ursprungs sein, wobei sie entweder einzeln lebensfähig sein können (z.B. Pilzsporen, Bakterien) oder tote biologische Materie (z.B. abgestorbene Zellen, Bruchstücke von Biomaterie) oder Ausscheidungen von Lebewesen sein können. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die komplexe Zusammensetzung von Bioaerosolen wieder. Bedingt durch die Vielfalt an Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen weisen Luftproben aus verschiedenen Umweltbereichen große qualitative Unterschiede hinsichtlich der Bioaerosolzusammensetzung auf (Heederik et al., 2000). Zudem erschweren starke räumliche und zeitliche Konzentrationsschwankungen eine analytische Erfassung von Bioaerosolbestandteilen und der Gesamtheit biogener Luftbestandteile (Hoppenheidt, 2002).

Bestandteile von Pflanzen		Bestandteile von Tieren	
- pflanzliche Zellverbände (z.B. Pollen, Fasern)		- tierische Zellverbände (z.B. Hautschuppen, Haare)	
- Fragmente pflanzlicher Zellen		- Fragmente tierischer Zellen	
- Stoffwechselprodukte		- Stoffwechselprodukte	
Mikroorganismen und deren Bestandteile			
- Viren	- Bakterien	- Pilze (einzellig; Hyphen)	
	- Bakteriensporen	- Pilzsporen	
	- Bakterienzellfragmente (z.B. Endotoxine)	- Pilzzellfragmente (z.B. β -D-Glucane)	
	- Stoffwechselprodukte (z.B. Toxine)	- Stoffwechselprodukte (z.B. Mykotoxine)	

Abb. 4: komplexe Zusammensetzung von Bioaerosolen (Hoppenheidt, 2002, modifiziert)

Aufgrund physikalischer Gegebenheiten enthält Luft bevorzugt biologische Strukturen mit kleinen Partikeldurchmessern (Owen, 1992; Linsel, 2001). Für zahlreiche Bioaerosolbestandteile kann wegen ihrer geringen Größe grundsätzlich eine gute Atemwegsgängigkeit angenommen werden. Dabei ist jedoch zu beachten, dass Bioaerosolkomponenten miteinander und / oder mit abiotischen Luftbestandteilen größere Aggregate mit eingeschränkter Atemwegsgängigkeit bilden können (Hoppenheidt, 2002).

Kondensationsprozesse oder Austrocknung können die physikalischen und biologischen Eigenschaften wie Korngrößenverteilung und Virulenz beeinflussen. Relative Luftfeuchte, Temperatur, Gaszusammensetzung (O_2 , O_3 , N_2 , NO_2 , SO_2) und UV-Strahlung bestimmen wesentlich die Überlebensfähigkeit von Mikroorganismen im luftgetragenen Zustand und damit auch die Infektiosität eines Bioaerosols (Linsel, 2001).

Zahlreiche Gesundheitsbeeinträchtigungen werden im Zusammenhang mit biologischen Luftverunreinigungen diskutiert. Da Aerosole eine Vielzahl biotischer und abiotischer Inhaltstoffe aufweisen, die sich in ihrem Wirkungspotential beeinflussen können, lassen sich Gesundheitsbeeinträchtigungen nicht immer auf einen Einzelfaktor zurückführen (Fogelmark et al., 2001; Hoppenheidt, 2002). Die entzündliche Wirkung von organischen Stäuben dürfte somit auch das Ergebnis verschiedener Einzelreize sein, die sich durch additive bzw. synergistische Wechselwirkungen gegenseitig beeinflussen können (Fogelmark et al., 2001). Im Gegensatz zu Stäuben und Fasern, deren Pathogenität durch ihre Form, Oberflächenchemie und Biopersistenz bestimmt wird, kommen Bioaerosolbestandteile mitunter erst in gelöster Form zur Wirkung, wie beispielsweise beim Organic Dust Toxic Syndrome (ODTS), welches durch die systemische Wirkung von Endotoxinen ausgelöst wird.

2.3.1 Krankheitsbilder durch Bioaerosolbelastungen

Bioaerosole können grundsätzlich Infektionen, Allergien und toxische Wirkungen beim Menschen auslösen (Linsel, 2001), aber auch die aufgestellten Tiere sind häufig von Atemwegsinfektionen betroffen, vor allem in der intensiven Nutztierhaltung. In der Literatur werden Erkrankungen durch Bioaerosolbelastungen vor allem beim Menschen beschrieben. Atemwegssymptome und Lungenfunktionsbeeinträchtigungen sind hierbei die wohl häufigsten an organischen Staub assoziierten Gesundheitseffekte. Sie können von akut mild bis schwer chronisch reichen und werden verursacht durch die spezifische Exposition

gegenüber Toxinen, proinflammatorischen Agentien oder Allergenen. Basierend auf den zugrunde liegenden Entzündungsmechanismen und den später auftretenden Symptomen kann zwischen allergischen und nicht-allergischen Atemwegserkrankungen unterschieden werden.

Eine Studie von Linaker und Smedley (2002) beschreibt die wichtigsten Atemwegserkrankungen bei Landwirten und fasst die gegenwärtige Literatur über Epidemiologie und Prävention zusammen. Die Ergebnisse einer europäischen Landwirtschaftsstudie (Radon et al., 2003) ergaben, dass bei den Berufskrankheiten des Landwirtes insbesondere das Asthma bronchiale, die chronische Bronchitis mit oder ohne Obstruktion, die exogen-allergische Alveolitis als Form der Allergie sowie das Organic Dust Toxic Syndrome im Vordergrund stehen. Daten zur Prävalenz von Atemwegserkrankungen bei Arbeitern in der Nutztierhaltung wurden bisher in zahlreichen Einzelstudien in verschiedenen Ländern erhoben. Viele Studien wurden aber nur an einer spezifischen Gruppe von Landwirten in der Tierproduktion erhoben, die meisten hiervon bei Schweinezüchtern. Aufgrund unterschiedlicher Methoden ist es kaum möglich, die Prävalenzen von Atemwegserkrankungen für Landwirte in Tierställen mit unterschiedlichen Nutztierarten zwischen den Studien zu vergleichen (Radon et Nowak, 2003).

Im Folgenden werden die wichtigsten Charakteristika der Erkrankungen durch Bioaerosolbelastungen bei Landwirten und aufgestellten Tieren genauer beschrieben.

2.3.1.1 Allergien

Bedeutende Formen der Allergie bei Arbeitern in der Landwirtschaft sind das allergische Asthma (siehe Kapitel 2.3.1.2), die allergische Rhinitis, die hypersensitive Pneumonitis bzw. exogen-allergische Alveolitis (EAA) und die Farmerlunge (Douwes et al., 2002). Letztere wird zum Formenkreis der EAA gezählt und wird durch eine Immunreaktion gegenüber thermophilen Actinomyceten und Schimmelpilzen (*Aspergillus spp.*) verursacht (Kentner et Hofmann, 1986). Die EAA ist durch eine lymphozytäre interstitielle Pneumonitis charakterisiert und wird deshalb auch als hypersensitive Pneumonitis bezeichnet. Ob Co-Faktoren wie z.B. Endotoxine oder β -1,3-D-Glucane zur Auslösung der Erkrankung benötigt werden, wird noch diskutiert (Schenker, 1998). Die EAA kann man in eine akute Form und eine subakute Form unterteilen. Die akute EAA tritt einige Stunden nach Exposition auf und ist gekennzeichnet durch Kurzatmigkeit, Husten, Fieber und Schüttelfrost. Die Symptome klingen nach einigen Tagen ab. Die subakute Form der EAA zeigt sich durch Atemnot über Wochen bis Monate, wiederkehrenden akuten Attacken und chronisch produktiven Husten (Linaker et Smedley, 2002). Die allergische Rhinitis ist eine IgE-vermittelte Entzündung der Nasenschleimhaut infolge Allergenexposition. Sie ist eine der häufigsten allergischen Erkrankungen beim Menschen und geht oft mit Begleiterscheinungen, wie z.B. Asthma oder Sinusitis, einher. Nach Vorschlag der WHO kann diese Erkrankung in eine intermittierende und persistierende allergische Rhinitis unterteilt werden, wobei als persistierend eine Dauer der Symptomatik länger als vier Tage pro Woche und mehr als vier Wochen gilt. Die Ursachen der allergischen Rhinitis sind multifaktoriell. Eine milbenbedingte Rhinitis führt vor allem zur Obstruktion (verstopfte Nase), eine pollenbedingte Rhinitis ist zusätzlich durch Niesen, Juckreiz und Sekretion gekennzeichnet. Die Ergebnisse einer europäischen Landwirtschaftsstudie zeigten, dass Landwirte in der Tierproduktion eine geringere Prävalenz an allergischer Rhinitis und atopischen Asthma angaben als die Allgemeinbevölkerung (Radon et al., 2003), was mit den Erkenntnissen zahlreicher anderer Studien hinsichtlich des geringeren Risikos für die Entwicklung von Allergien bei Kindern, die

in ländlichen Gegenden aufwachsen, übereinstimmt (Braun-Fahrlander, 2000; von Mutius et al., 2000).

2.3.1.2 Asthma bronchiale

Als Asthma bronchiale wird eine reversible, anfallsweise Atemnot mit Atemwegsobstruktion bezeichnet. Pathogenetisch liegt hier ein hyperreaktives Bronchialsystem mit eosinophiler Entzündungsreaktion der Bronchien vor. Ursache können allergisches Asthma, nicht-allergisches Asthma oder auch Mischformen dieser beiden sein (= am häufigsten). Beim allergischen Asthma bronchiale führt eine Allergie vom Soforttyp (Typ I - Reaktion) zum Asthma-Anfall; das Allergen (z.B. Pollen, Staub, Tierhaare, Schimmelpilzsporen) wird am IgE-Rezeptor der Alveolar-Mastzelle gebunden und führt zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin (Buhl et al., 2006). Das nicht-allergische Asthma kann als Infektasthma oder chemisch-physikalisch irritatives Asthma vorkommen.

Die asthmatischen Erkrankungen bei Landwirten sind in vielen Fällen nicht IgE-vermittelt, sondern durch die Exposition gegenüber Irritantien wie z.B. Ammoniak, Getreidestaub und Endotoxine verursacht. Dieses als „Asthma-like Syndrome“ bezeichnete Krankheitsbild ist ein akutes, selbstlimitierendes Ereignis ohne bleibende Atemwegshyperreagibilität. Eine Studie von Donham et al. (2000) deutet an, dass eine dosis-abhängige Beziehung zwischen Symptomen und Staub, Ammoniak und Endotoxinen bestehe. Die Auswertung einer europäischen Landwirtschaftsstudie von Radon et al. (2002) zeigte, dass Landwirte in der Schweinehaltung das höchste Risiko für ein „Asthma-like Syndrome“ tragen. Ein neu erworbenes allergisches Asthma bei Landwirten kann hingegen durch Exposition gegenüber Vorratsmilben in Heu-, Stroh- und Getreidestaub, Exkrementen oder Tierepithelien verursacht sein und ist im Gegensatz zum „Asthma-like Syndrome“ mit einer IgE-Bildung und bleibenden Atemwegshyperreagibilität verbunden. Symptomatisch berichten die Betroffenen in beiden Fällen über giemende Atemgeräusche, Engegefühl in der Brust, trockenen Husten und / oder Kurzatmigkeit während der Arbeit.

Beim Pferd kann die Dämpfigkeit als durch organischen Staub induziertes Asthma mit dem des Menschen verglichen werden. Hier führen vor allem inhaliertes Endotoxin und Staubpartikel zur Atemwegsentzündung und -obstruktion (Pirie et al., 2003).

2.3.1.3 Chronische Bronchitis

Als chronische Bronchitis wird laut WHO eine Lungenerkrankung bezeichnet, die mindestens zwei Jahre hintereinander über mindestens drei Monate im Jahr durch Husten und Auswurf gekennzeichnet ist (Radon et Nowak, 2002). Die Erkrankung wird in drei Schweregrade unterteilt: die einfache chronische Bronchitis, gekennzeichnet durch schleimig weißen Auswurf ohne bronchiale Obstruktion; weiterhin die chronisch obstruktive Bronchitis mit Auswurf bei Obstruktion durch zähes Sputum (Dyskrie) und Schleimhautschwellung; und das obstruktive Emphysem (Chronic obstructive pulmonary disease; COPD), das wie die chronisch obstruktive Bronchitis, aber zusätzlich mit vergrößertem Residualvolumen und verminderter Gasaustauschfläche einhergeht (Konietzko, 1995). Eine Abgrenzung zwischen den Schweregraden gelingt am zuverlässigsten mit Hilfe der Lungenfunktionsdiagnostik.

All diesen Lungenerkrankungen ist gemeinsam, dass Lungengewebe in funktionsloses Bindegewebe umgebaut wird und nicht wieder gewonnen werden kann. Das verkürzt die Lebenserwartung. Die einzelnen Krankheitsformen können sich vermischen, sie müssen konsequent diagnostiziert und behandelt werden.

Die Ursachen für die chronische Bronchitis in der Landwirtschaft sind multifaktoriell, vor allem die tägliche Aufenthaltsdauer in Tierställen sowie anamnestisch das ODTs sind die wichtigsten Prädiktoren (Nieuwenhuijsen, 1996; Radon et al., 2003). Eine dauerhafte Exposition mit organischen und anorganischen Stäuben kann eine Irritation und Entzündung der Atemwege verursachen. Auch ein wiederholtes Auftreten einer akuten Bronchitis kann zu einer chronischen Bronchitis führen. Gekennzeichnet ist die Erkrankung durch Husten mit schleimig-weißem Auswurf, der nach und nach die kleinen Atemwege (Bronchioli) verlegt, die Ausatmung erschwert und Husten provoziert. Außerdem ist die Anfälligkeit zu bakteriellen Infektionen (mit Fieber und eitrigem Auswurf) stark erhöht.

Schließlich ist auch eine erhöhte Prävalenz von chronischer Bronchitis respektive einer eingeschränkten Lungenfunktion vor allem bei Getreidestaubexposition sowie bei Arbeitnehmern in der Schweine- (Donham, 1990; Iversen et al., 1990) und Geflügelzucht (Danuser et al., 1988) beschrieben worden.

In der Veterinärmedizin wird beim Pferd eine durch organischen Staub induzierte wiederkehrende Atemwegsobstruktion beschrieben, die histologische und pathophysiologische Ähnlichkeiten zur COPD des Menschen zeigt und deshalb auch als Modell für die humane COPD genutzt wird (Theegarten et al., 2008). Sowohl beim Pferd als auch beim Menschen ist diese Erkrankung häufig mit einer *Chlamydomphila spp.* – Infektion assoziiert.

2.3.1.4 Organic Dust Toxic Syndrome

Das Organic Dust Toxic Syndrom (ODTS), das häufig auch als toxische Pneumonitis bezeichnet wird (früher pulmonale Mykotoxikose (Emanuel et al., 1975) bzw. Siloentladesyndrom (Pratt et May, 1984)), ist eine akut entzündliche, nicht-allergische Reaktion der Atemwege und der Alveolen auf eine hohe Exposition mit organischen Stäuben. Hierbei müssen sehr hohe Konzentrationen von Schimmelpilzen und auch von Bakterien und Endotoxinen vorliegen, wobei vermutlich die Endotoxine maßgeblich bei der Entstehung des Krankheitsbildes sind (Rylander, 1997; Schenker, 1998). Rylander (1997) impliziert, dass erst ab einer Luftkonzentration an Endotoxin von 200 ng/m³ das Risiko für ODTs erhöht ist. Bereits 4-6 h nach Staubeexposition treten grippeähnliche Symptome auf (Fieber, Schüttelfrost, Muskel- und Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, Husten, Engegefühl in der Brust und Kurzatmigkeit). Typische Auslösesituationen sind das Ausmisten von Tierställen und die Arbeit mit schimmeligem Getreide (von Essen et al., 1990). Eine ausführliche Beschreibung des Krankheitsbildes findet sich bei Rask-Andersen (1989), welcher 80 Fälle von ODTs untersuchte, wobei im Allgemeinen die oben beschriebenen Symptome nur kurz andauerten und bei der Untersuchung der Arbeiter das Thoraxröntgenbild durchweg unauffällig und die Lungenfunktion normal war.

Nach Ansicht der Autoren ist bezüglich der Behandlung die Differentialdiagnose zwischen ODTs und der EAA (Farmerlunge) wichtig, da eine Unterscheidung der beiden Krankheitsbilder im Einzelfall schwierig sein kann (Weber et al., 1990). Vor allem der kurze Verlauf der Beschwerden, die unbeeinträchtigte Lungenfunktion und das Fehlen von Spätfolgen unterscheiden das ODTs von der EAA (Rask-Andersen, 1989).

Vom ODTs betroffene Patienten zeigten bei wiederholter Exposition ein sogenanntes Adaptationsphänomen. Dieses Phänomen einer Toleranz gegenüber sich regelmäßig wiederholenden Endotoxinbelastungen ist auch bei Haustieren beschrieben worden. So zeigten Schafe nach mehrmaliger Exposition mit endotoxinhaltigen organischen Stäuben keine Fieberreaktion mehr (Purdy et al., 2002).

2.4 Proinflammatorische Agentien in Bioaerosolen

Eingeatmete bakterielle und virale Pathogene, organischer Staub, Zellwandkomponenten grampositiver -, gramnegativer Bakterien und Pilze bzw. deren Sporen können infektiöse, allergische und / oder immunostimulatorische Effekte auslösen (Nowak, 1998; Schwartz, 2002). Hierbei sind vor allem Muraminsäuren von Bakterien, Endotoxine gramnegativer Bakterien, Lipoteichonsäuren und Peptidoglycane grampositiver Bakterien, Mykotoxine und β -(1,3)-D-Glucane aus Schimmelpilzwänden als mikrobielle Bestandteile mit proinflammatorischen Eigenschaften von Bedeutung. Diese mikrobiellen Agentien sind potente Aktivatoren von Alveolarmakrophagen (Monton et Torres, 1998).

Bestandteile der Zellwand oder Zellmembran von grampositiven und gramnegativen Bakterien stimulieren die Freisetzung einer Vielzahl von Mediatoren, welche in die Rekrutierung von Entzündungszellen in den Atemwegen involviert sind (Larsson et al., 1999; Losa Garcia et al., 1999). Experimente von Becker et al. (2002), die das zytokin-induzierende Potential von grampositiven und gramnegativen Bakterien verglichen, ergaben, dass dreimal mehr grampositive Staphylokokken für eine komparative Zytokinreaktion benötigt werden als gramnegative Pseudomonaden. Untersuchungen zur Reaktivität von verschiedenen hitzeabgetöteten grampositiven (z.B. *Staphylococcus xylosum*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*) und gramnegativen Bakterien (z.B. *E.coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas spp.*) im Vollbluttest zeigten, dass letztere gegenüber den grampositiven Bakterien eine deutlich höhere Potenz zur Interleukininduktion aufwiesen (Zucker, 2003).

Insgesamt wird den Endotoxinen als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien die größte Bedeutung bei an organischen Staub assoziierten Erkrankungen beigemessen (Rylander, 1994). Sie stellen die qualitativ bedeutendste proinflammatorische Staubkomponente dar, d.h. sie weisen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration das höchste entzündungsauslösende Potential auf. Es liegen bisher aber noch keine systematischen Untersuchungen vor, die den quantitativen Anteil von Endotoxinen an der gesamtproinflammatorischen Potenz von Bioaerosolen aus Tierställen charakterisieren. Eine Untersuchung von Bioaerosolproben aus Tierställen im glucanspezifischen Glucattelltest ergab, dass Glucane in ähnlichen Konzentrationen wie Endotoxine in der Luft von Tierställen vorkommen, sie aber im humanen Vollbluttest eine deutlich geringere proinflammatorische Aktivität zeigen als die Endotoxine (Hinz et al., 2007). Dies weist darauf hin, dass der Beitrag von Glucanen zur gesamtproinflammatorischen Potenz von Bioaerosolen aus Tierställen deutlich geringer ist als der von Endotoxinen.

2.4.1 Aufbau der Zellwand von gramnegativen Bakterien

Bakterien stellen eine sehr heterogene Gruppe von Mikroorganismen dar. Während die Zellhülle grampositiver Bakterien nur von einer Zytoplasmamembran und daran anschließend von einer dicken nahezu strukturlosen Mureinschicht umgeben ist, besitzen gramnegative Keime eine trilamellare Struktur, bestehend aus einer Zytoplasmamembran, einer dünnen Mureinschicht und einer asymmetrischen äußeren Membran. Auf der Innenseite der äußeren Membran finden sich verschiedene Phospholipide und Proteine, während das äußere Blatt aus Lipopolysacchariden (LPS) und Proteinen zusammengesetzt ist (Rietschel et al., 1984; Nikaido et Vaara, 1985).

LPS lässt sich schematisch in drei unterschiedliche Regionen einteilen. Grundbaustein bildet das Lipid A, mit dem das LPS in der Membran verankert wird. Daran schließt sich die sogenannte Kernregion an, die in eine innere und eine äußere Region unterteilt werden kann

und 10 Zuckereinheiten umfasst. An dieses Grundgerüst ist die sogenannte O-spezifische Seitenkette, auch als O-Antigen bezeichnet, kovalent gebunden (Raetz et Whitfield, 2002; Miller et al., 2005). Diese äußere Membran gramnegativer Bakterien stellt ein bemerkenswert gut funktionierendes Abwehrsystem dar. Die Wirksamkeit vieler Antibiotika wird durch die Effizienz dieser Permeationsbarriere erheblich reduziert. Lediglich sehr kleine hydrophile Moleküle sind in der Lage, durch die wassergefüllten Kanäle der Porine in das Bakterium einzudringen (Nikaido et Vaara, 1985; Sukupolvi et Vaara, 1989).

Lipopolysaccharid (LPS mit dem Endotoxin) gramnegativer Bakterien

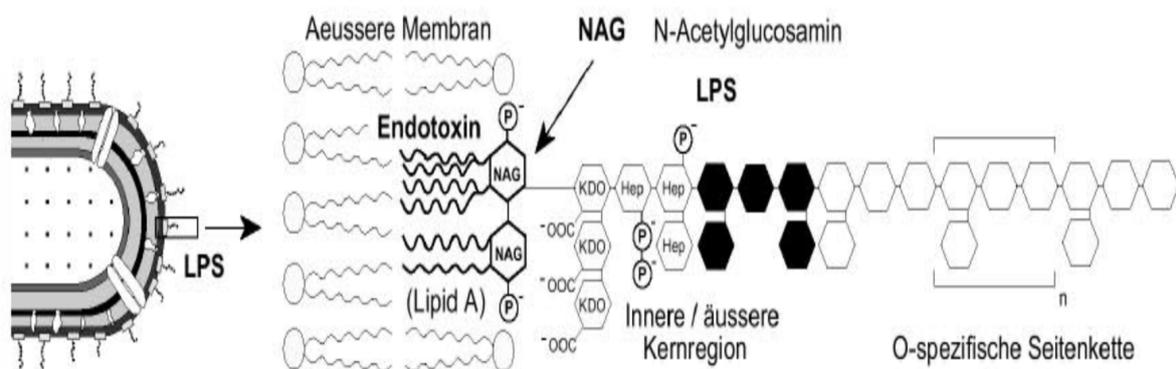


Abb. 5: Schematische Darstellung der Lipopolysaccharid-Struktur aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (Burkart, 2002)

2.4.2 Endotoxine

Bei der Zerstörung gramnegativer Keime, wie Enterobakterien und Pseudomonaden, wird ein thermostabiler Kohlenhydrat-Protein-Phospholipidkomplex freigesetzt, der neben Proteinen vor allem LPS aus der Zellwand dieser Bakterien enthält. Diese als Endotoxine bezeichneten Komplexe variieren bei den verschiedenen gramnegativen Bakterien in ihrer Kohlenhydratzusammensetzung (Bergmann et Müsken, 1994; Heederik et al., 2000).

Endotoxine sind ubiquitäre Kontaminanten von organischen Stäuben und sind wahrscheinlich das hauptverursachende Agens bei gesundheitlichen Problemen, die an eine Exposition mit organischen Staub assoziiert sind (Rylander, 1994).

Es handelt sich hierbei um Substanzen, welche die Freigabe von Entzündungsmediatoren aus Entzündungszellen im Gewebe auslösen (Michel et al., 1997). Ein gramnegatives Bakterium enthält etwa 2000 Lipopolysaccharidmoleküle mit dem für die Endotoxinwirkung verantwortlichen Lipid-A-Bestandteil (Hoppenheidt, 2002). Der Term „Endotoxin“ wird oft als Synonym für „LPS“ benutzt, um die biologischen Effekte dieses bakteriellen Produkts zu beschreiben. LPS ist verantwortlich für die meisten biologischen Merkmalscharakteristika von bakteriellen Endotoxinen (Morrison et Ryan, 1979; Rietschel et al., 1985). Diese Substanzen aktivieren Immunzellen der Lunge, vor allem Makrophagen, welche Zytokine wie TNF α und IL-1 β ausschütten und dadurch den Entzündungsprozeß einleiten und modulieren (Douwes et al., 2003). Weiterhin kann LPS das humorale Abwehrsystem wie das

Komplement- und Gerinnungssystem (inklusive Kininsystem) aktivieren (Morrison et Kline, 1977). Diese Komponenten der zellulären und humoralen Abwehr sind im bronchialen und Lungengewebe präsent und aktiv (Robertson et al., 1976).

LPS setzt sich aus einer speziesspezifischen Polysaccharidkettenregion und einer speziessübergreifend relativ konstanten Lipidregion zusammen (Linsel et Kummer, 1998). Die toxischen Eigenschaften sind durch das Lipid A bedingt, seine Aktivität wird allerdings durch den Polysaccharid-Anteil modifiziert.

Es wurde früher angenommen, dass alle LPS-Moleküle die gleichen biologischen Effekte haben. Diese Hypothese wurde aber durch verschiedene Studien modifiziert, welche eine große Varianz in der Kapazität von LPS verschiedener Bakterienspezies zeigten, Zytokine zu synthetisieren. Dieser Effekt steht in Beziehung zu strukturellen Gegebenheiten ihres Lipid-A-Teils (Schromm et al., 2000; Seydel et al., 2000). Diesbezüglich spielt der Typ der Disaccharidketten, Länge und Zahl der Acyl-Gruppen, die Asymmetrie ihrer Distribution und die Anwesenheit von Phosphatgruppen eine große Rolle bei der Interaktion von LPS und Toll-Like-Rezeptoren (Netea et al., 2002). Auch Helander et al. (1982) postulieren, dass Unterschiede in der akuten pulmonalen Toxizität von Endotoxinen in Beziehung zu dessen chemischer Konstitution (Fettsäuremuster) stehen könnten. Das wahrscheinlich potenteste Lipid-A ist das hexaacylierte Lipid-A von *E.coli* mit einem biphosphorylierten Diglucosamine-Gerüst (Mueller et al., 2004).

Gramnegative Bakterien sterben in der Luft durch Trocknungsstress sehr schnell ab, doch die von ihren LPS-Molekülen ausgehende Endotoxinwirkung bleibt aufrecht erhalten (Hoppenheidt, 2002). Untersuchungen zur Stabilität der endotoxischen Aktivität in Tierställen haben gezeigt, dass in potentiellen Quellen für luftgetragene Endotoxine, wie Oberflächenstaub, Stroh-, Heu-, Futter- und getrockneten Kotproben, die Aktivität dieses Toxins über mehrere Monate stabil bleibt, da wegen des hohen Trockensubstanzgehaltes in diesen Proben mikrobielle Stoffwechselfvorgänge nur sehr eingeschränkt ablaufen (Zucker, 2003). Ebenso scheint nach Zucker (2003) die endotoxische Aktivität auch im luftgetragenen Zustand lange Zeit anzuhalten, und eine Abnahme der endotoxischen Aktivität in der Stallluft ist nur auf Verdünnungsprozesse mit der Umgebungsluft und auf Depositionsprozesse zurückzuführen.

2.4.2.1 Wirkung von Endotoxinen

Die Wirkung der Endotoxine auf den Menschen ist neben dessen chemischer Konstitution ebenso abhängig von der Eintrittspforte, dem Wirkort, der Konzentration des Endotoxins und von der Empfindlichkeit der betroffenen Person. In der Umwelt kommt es i.d.R. zu einer inhalativen Endotoxinexposition, welche eine Reihe von zellulären Abwehrmechanismen in der Lunge hervorruft. Im Rahmen einer mikrobiellen Vergiftung wirken Endotoxine systemisch. Sie können zu einem septischen Krankheitsbild mit plötzlich auftretendem hohem Fieber und Störungen der Blutgerinnung bis hin zum Multiorganversagen mit Schock führen.

Die klinischen Symptomkomplexe nach dem Einatmen von Endotoxinen werden je nach Expositionsart und -dauer unterschieden in akute Effekte nach einmaliger Exposition, Effekte nach wiederholter Exposition über einen längeren Zeitraum und Effekte nach gleichzeitiger Exposition gegenüber Endotoxin und anderen Substanzen (Rylander, 2002). Akute Endotoxininhalationen können Husten, Beeinträchtigungen der Lungenfunktion, Fieber und grippeähnliche Symptome (Schnupfen, Augenirritation, Ermüdung, Halsentzündung etc.) hervorrufen. Dauerexposition kann zu chronischer Bronchitis führen (siehe auch Kapitel 2.3.1) (Anonym, 2002).

Genauere Informationen über Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen aerogener Endotoxin-Exposition und Symptomen liegen in der Literatur nicht vor. Heederik et al. (1997) beschreiben Kurzatmigkeit in Beziehung zu Endotoxinkonzentrationen von über 100 ng/m³. Laitinen et al. (1994) geben an, dass die Zahl der Arbeiter mit Atemwegsbeschwerden oder Fieber / Schüttelfrost signifikant höher war bei Endotoxinkonzentrationen in der Luft von über 25 ng/m³. Augenirritationen und Enge im Brustkorb traten häufiger auf, wenn die Luftkonzentration von biologisch aktivem Endotoxin über 150 ng/m³ maß. Einen Überblick über notwendige LPS / Endotoxin-Dosen und entsprechende akute Effekte gibt auch ein Beitrag von Danuser und Monn (1999). Hier fiel auf, dass die Endotoxin-Dosis (= LPS mit weiteren Bestandteilen der Zellwand gramnegativer Bakterien und anderen Staubbestandteilen) viel niedriger war als die reine LPS - Dosis (= chemisch aufgereinigtes Endotoxin, welches nur noch reines LPS enthält), um einen vergleichbaren Effekt auszulösen. Das weist darauf hin, dass Endotoxine in Bioaerosolen gegenüber aufgereinigtem LPS eine höhere biologische Aktivität aufweisen.

In der Literatur werden für luftgetragene Endotoxine Grenzwerte zwischen 5 und 200 ng/m³ (1 ng = 10 EU) diskutiert, allerdings existieren bislang keine wissenschaftlich validierten Expositionsgrenzwerte (Radon et Nowak, 2003). Das Berufsgenossenschaftliche Institut für Arbeitssicherheit empfahl bislang ein gesundheitsbezogenes berufsbedingtes Expositionslimit für Endotoxin von 4,5 ng/m³ (50 EU/m³) über eine 8 h - Periode (Heederik et Douwes, 1997). Mehrere experimentelle Studien konnten zeigen, dass Endotoxinbelastungen respiratorische Effekte in diesem Konzentrationsbereich (50-100 EU/m³) verursachten (Castellan et al., 1987; Anonym, 1998; Zock et al., 1998).

Wiederum gibt es auch Hinweise in einigen epidemiologischen Studien dafür, dass Endotoxine und mikrobielle Bestandteile protektive Effekte hinsichtlich der Entwicklung von atopischem Asthma und Allergien in früher Kindheit zeigen (von Mutius et al., 2000; Remes et al., 2003) und außerdem wichtig für die Entwicklung eines intakten Immunsystems sind. Daher scheint die Natur der Endotoxine irgendwie paradox (Liu, 2002; Radon, 2006). Die Wirkung der Endotoxinexposition wird also insgesamt beeinflusst durch die Zeit, Dauer und Dosis der Exposition, der An- oder Abwesenheit von Vorerkrankungen und dem Polymorphismus in den Genen, welche für die Endotoxinrezeptoren kodieren (Williams et al., 2005).

Vorkommen von Endotoxinen in unterschiedlichen Staubfraktionen:

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass luftgetragene grampositive und gramnegative Bakterien und deren Abbauprodukte meist an Staubpartikel (Particulate Matter, PM) gekoppelt sind, und es wurde mehrfach belegt, dass diese hauptsächlich mit der einatembaren Staubfraktion assoziiert sind (Monton et Torres, 1998; Daniels et al., 2000; Imrich et al., 2000). Eine Bewertung von löslichen und unlöslichen Luftpartikelsuspensionen weist darauf hin, dass die meisten biologischen Effekte auf Alveolarmakrophagen durch unlösliche Komponenten und bestimmte partikelabsorbierende Faktoren wie Endotoxine vermittelt werden (Imrich et al., 2000; Soukup et Becker, 2001). Auch Mueller et al. (2004) konnten zeigen, dass nur Endotoxinaggregate biologisch aktiv sind, Monomere seien dagegen nicht in der Lage, eine Zytokinantwort von Monozyten auszulösen.

Studien, die zwischen der einatembaren und der alveolengängigen Staubfraktion differenzierten, beschrieben, dass Endotoxine in beiden Fraktionen zu finden waren, aber mit Dominanz in der einatembaren Fraktion (Mandryk et al., 1999; Nieuwenhuijsen et al., 1999; Donham et al., 2000). Ergebnisse einer Studie von Becker et al. (2002; 2003) zeigten, dass die PM₁₀- Staubfraktion verantwortlich für die meisten PM-Effekte auf Alveolarmakrophagen,

inklusive der Induktion der Zytokinproduktion, ist, und eine nur sehr geringe Reaktion durch feine (PM_{2.5}) bzw. ultrafeine (PM_{1.0}) Partikeln ausgelöst wird.

In Tierställen sind zahlreiche Quellen für organische Stäube zu finden. Die Hauptquelle dieser Stäube sind die Tiere selbst sowie Tierfutter und Einstreu (Merchant, 1989; Hartung, 1992). Tierkot und mit Bakterien kontaminiertes Pflanzenmaterial sind dabei entscheidend von Bedeutung bei einer an organischen Staub gebundenen Endotoxinexposition (Jacobs, 1997).

2.4.2.2 Zelluläre Mechanismen nach Endotoxinexposition

Endotoxinhaltige Partikel gelangen in Abhängigkeit von ihrer aerodynamischen Größe mit der Atemluft in die Bronchiolen und Alveolen.

Alveolarmakrophagen spielen eine Schlüsselrolle in der Wirtsverteidigung und der Entzündungsauslösung (Kooguchi et al., 1998; Lentsch et al., 1999). Sie sind von großer Bedeutung für die effektive Entfernung von inhalierten Partikeln und Mikroorganismen in den unteren Atemwegen (Soukup et Becker, 2001).

Endotoxinaggregate als biologisch aktive Einheiten können aus energetischen Gründen nicht selbst mit der Immunzellmembran interagieren. Diese Energiebarriere kann mit Hilfe eines Fusionsproteins überwunden werden, welches die LPS-Aggregate bindet und sie in die Membran überführt (Mueller et al., 2005). Dieses sogenannte LPS-Binding-Protein (LBP), ein 60 kDa Glykoprotein, wird in der Leber synthetisiert und dient als Co-Faktor für LPS, das als LBP / LPS - Komplex gebunden dem Cluster of Differentiation (CD) 14-Rezeptor auf immunkompetenten Zellen präsentiert wird (Wright et al., 1990; Fenton et Golenbock, 1998). CD14 ist ein 55 kDa großes Glykoprotein, das über Glycosylphosphatidylinositol in der Zellmembran verankert ist und den LBP / LPS - Komplex mit hoher Affinität bindet (Wurfel et al., 1997). CD14 selbst ist kein Signalmolekül, nur die Interaktion mit Toll-Like-Rezeptor-Proteinen führt zur intrazellulären Signaltransduktion und schließlich zur Zytokinproduktion (Ulevitch et Tobias, 1995; Means et al., 2000).

Als wichtiger Bestandteil der angeborenen und auch der erworbenen Immunität erkennen Toll-Like-Rezeptoren (TLR) konservierte Strukturen (bakterielle Virulenzfaktoren) von Mikroorganismen. TLR bestehen aus einer extrazellulären leucin-reichen Region, einer transmembranalen Region und einem intrazellulären Bereich, der dem des IL-1 β -Rezeptors ähnlich ist (Muzio et Mantovani, 2001; Basu et Fenton, 2004). Der Hauptrezeptor für die LPS-Signaltransduktion in allen Säugetierspezies ist der TLR-4 (Lien et al., 2000). Die extrazelluläre Domäne umfasst hier 82 Aminosäuren, ist sehr variabel und führt zu spezies-spezifischen Unterschieden in der Erkennung des prototypischen TLR-4-Liganden LPS (Hajjar et al., 2002). TLR-4 ist auf der Zelloberfläche an ein extrazelluläres Erkennungsmolekül, MD-2, gekoppelt (Shimazu et al., 1999). CD14 dient als Katalysator für die Bindung von LPS an MD-2. Erst dieser LPS-MD-2-Komplex interagiert mit dem TLR-4 (O'Neill et Greene, 1998; Miller et al., 2005). Hirschfeld et al. (2000) konnten zeigen, dass reines LPS-Lipid A ausschließlich durch TLR-4 vermittelt wird, wohingegen Glykolipide, Lipoteichonsäuren und Proteoglycane grampositiver Bakterien und Mykobakterien über den TLR-2 vermittelt werden (Basu et Fenton, 2004). Allerdings gibt es hier auch Ausnahmen, wie Werts et al. (2001) und Hirschfeld et al. (2001) belegen, zum Beispiel wird das LPS von *Leptospira interrogans* durch den TLR-2 vermittelt. Der TLR-2 könnte also in vivo als LPS-Rezeptor mit niedriger Affinität angesehen werden (Lien et al., 2000), auf jeden Fall ist der TLR-4 etwa 100x sensitiver für LPS als der TLR-2 (Muta et Takeshige, 2001). Es gibt aber auch vermehrt Hinweise darauf, dass der TLR-4 nicht spezifisch nur Endotoxine, sondern auch andere Substanzen, wie Strukturen von Pilzen, Viren und mykobakteriellen

Pathogenen, und auch endogene Liganden wie Fibronectin und Hitzeschock-Proteine (hsp60) binden kann (Kurt-Jones et al., 2000; Ohashi et al., 2000; Rassa et al., 2002; Ferwerda et al., 2008; Lehnardt et al., 2008). Hsp60 wird von ZNS-Zellen ausgeschüttet, bindet spezifisch an Mikroglia und führt über TLR-4-Aktivierung zum nekrotischen oder apoptotischen Zelltod. In mehreren Studien wurde nachgewiesen, dass Zellwandbestandteile von verschiedenen Schimmelpilzen, wie *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans* und *Candida albicans* sowohl mit TLR-4 als auch TLR-2 interagieren und eine Immunantwort auslösen (Meier et al., 2003; Levitz, 2004). Hier sind es vor allem die β -Glucane, Chitin und Mannoproteine der Zellwand, welche über das Adapterprotein MyD88 die TLR aktivieren. Die Reaktion auf grampositive und gramnegative Bakterien und Pilzelemente wird also durch eine Kombination verschiedener TLR gesteuert (Kirschning et al., 1998; Chow et al., 1999; Schwandner et al., 1999; Hirschfeld et al., 2000; Shoham et al., 2001).

Nachdem der LBP / LPS - Komplex an den CD14-Rezeptor gebunden hat, wird eine funktionelle Einheit zwischen CD14 und dem TLR-4 vermittelt (sog. Toll / CD14 - Rezeptorkomplex (Poltorak et al., 1998), was die Signaltransduktion für LPS in Gang setzt, in deren Folge Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 ausgeschüttet werden (Dentener et al., 1993; Schumann et al., 1994). Eine ausführliche Beschreibung der nach Endotoxinstimulation von Alveolarmakrophagen sezernierten Zytokine findet sich in der Habilitationsschrift von Zucker (2003) bzw. der Dissertation von Schindler (2005).

In den meisten Studien wird ausschließlich über die Spezifität einzelner mikrobieller Bestandteile, ihre Bindung und Effekte berichtet. Wahrscheinlich liegt jedoch ein Zusammenspiel verschiedener mikrobieller Bestandteile über verschiedene TLR an einer Zelle vor, die je nach Ligand in angepasste, leicht unterschiedliche Reaktionen münden (Underhill et Ozinsky, 2002). Aufgrund dieser Erkenntnisse und da mehrfach belegt wurde, dass der TLR-4 nicht nur selektiv Endotoxine, sondern auch andere Substanzen binden kann, fällt für die folgenden Untersuchungen die Möglichkeit der Rezeptorblockade zur Bestimmung des Anteils der Endotoxine an der gesamt-proinflammatorischen Aktivität von komplexen Gemischen, wie sie beispielsweise Bioaerosole aus Tierställen darstellen, weg. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit der selektiven Hemmung der Endotoxinwirkung durch spezifische endotoxin-neutralisierende Substanzen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

2.4.3 Selektive Hemmung der Endotoxinwirkung durch spezifische endotoxinneutralisierende Substanzen

2.4.3.1 Polymyxin B

Polymyxin B (PB) ist ein Polypeptidantibiotikum, abgeleitet von dem Bakterium *Bacillus polymyxa*, welches bakterizide Wirkung bei gramnegativen Bakterien durch Interaktion mit Phospholipidkomponenten der Zellmembran zeigt (Frey et Löscher, 2002). Die Polymyxinfamilie der Antibiotika umfasst positiv geladene amphiphatische zyklische Oligopeptide gebunden an eine Fettsäure (Morrison et Jacobs, 1976).

PB bindet mit hoher Affinität an den Lipid-A-Anteil, der endotoxisch aktiven Komponente des LPS-Moleküls, und neutralisiert dadurch dessen biologische Aktivität (Morrison et Jacobs, 1976; Moore et al., 1986). Auf der Basis der Molekularebene befürworten Wang und Hollingsworth (1996) die Hypothese, dass der endotoxinneutralisierende Effekt des PB verursacht wird durch das Aufbrechen der Supramolekularstruktur des LPS, welches an seine toxischen Eigenschaften gekoppelt ist. Die reguläre Fettsäureanordnung wird durch Einlagerung von Peptidmolekülen zerstört. Eine ähnliche Wirkungsweise wird für Peptide

angenommen, die ebenfalls LPS binden und dessen toxische Eigenschaften hemmen können (Pereira et al., 1993; Taylor et al., 1995).

Zur Beschreibung der bakteriziden Wirkung von PB wird nach Koch (1998) ein zweistufiger Mechanismus für die Wechselwirkung mit LPS-Membranen angenommen. Danach kommt es zunächst aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zu einer schwachen Bindung des positiv geladenen PB an der negativ geladenen Lipidmembran, ohne dass es zum Einbau des PB kommt. Die hohe entgegengesetzte Ladung beider Moleküle führt im zweiten Schritt zu einem vollständigen Einbau des lipophilen Teils des Polymyxins, mit der Folge, dass der Ordnungsgrad des Fettsäurebereichs reduziert und die Oberflächenladung der Membran neutralisiert wird. Diese beiden Effekte führen dann wahrscheinlich dazu, dass die äußere Membran des Bakteriums ihre Funktion als Barriere verliert und das Bakterium somit zugrunde geht.

Soukup und Becker (2001) bestätigen Untersuchungen, dass eine Zytokinausschüttung durch Stimulation mit städtischem PM10 - Staub teilweise durch PB und LBP blockiert werden kann. Dies deutet auf die bedeutende Rolle von Endotoxin bei erhöhter Zytokinproduktion in Alveolarmakrophagen nach Inkubation mit Staubpartikeln hin. Studien von Becker et al. (2002) haben ebenfalls gezeigt, dass eine durch PM10 (Stadtluftpartikel) induzierte IL-6-Produktion zum Teil durch PB gehemmt werden kann. Die durch gramnegative Bakterien (Pseudomonaden) induzierte IL-6-Produktion wurde durch PB fast vollständig gehemmt, wohingegen kein signifikanter Effekt des PB auf die Zytokinproduktion durch grampositive Bakterien (Staphylokokken, Streptokokken) erzielt werden konnte. Eine Arbeit von Huang et al. (2002) belegt, dass bei Filterproben aus der Umgebungsluft die PM10-Staubfraktion eine höhere TNF α -Produktion stimulierte als die PM2.5-Fraktion, und dass dies assoziiert ist mit einem größeren Endotoxingehalt in PM10. PB hemmt danach 42% der TNF α -Produktion bei PM10-Partikeln und nur 32% bei PM2.5. Auch Becker et al. (2003) kommen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass die Alveolarmakrophagen mit ihren Rezeptoren mikrobielle Zellstrukturen wie Endotoxine / LPS in den PM-Fractionen aus städtischen Luftfilterproben erkennen und dass PM10 stärker in entzündliche Prozesse und Lungenfunktionsbeeinträchtigungen involviert ist als die kleineren Staubfraktionen. Diese Ergebnisse der Literaturstudien bestätigen die bedeutende Rolle von Endotoxin für die Zytokinausschüttung durch Makrophagen und den hemmenden Einfluß von Polymyxin B.

2.4.3.2 Endotoxin-Neutralizing-Protein

Endotoxin-Neutralizing-Protein (ENP) ist die rekombinante Form des Limulus-Anti-LPS-Faktor (rLALF), welcher ein aus 101 Aminosäuren (11.8 kDa) umfassendes Protein darstellt und vom American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) isoliert wurde. Es bindet und neutralisiert LPS (Wainwright et al., 1990) und hat einen starken antibakteriellen Effekt auf das Wachstum von gramnegativen R-Typ Bakterien (Morita et al., 1985). Die LPS-Bindungsseite des rLALF befindet sich zwischen den Aminosäuren (AS) 31 und 52 und ist unterteilt in positiv geladene und hydrophobe Reste, geformt zu einer positiv geladenen amphiphatischen Schleife, die durch Disulfidbrücken verbunden ist (Hoess et al., 1993). Ried et al. (1996) untersuchten die LPS-Bindungsregion von LALF im Detail und charakterisierten eine minimale Bindungsdomäne, welche 8-10 AS umspannt und zwischen den AS-Resten 36-45 lokalisiert ist. Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass eine LPS-Bindung mit hoher Affinität nur nach Zyklisierung des Peptides (Umwandlung der linearen in die zyklische Form) erreicht wird. ENP unterscheidet sich vom LALF durch seinen Mannose-Anteil (Fletcher et al., 1993). ENP / LALF bindet ebenso wie PB mit hoher Affinität an den Lipid-A-Anteil gramnegativer Bakterien mit einer 1:1 Stöchiometrie und neutralisiert dadurch die

LPS-Bioaktivität (Wainwright et al., 1990). Sequenzähnlichkeiten und die kompetitive Bindung von LALF bzw. PB an LPS lassen ein gemeinsames LPS-Bindungsepitop vermuten, in welchem das zyklische PB-Peptid analog zu Teilen der amphiphatischen Schleife des LALF ist und an den Phosphoglucosaminteil des Lipid-A bindet (Muta et al., 1987; Wainwright et al., 1990; Hoess et al., 1993). In einer Studie von Bannerman et al. (1998) war ENP in der Lage, gegen Endotoxine unterschiedlicher bakterieller Herkunft zu schützen. Mehrere Berichte sprechen dafür, dass LALF nicht nur mit einzelnen LPS-Molekülen, sondern auch mit intakten Membranen, die LPS enthalten, interagiert. In einer Studie von Andra et al. (2004), welche die ENP-LPS-Interaktion genauer untersuchte, wurde eine Aggregatbildung zwischen ENP und dem LPS-Molekül angenommen, wobei die Lipid-A-Struktur von einer unilamellaren / kubischen in eine hauptsächlich multilamellare Organisation übergeht, allerdings die Sekundärstruktur des Proteins fast unverändert bleibt. Weiterhin sprechen die Untersuchungsergebnisse dafür, dass ENP ein Transportprotein ähnlich dem LBP ist. Auch die Bindungsseite für ENP und LBP am LPS scheint die gleiche zu sein. Eine Inkubation von ENP mit LPS führte zu einer kompletten Hemmung der LBP-Bindung am LPS.

2.4.4 Quantifizierung luftgetragener proinflammatorischer Substanzen

2.4.4.1 Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Die Charakterisierung der durch Bioaerosolbelastungen hervorgerufenen gesundheitlichen Risiken mit entzündlichem Hintergrund kann über die Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Endotoxinen mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test erfolgen (Zucker et al., 2004). Dieser Test wurde erstmals von Levin und Bang (1964) beschrieben und basiert auf der Koagulationsreaktion der Hämolymphe des Pfeilschwanzkrebses (*Limulus polyphemus*) in Gegenwart von Endotoxin.

Methodisch unterscheidet man v.a. chromogene Endpunktmethoden und quantitativ kinetische Testvarianten. Ein Vergleich beider Methoden ergab, dass das kinetische Verfahren präziser ist mit einer höheren Reproduzierbarkeit, trotzdem werden diese Ergebnisse durch die Endpunktmethode bestätigt. Die Werte für beide Methoden lagen im gleichen Größenbereich, so dass die Endpunktmethode als akzeptierbar eingestuft werden kann (Gorny et al., 1999).

Mittels LAL-Test werden im Wesentlichen nur Endotoxine gramnegativer Bakterien bestimmt. Demnach reflektiert er nur einen Teil des gesamten Spektrums von luftgetragenen proinflammatorischen Stoffen in Bioaerosolen. Bei der Bewertung von Messergebnissen müssen weiterhin die Grenzen und Fehlerquellen des LAL-Verfahrens Berücksichtigung finden. So zeigen Staubextrakte im LAL-Test abhängig von der Staubart, der Verdünnung und vom Lysathersteller mitunter starke hemmende oder stimulierende Eigenschaften. Derart störende Einflüsse beruhen auf chemischen Wechselwirkungen der Enzymreaktionen mit unbekanntem Substanzen. Außerdem interferieren Pilzglucane, -DNA und andere Verunreinigungen mit dem Lysat des Testkits, was zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (Anonym, 2002; Kindinger et al., 2005). Mit dem LAL-Test wird ausschließlich freies gelöstes Endotoxin nachgewiesen. Endotoxin, das in Aggregaten oder der Zellwand fixiert ist, wird damit nicht erfasst, was die Bewertung der gesundheitlichen Bedeutung beeinflussen kann. Durch das starke Adsorptionsvermögen der LPS-Moleküle an andere Moleküle, Filter, Glasgefäße oder Mikrotiterplatten kann freies Endotoxin aus dem Filterextrakt unbeabsichtigt fixiert und dadurch dem Nachweis entzogen werden (Anonym, 2002). Weiterhin hat sich gezeigt, dass bei Untersuchung derselben Proben in

verschiedenen Laboren sehr unterschiedliche Messergebnisse auftraten (Chun et al., 2000). So wurden Schwankungen zwischen den einzelnen Laboren um über eine Größenordnung ($1.000 \text{ Log}_{10} \text{ EU/mg}$) verzeichnet. Diese signifikanten Unterschiede konnten auch nach Standardisierung durch Verwendung des gleichen Testprotokolls und des gleichen Testkits nicht hinreichend reduziert werden (Chun et al., 2002).

Schließlich bestehen bei diesem Testsystem entsprechende Einschränkungen für die Übertragbarkeit auf den Menschen, weil der Test auf der Koagulationsreaktion eines Millionen Jahre alten Spinnentieres basiert und nicht die Reaktionen des Säugetierorganismus auf luftgetragene proinflammatorische Substanzen vollständig widerspiegeln kann (Fennrich et al., 1998; Linsel et Kummer, 1998).

Es sollten daher zusätzlich Testsysteme angewendet werden, welche die Gesamtheit aller entzündungsauslösenden Strukturen erfassen und sich näher am Entzündungsgeschehen der belasteten Spezies orientieren. Dies kann mit dem so genannten humanen Vollbluttest erreicht werden, der vor allem auch entwickelt wurde, um die menschlichen Reaktionen des Respirationstraktes auf ein komplexes Gemisch von Komponenten und Organismen zu reflektieren, mit Hilfe einer einfachen und praktikablen Sammel- und Messmethodik.

2.4.4.2 Humaner Vollbluttest

Bei den in Tierställen vorkommenden Bioaerosolproben ist davon auszugehen, dass in diesen ein Gemisch unterschiedlichster entzündungsauslösender Substanzen vorliegen kann. Es ist zwar hinreichend bekannt, dass Endotoxine qualitativ gesehen die stärkste entzündungsauslösende Komponente in diesen Bioaerosolen sind, in welchem quantitativen Verhältnis sie aber zu anderen, weiterhin vorhandenen entzündungsauslösenden Substanzen stehen, ist weitgehend unbekannt.

Der humane Vollbluttest stellt ein Verfahren zur Bestimmung luftgetragener entzündungsauslösender Stoffe dar. Hierbei werden allgemein Substanzen nachgewiesen, die zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und IL-1 β aus Monozyten führen können. Der Test wurde erstmals 1995 als eine neue Methode zur Bestimmung pyrogener (fieberinduzierender) Substanzen in Parenteralia beschrieben (Hartung et Wendel, 1995) und seitdem weiterentwickelt, standardisiert und an die Bestimmung proinflammatorischer Substanzen in organischen Stäuben angepasst (Fennrich et al., 1999; Fennrich et al., 2001). Bioaerosolproben unterschiedlicher Fraktionen, welche mit Standardmethoden auf Membranfiltern gesammelt werden, werden nach Extraktion in pyrogenfreiem Wasser mit menschlichem Blut in Kontakt gebracht. In den Staubproben enthaltene entzündungsauslösende Stoffe aktivieren Monozyten, welche zelluläre Signalstoffe (Entzündungsmediatoren / Zytokine) ausschütten. Damit wird genau die Reaktion nachvollzogen, die diese Stoffe nach Einatmen in der Lunge hervorrufen, denn dort aktivieren diese Stoffe die Lungenmakrophagen, welche die gleichen entzündungsauslösenden Mediatoren ausschütten wie die Monozyten. In der Lunge sind diese Mediatoren für die Auslösung und Steuerung des Entzündungsgeschehens verantwortlich.

Im Vollbluttest wird die Konzentration dieser Stoffe mittels immunologischer Standardmethoden (ELISA) bestimmt und dient als Maß für das entzündungsauslösende Potential der jeweiligen Staubprobe (Fennrich et al., 2001; Zucker et al., 2002; Kindinger et al., 2005). Untersuchungen, die den Gebrauch verschiedener ELISA's und Bioassays auf Basis der IL-1 β -, IL-6-, IL-8- und TNF- α -Ausschüttung vergleichen, ergaben, dass der IL-1 β -ELISA die besten Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität, Varianz und Kontrollwerten erzielte (Schindler, 2005).

Der humane Vollbluttest erkennt Endotoxine und Nicht-Endotoxine, wie Pilzsporen, grampositive Bakterien und deren Lipoteichonsäuren und pyrogene Staubpartikel, mit hoher Sensitivität, welche das proinflammatorische Potential einer Probe reflektieren. Die Methode stellt also ein Testsystem zur Bestimmung der gesamten inflammatorischen Kapazität von luftgetragenen mikrobiellen Kontaminanten dar, die relevant für den Menschen sind (Kindinger et al., 2005). Die Ergebnisse einer Studie von Zucker et al. (2006) weisen darauf hin, dass der humane Vollbluttest neben dem LAL-Test als zusätzliche Methode zur Charakterisierung des entzündungsauslösenden Potentials von Bioaerosolen aus Tierställen angewendet werden kann.

2.5 Festlegungen über die Messtechnik luftgetragener Staubfraktionen

In der Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI und DIN – Normenausschuss – erarbeiten Fachleute aus Wissenschaft, Industrie und Verwaltung VDI-Richtlinien und DIN-Normen zum Umweltschutz, die den Stand der Technik und der Wissenschaft beschreiben und deren Arbeitsergebnisse als gemeinsamer deutscher Standpunkt in die europäische technische Regelsetzung bei CEN (Europäisches Komitee für Normung) und in die internationale technische Regelsetzung bei ISO (Internationale Organisation für Normung) einfließen. Die Messung von Bioaerosolen und mikrobiellen Luftverunreinigungen hat gegenüber der Messung von Partikeln und gasförmigen chemischen Verbindungen in der Außenluft erst in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Während gesetzliche Vorgaben zur Begrenzung mikrobieller Emissionen zurzeit nur allgemein formuliert sind, hat der Arbeitsschutz bereits erste Normierungsaktivitäten vorgenommen (BIA 9427).

In der Richtlinienreihe VDI 4252 werden die verschiedenen Verfahren zur Probenahme von Bioaerosolen beschrieben und die Anforderungen an die Durchführung der Messung festgelegt (Anonym, 2005).

Alle Probenahmegeräte müssen die in der DIN EN 481 „Festlegung der Teilchengrößenverteilung zur Messung luftgetragener Partikel“ niedergelegten Charakteristika einhalten. In jedem Fall muss die Erfassungscharakteristik des Gerätes definiert sein bzw. müssen Angaben zum Anwendungsbereich vom Hersteller gemacht werden. Die Probenahmegeräte müssen für die besonderen Bedingungen der Probenahme von Bioaerosolen geeignet sein (Sterilisierbarkeit, Handhabung etc.), kalibrierbar sein und einen konstanten Volumenstrom besitzen. Eine Einhaltung dieser genau definierten Anforderungen an die Messtechnik gewährleistet, dass auch bei Verwendung von Geräten unterschiedlicher Hersteller vergleichbare Ergebnisse erzielt werden können.

3. Material und Methoden

3.1 Vorversuche zur Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität

Um zwischen der proinflammatorischen (proinfl.) Aktivität von Endotoxinen und Nicht-Endotoxin-Substanzen differenzieren zu können, ist es möglich spezifische Endotoxininhibitoren einzusetzen, welche einen selektiv hemmenden Einfluss auf die endotoxische Aktivität haben. Somit kann in eine gesamt-proinfl. Aktivität, ohne Zusatz des Endotoxininhibitors, und in eine nicht-endotoxinspezifische proinfl. Aktivität durch den Zusatz des Endotoxinhemmers unterschieden werden.

In den hier durchgeführten Vorversuchen wurde die Wirkung von zwei in der Literatur beschriebenen Endotoxininhibitoren geprüft. Hierbei handelte es sich um:

1. Polymyxin B (PB) und
2. Endotoxin-Neutralizing-Protein (ENP)

3.1.1 Wirkung von Polymyxin B

Polymyxin B ist ein Polypeptidantibiotikum, das an das Lipid A, die endotoxisch aktive Komponente des LPS-Moleküls gramnegativer Bakterien, bindet und dadurch dessen biologische Aktivität neutralisiert (siehe Kapitel 2.4.3.1) (Morrison et Jacobs, 1976; Moore et al., 1986).

3.1.1.1 Ermittlung der optimalen endotoxinneutralisierenden Konzentration von PB

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration an PB (Sigma-Aldrich, Bestellnummer: P-4932, Lot-Nr.: 123K2500), wie sie im weiteren Verlauf der Arbeit eingesetzt werden sollte, wurde die endotoxinneutralisierende Wirkung verschiedener Konzentrationen des Antibiotikums (0,0; 0,1; 1,0; 5,0; 50,0 µg/ml) auf die proinfl. Aktivität von *E.coli*-LPS (0111:B4, Sigma-Aldrich; dekadische Verdünnungsreihe von 1,0 mg/ml bis 1,0 pg/ml) im Vollbluttest untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss von PB (0,0; 0,1; 1,0; 5,0; 50,0 µg/ml) auf die proinfl. Aktivität von *Staphylococcus xylosus* Trockensubstanz (TS)¹ (1:10 Verdünnungsstufen von 1,0 mg/ml bis 0,1 ng/ml) im Vollbluttest untersucht.

Nach Zugabe des PB zu den jeweiligen Proben wurden diese zur Durchmischung mehrmals geschwenkt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Dann erfolgte die Zugabe des humanen Vollblutes (siehe Kapitel 3.2.2.2).

¹Herstellung der *Staphylococcus xylosus* TS:

Staphylococcus xylosus auf Standard-I-Agar ausstreichen, 24 h bei 37°C bebrüten, mit 0,9% NaCl abschwemmen, Lyophilisierung (Gefriertrocknung bei -70°C), Lagerung bei 4°C auf Silicagel

3.1.1.2 Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität eines weiteren Endotoxins

Um den Einfluss von PB auf die proinfl. Aktivität eines weiteren Endotoxins zu bestimmen wurde ein Control-Standard-Endotoxin (CSE; *E.coli* 0113:H10, Chromogenix) mit und ohne Zusatz von PB auf die Reaktivität im humanen Vollbluttest untersucht. Hierzu wurde vom *E.coli*-LPS eine dekadische Verdünnungsreihe von 1 mg/ml bis 100 µg/ml hergestellt und diese mit 5 µg/ml PB versetzt. Die Konzentration von 5 µg/ml wurde aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche mit *Staphylococcus xylosus* – TS und *E.coli* - LPS 0111:B4 (siehe Kapitel 3.1.1.1) gewählt.

3.1.1.3 Einfluss von PB auf proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine

Um den Einfluss von PB auf Nicht-Endotoxin-Substanzen zu prüfen, wurden neben *Staphylococcus xylosus* TS die kommerziell erhältlichen Glucane Curdlan (β-1,3-D-Glucan, Sigma-Aldrich, Lot-Nr.: 114K4096) sowie Barley-Glucan (β-1,3-1,4-D-Glucan, Sigma-Aldrich, Lot-Nr.: 1138821) und außerdem Quarzpartikel (Durchmesser 0,007 µm, Sigma-Aldrich) mit und ohne Zusatz von PB (5 µg/ml) im humanen Vollbluttest untersucht.

Bei Curdlan und Barley-Glucan lag die verwendete Konzentration bei 1 mg/ml bis 100 ng/ml in 1:10 Verdünnungsschritten. Der Quarz wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml, in einer dekadischen Verdünnungsreihe, bis 1 µg/ml eingesetzt.

3.1.1.4 Einfluss von PB auf Bioaerosolproben

Zur Untersuchung des Einflusses von PB auf die proinfl. Aktivität von Bioaerosolen wurden aus zwei Tierställen je eine Probe einatembarer Staub und eine PM10-Staubprobe mit und ohne Zusatz von PB im Vollbluttest untersucht. Von den in 50 ml pyrogenfreiem Wasser extrahierten Staubproben wurde eine duale Verdünnungsreihe bis 1:128 hergestellt und diese jeweils mit 5 µg/ml PB versetzt.

3.1.2 Wirkung von Endotoxin-Neutralizing-Protein

Endotoxin-Neutralizing-Protein (ENP) ist die rekombinante Form des Limulus-anti-LPS-Faktor (LALF), welcher ein aus 101 Aminosäuren umfassendes Protein darstellt und vom American horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) isoliert wurde. Es bindet ebenso wie PB mit hoher Affinität an den Lipid A-Anteil des LPS-Moleküls und neutralisiert dadurch dessen Aktivität (siehe Kapitel 2.4.3.2) (Wainwright et al., 1990).

3.1.2.1 Ermittlung der optimalen endotoxinneutralisierenden Konzentration von ENP

Die optimale Arbeitskonzentration von ENP wurde im Vollbluttest ermittelt. Hierzu wurde das ENP in Konzentrationen von 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, und 5,0 µg/ml mit *E.coli* LPS (0111:B4, Sigma-Aldrich, 1 mg/ml bis 0,1 ng/ml in 1:10 Verdünnungsschritten) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die proinfl. Aktivität des unbehandelten und behandelten Endotoxins im Vollbluttest bestimmt.

3.1.2.2 Einfluss von ENP auf proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine

Staphylococcus xylosus TS, Curdlan (β -1,3-D-Glucan, Sigma-Aldrich, Lot-Nr.: 114K4096), Barley-Glucan (β -1,3-1,4-D-Glucan, Sigma-Aldrich, Lot-Nr.: 1138821) und Quarzpartikel (Durchmesser 0,007 μ m, Sigma) als proinfl. Substanzen ohne Endotoxinstruktur wurden in den Konzentrationen wie unter Punkt 3.1.1.3 beschrieben, mit und ohne Zusatz von ENP auf die Reaktivität im humanen Vollbluttest untersucht. ENP wurde auf Grund der Vorversuche zur Ermittlung der optimalen endotoxinneutralisierenden Konzentration mit 0,5 μ g/ml eingesetzt (siehe Kapitel 3.1.2.1).

3.1.2.3 Einfluss von ENP auf Bioaerosolproben

Um den Einfluss von ENP auf die proinfl. Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen zu testen, wurden die gleichen Bioaerosolproben wie unter Punkt 3.1.1.4 mit und ohne Zusatz von 0,5 μ g/ml ENP im Vollbluttest untersucht.

3.2 Hauptversuche zur Charakterisierung der endotoxin- und nicht-endotoxinbedingten proinflammatorischen Aktivität von Bioaerosolen in Tierställen

3.2.1 Beschreibung der untersuchten Tierställe

Für die hier vorliegenden Untersuchungen wurden 13 Tierställe verschiedener Nutztierarten und Haltungssysteme ausgewählt (3 Legehennen-, 1 Broiler-Elterntier-Aufzucht-, 1 Broiler-Elterntier-Haltung-, 3 Schweinemast-, 2 Pferde-, 1 Schaf- und 2 Milchviehställe). Die für die Untersuchungen relevanten haltungstechnischen Merkmale sind in der Tabelle 12 des Anhangs zusammengefasst.

3.2.2 Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität in den Bioaerosolproben

Zur Bestimmung der endotoxinbedingten und nicht-endotoxinbedingten proinfl. Aktivität von Bioaerosolproben wurden diese mit und ohne Zusatz von Polymyxin B in humanem Vollblut untersucht. Das grundlegende Prinzip dieser Untersuchungen ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Behandlung der Bioaerosolproben mit PB erfolgte wie unter 3.1.1.1 beschrieben. Die Durchführung des Vollbluttests wird in Kapitel 3.2.2.2 erläutert.

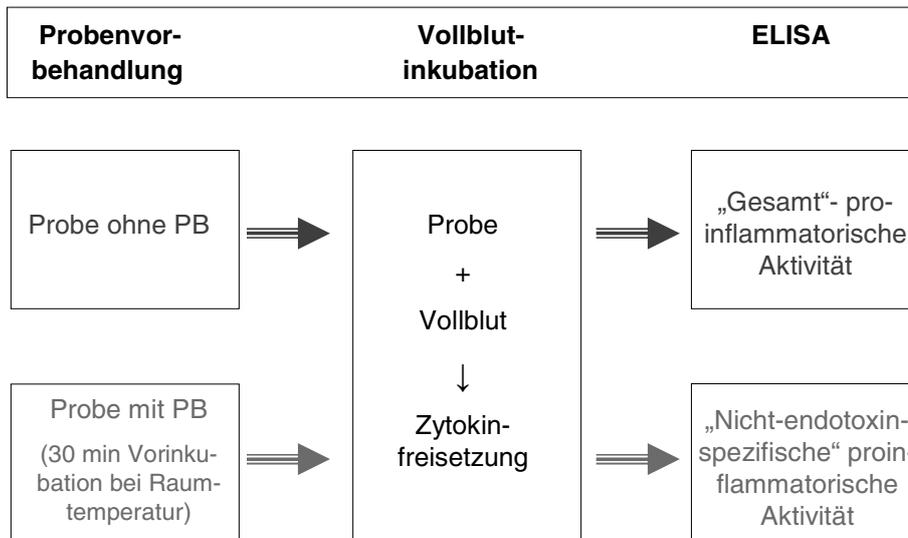


Abb. 6: Bestimmung der endotoxinbedingten proinflammatorischen Aktivität in Bioaerosolproben; diese ergibt sich aus der Differenz von der gesamt-proinflammatorischen – und der nicht-endotoxin-spezifischen proinflammatorischen Aktivität

3.2.2.1 Sammlung der Bioaerosolproben

Voraussetzung für die Bestimmung der proinfl. Aktivität von Bioaerosolproben ist, dass die Probenahmegeräte für die besonderen Bedingungen der Probenahme biologischer Aerosole geeignet sind. Das bedeutet insbesondere, dass sie aus pyrogenfreien bzw. depyrogenisierbaren Materialien bestehen müssen.

Die folgenden Probenahmegeräte, welche nach dem Filtrationsprinzip arbeiten, fanden bei den vorliegenden Messungen Anwendung:

Tabelle 1: verwendete Probenahmegeräte zur Staubsammlung mit Angabe von Luftdurchsatz und Sammelzeit

Sammelgerät	Luftdurchsatz	Sammelzeit
PGP-Dust-Sampling-System	3,5 l/min	180 min
PM10-Sammler (LVS 3.1)	38 l/min	180 min

PGP: Personenbezogenes Gefahrstoff-Probenahmesystem

LVS: Low Volume Sampler

Die Sammler wurden mit pyrogenfreien Polycarbonatfiltern (Durchmesser 47 mm, 8 µm Porengröße, Millipore GmbH, Eschborn, D) entsprechend den Angaben des Herstellers ausgerüstet. Mit dem PGP-Dust-Sampling-System (Ströhlein, Kaarst, D) nach VDI 4252 (Anonym, 2004^a) wird der einatembare Staubanteil (früher Gesamtstaub) erfasst und der

PM10-Sammler (Derenda, Teltow, D) dient zur Bestimmung der Konzentration von luftgetragenen Partikeln mit Teilchendurchmessern bis 10 µm.

Die Messungen wurden außerhalb der Fütterungszeiten oder der Einstreuwechsel durchgeführt. Als Messpunkt wurde die Mitte des Stalles ausgewählt. Die Meßhöhe entsprach dem Einatembereich der Tiere. Ziel dieser Messungen war es, die Grundbelastung mit luftgetragenen proinfl. Stoffen in den untersuchten Ställen zu charakterisieren.

Aufarbeitung der Filterproben:

Mit der Probe beaufschlagte Filter wurden zunächst mit einer sterilen Pinzette aus dem Transportbehälter entnommen und in einem endotoxinfreien Glasgefäß über Nacht bei 50-60°C in Anwesenheit von Silicagel getrocknet. Die Masse des auf den Filtern abgeschiedenen Staubs wurde nach dieser Konditionierung durch Wägung bestimmt.

Zur Bestimmung der proinfl. Aktivität wurden die Filter in 50 ml pyrogenfreiem Wasser (Wasser zur Injektion, Braun Melsungen AG, Melsungen, D, endotoxische Aktivität: <0,05 EU/ml) extrahiert und bei Raumtemperatur 120 min auf einem Horizontalschüttler (22 rpm) geschüttelt. Anschließend erfolgte die Untersuchung des erhaltenen Eluats im Vollbluttest.

3.2.2.2 Durchführung des humanen Vollbluttests

Der humane Vollbluttest stellt ein Verfahren zur Bestimmung der Konzentration luftgetragener entzündungsauslösender Stoffe dar. Bei dem hier angewendeten semiquantitativen Verfahren wird die proinfl. Aktivität einer Substanz anhand der durch sie hervorgerufenen Interleukinausschüttung aus Monozyten bewertet.

Alle zu testenden Proben wurden mit dem Blut von zwei verschiedenen Spendern untersucht. Die Spender mussten klinisch gesund sein und das Blut musste innerhalb von 4h nach Abnahme verwendet werden.

Verwendete Materialien für die Vollblutinkubation:

- 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, pyrogenfrei)
- pyrogenfreie Pipettenspitzen und 0,9% NaCl-Lösung (B. Braun, Melsungen AG, D)
- Control-Standard-Endotoxin (CSE; *E.coli* 0111:B4, Cambrex, Walkersville, USA)
- Brutschrank 37°C
- Zentrifuge (2000 rpm)
- Mikrotiterplatte 96-well zur Lagerung der Überstände
- Gefrierschrank -75°C

Durchführung der Vollblutinkubation:

- Probenaufbereitung
 - o Standardkurve
Aus dem CSE (*E.coli* 0111:B4, Cambrex, Walkersville, USA) sind Lösungen mit einer endotoxischen Aktivität von 0 EU/ml, 0,1 EU/ml, 0,25 EU/ml, 0,5 EU/ml, 1 EU/ml, 2 EU/ml und 5 EU/ml herzustellen.
 - o Bioaerosolproben
Die in pyrogenfreiem Wasser extrahierten Proben (Eluate der Filterproben) sind in dualen Schritten mit physiologischer NaCl-Lösung zu verdünnen. Bei

der Verdünnung ist für jeden Verdünnungsschritt auf die Originallösung zurückzugehen (siehe Verdünnungsschema in Tabelle 2). Ein Teil der Originalprobe ist als Rückstellprobe bei -75°C einzufrieren.

Tabelle 2: Verdünnungsschema für die Proben

Verdünnung	Probe (µl)	NaCl (µl)
Original	4000	0
1:2	1000	1000
1:4	500	1500
1:8	250	1750
1:16	200	3000
1:32	100	3100
1:64	50	3150
1:128	25	3175

- Probenansatz

Zur Bestimmung der proinfl. Aktivität der Bioaerosolproben wurden folgende Substanzen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen pipetiert:

- Bestimmung der gesamt-proinfl. Aktivität:
 - 900 µl NaCl
 - 100 µl Probe (Eluat der Filter) bzw. Standard-Endotoxin
 - 100 µl heparinisiertes Blut

- Bestimmung der nicht-endotoxinbedingten proinfl. Aktivität:
 - 890 µl NaCl
 - 10 µl Polymyxin B (5 µg/ml)
 - 100 µl Probe (Eluat der Filter)
 - 100 µl heparinisiertes Blut

bzw. 895 µl NaCl

5 µl Endotoxin Neutralizing Protein (0,5 µg/ml)

100 µl Probe (Eluat der Filter)

100 µl heparinisiertes Blut

- Spike

Um das Auftreten einer Hemmung der Interleukinbildung während der Inkubationsphase durch Probeninhaltsstoffe feststellen zu können, sind alle Verdünnungen mit einer definierten Menge CSE („Spike“) zu versetzen. Hierfür werden 100 µl der CSE-Lösung mit einer Aktivität von 1,0 EU/ml verwendet. Es ergibt sich daraus folgender Probenansatz mit Spike:

800 µl NaCl

100 µl CSE mit einer Aktivität von 1,0 EU/ml

100 µl Probe (Eluat der Filter)

100 µl heparinisiertes Blut

- Inkubation
 - Reaktionsgefäße 5x vorsichtig schwenken
 - 22 h bei 37°C inkubieren
 - nach Inkubation Reaktionsgefäße erneut 5x vorsichtig schwenken
 - Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 min
 - Überstände aliquotieren und bei -75°C bis zu den ELISA-Untersuchungen lagern

- Sterilkontrolle
 - je 1 x 100 µl des Überstandes auf Standard-I-Agar und DG-18-Agar ausstreichen und bei 37°C für 48 h bzw. 96 h inkubieren

ELISA zum Nachweis von Entzündungsmediatoren:

Die Bewertung des entzündungsauslösenden Potentials der Proben erfolgt über die Quantifizierung der während der Vollblutinkubation freigesetzten IL-1 β - bzw. IL-6-Menge.

ELISA zum Nachweis von IL-1 β :

Verwendete Materialien:

Coating-Antikörper:	Anti-Human IL-1 β , Mouse IgG (Pierce-Endogen, Rockford, Best.Nr.: M421BE): 1 µg/ml Arbeitskonzentration (pro Platte 5,5 µl AK in 5,5 ml Coating-Puffer); 50 µl/well
Coating Buffer:	0,03 M NaCO ₃ + 0,068 M NaHCO ₃ , pH 9,4-9,8
Tracer-Antikörper:	Anti-Human IL-1 β Monoclonal Antibody, Biotin-labeled (Pierce-Endogen, Best.Nr.: M420BB): 0,1 µg/ml in PBS / 3%BSA, 50 µl/well
Blockpuffer:	PBS / 3% BSA pH 7,0; 200 µl/well
Standard:	Rekombinant Human IL-1 β (Pierce-Endogen) in PBS / 3% BSA verdünnen (Standard 1: 5 ng/ml, Standard 2: 1667 pg/ml, Standard 3: 556 pg/ml, Standard 4: 185 pg/ml, Standard 5: 62 pg/ml, Standard 6: 20 pg/ml, Standard 7: 7 pg/ml); 50 µl/well
Waschpuffer:	PBS (Oxoid) pH 7,0 / 0,02% Tween 20 (Serva, Heidelberg)
Conjugat:	Peroxidase-conjugated Streptavidin (POD, Dianova); 50 ng/ml in PBS / 3% BSA; 100 µl/well
Substrat:	TMB (Seramun, Wolzig); 100 µl/well
Stopplösung:	1 M H ₂ SO ₄ ; 50 µl/well
Reader:	Filter 405 nm, 690 nm, einschließlich Software und Drucker
ELISA-Platte:	96 well, Nunc-Immuno-Platte, Maxi Sorp surface

Die Mikrotiterplatte wird mit monoklonalen Antikörpern (Coating-AK) gegen Interleukin 1- β beschichtet (1. AK) und abgedeckt. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wird der Platteninhalt abgekippt, die Platte ausgeklopft und für 2 h mit PBS / 3% BSA blockiert. Anschließend werden nach 2x Waschen je 50 µl von den Kontrollen und den Überständen der Vollblutstimulation (Antigen) in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert; diese reagieren dann mit dem Coating-AK. Nach sofortiger Zugabe des 2. Antikörpers (Tracer-AK) kann sich während einer anschließenden Inkubation (2 h, abgedeckt bei Raumtemperatur) ein Sandwich-Komplex aus dem 1. AK, dem Antigen und dem 2. AK bilden. Nach 6x Waschen wird das POD als Enzymmarkierung hinzu gegeben und wiederum für 30 min bei RT inkubiert. Nun werden die Überschüsse durch 8x Waschen entfernt, durch Zugabe des

TMB-Substrates beginnt die Bildung des farbigen Endprodukts. 1M Schwefelsäure nach 20-30 min dient als Stopplösung.

ELISA zum Nachweis von IL-6:

Verwendete Materialien:

Coating-Antikörper:	Anti-Human IL-6 Monoclonal Antibody, Purified, (Pierce-Endogen, Best.Nr.: M620E), 1 µg/ml Arbeitskonzentration; 100 µl/well
Coating-Buffer:	PBS pH 7,4
Tracer-Antikörper:	Anti-Human IL-6 Monoclonal Antibody, Biotin-labeled (Pierce-Endogen, Best.Nr.: M621B), 0,1 µg/ml Arbeitskonzentration in PBS / 4% BSA; 50 µl/well
Blockpuffer:	PBS / 4% BSA, 5% Saccharose, 200 µl/well
Standard:	Recombinant Human IL-6 (Pierce-Endogen) in PBS / 4%BSA verdünnen (Standard 1: 1000 pg/ml , Standard 2: 500 pg/ml, Standard 3: 250 pg/ml, Standard 4: 125 pg/ml, Standard 5: 62,5 pg/ml, Standard 6: 31,25 pg/ml, Standard 7: 15,6 pg/ml); 50 µl/well
Waschpuffer:	PBS pH 7,4 / 0,05% Tween 20
Conjugat:	POD, 50 ng/ml in PBS / 4% BSA; 100 µl/well
Substrat:	TMB; 100 µl/well
Stopplösung:	0,18 M H ₂ SO ₄ ; 50 µl/well
Reader:	Filter 405 nm, 690 nm, einschließlich Software und Drucker
ELISA-Platte:	96 well, Nunc-Immuno-Platte, Maxi Sorp surface

Die Mikrotiterplatte wird mit dem Coating-AK beschichtet, abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach dem Entleeren und Ausklopfen der Platte wird diese für 1 h mit dem Blockpuffer (PBS / 4% BSA) blockiert. Nach wiederum Abkippen und Ausklopfen werden die Kontrollen und die Überstände der Vollblutstimulation pipettiert und für 1h abgedeckt inkubiert. Nach 3x Waschen erfolgt die Zugabe des Tracer-AK und die Inkubation für 1 h bei RT, wobei sich die Antikörper mit den IL-6-Fieber-Signalstoffen (Antigen) verbinden und einen Komplex bilden, welcher nach Entfernen der Überschüsse durch 3x Waschen mit POD enzymmarkiert wird. Die Platte wird dann für 30 min bei RT stehengelassen, 3x gewaschen und das TMB-Substrat schließlich ebenfalls für 20-30 min inkubiert. Als Stopplösung wird hier 0,18 M Schwefelsäure verwendet.

Bewertung der Ergebnisse des Vollbluttests:

unspezifische Stimulation:

Blut von klinisch gesunden Spendern ist frei von IL-1β. Dieses wird als erfüllt angesehen, wenn die optische Dichte der Vollblutstimulation mit pyrogenfreier physiologischer NaCl nicht das Zweifache der optischen Dichte des Blindwertes des ELISA´s (= Arbeitspuffer; PBS / BSA) überschreitet.

Bestimmung der Aktivität der Proben:

Zuerst wird die Verdünnungsstufe bestimmt, in der die Probe bzw. das CSE noch eine positive Reaktion zeigt. Das CSE bzw. eine Probe wird als positiv bewertet, wenn die optische Dichte der Probe das Dreifache der optischen Dichte der Vollblutstimulation mit pyrogenfreier physiologischer NaCl überschreitet.

Die Aktivität der Probe ergibt sich aus dem Produkt der Verdünnungsstufe der Probe mit gerade noch positiver Reaktion und der endotoxischen Aktivität der Verdünnungsstufe des

CSE mit gerade noch positiver Reaktion. Wenn also zum Beispiel das CSE bei einer Konzentration von 0,5 EU eine gerade noch positive Reaktion zeigt und die Bioaerosolprobe bei der Verdünnungsstufe 1:16 gerade noch positiv reagiert, dann ergibt sich daraus eine Aktivität von $0,5 \times 16 = 8$ EEU/ml.

Die ermittelten Messwerte werden in EEU/ml (Endotoxin Equivalent Units / ml) bzw. nach Umrechnung unter Berücksichtigung von Probenahmevolumen, Lösungsvolumen, in dem die beaufschlagten Filter extrahiert wurden, Luftdurchsatz und Sammelzeit in EEU/m³ angegeben.

Sterilkontrolle:

Proben, in denen nach der Inkubation eine Vermehrung von Mikroorganismen festgestellt wurde, sind nicht zur Auswertung herangezogen worden.

Unspezifische Hemmung:

Eine unspezifische Hemmung der Interleukinbildung kann ausgeschlossen werden, wenn ungespikete Proben der Verdünnungsreihe ein negatives Signal zeigen, die dazugehörigen gespikten Proben aber positiv reagieren. Proben mit unspezifischer Hemmung wurden nicht ausgewertet.

3.3 Bestimmung der Konzentration an Endotoxinen in den Bioaerosolproben

3.3.1 Sammlung der Bioaerosolproben

Die Sammlung der Bioaerosolproben für die Endotoxinbestimmung erfolgte wie unter Punkt 3.2.2.1 beschrieben. Zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration wurden die gleichen Eluate der Filterproben verwendet wie auch für die Bestimmung der gesamt-proinfl. Potenz mittels Vollbluttest.

3.3.2 Bestimmung der Endotoxinkonzentration mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test QCL 1000 (Cambrex / Lonza, Walkersville, Inc., USA, Katalog-Nr.: 50-648U) wurde zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in den Bioaerosolproben verwendet. Dieser Test arbeitet nach dem Prinzip der chromogenen Endpunktmethode. Die Durchführung des Testkits erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Auswertung der ELISA-Platte (96 well Tissue Culture Plate, Cellstar, greiner bio-one) erfolgte am Mikroplate-Reader bei 405 nm.

Der Endotoxingehalt einer Probe wird mit Hilfe einer Eichgeraden (definierte Verdünnungsreihe aus Standard-Endotoxin) bestimmt. Dazu wird bei jeder Probenserie eine neue Standardkurve mit 5 Endotoxinkonzentrationen mitgeführt. Das zu diesem Zweck zu verwendende Control-Standard-Endotoxin (CSE) ist am Referenz-Standard-Endotoxin (RSE) *E.coli*-6 kalibriert und gehört zum Lieferumfang des LAL-Assays. Um Aufschluß über mögliche Hemmung oder Verstärkung der Reaktion durch das Probenmaterial zu erhalten, muß jede Probe zusätzlich unter Zugabe einer definierten Menge Standard-Endotoxin (Interferenzprobe / Spike) gemessen werden. Probenverdünnungen bzw. Zusatz von MgCl₂-Lösung wurden angewendet, um hemmende oder aktivierende Einflüsse zu überwinden (Zimmermann, 1985; Cooper, 1990; Hollander et al., 1993).

Anforderungen an eine erfolgreiche LAL-Testdurchführung sind:

- Standardkurve: Die Linearität der Standardkurve muß über den gesamten Konzentrationsbereich überprüft werden. Der lineare Regressionskoeffizient der berechneten Standardkurve sollte als Absolutwert $\geq 0,980$ sein.
- Kontrollen:
 - o Spike als Positivkontrolle, wobei die Wiederfindungsrate bei $\pm 25\%$ liegen muss, als Spike wurden 4λ verwendet (λ = Endotoxinkonzentration des niedrigsten Standards der definierten Standardkurve)
 - o LAL-Wasser (endotoxinfrei, Acila, Pyroquant Diagnostik GmbH, Walldorf, Deutschland) als Negativkontrolle, diese muss eine Endotoxinaktivität unter $0,05$ EU/ml aufweisen
- Reproduzierbarkeit der Messwerte: Doppelbestimmung, Intra-Assay-Variationskoeffizient $\leq 10\%$

Die ermittelten Messwerte werden in Endotoxin Units (EU) / ml bzw. nach Umrechnung unter Berücksichtigung von Verdünnungsfaktor, Lösungsvolumen, in dem die beaufschlagten Filter extrahiert wurden, Luftdurchsatz und Sammelzeit in EU/m³ angegeben und ausgewertet.

Um die Ergebnisse vom Vollbluttest und LAL-Test miteinander vergleichen zu können, wurde die Aktivität der jeweiligen Probe zur Reaktivität des Standardendotoxins *E.coli* 0111:B4 (Cambrex / Lonza, Walkersville, USA), welches in beiden Testsystemen als Standardendotoxin verwendet wurde, ins Verhältnis gesetzt. Als Bezugsgröße wurde dabei die mittels Vollbluttest bestimmte makrophagenaktivierende Potenz der jeweiligen Proben gewählt. Die Abweichung bei Bewertung der proinflammatorischen Potenz durch den LAL-Test (Überbewertung oder Unterbewertung) wurde als Faktor angegeben (siehe Tabelle 16 im Anhang).

3.4 Bestimmung der Konzentration an luftgetragenen Bakterien in den untersuchten Tierställen

Um die Konzentration an luftgetragenen Bakterien (aerobe Gesamtkoloniezahl, GKZ) zu ermitteln wurde das Impingement unter Verwendung von AGI-30-Impingern (Brachmann et al., 1964) in Anlehnung an die BIA-Arbeitsmappe 9430 (Anonym, 2004^b) angewendet. Beim Impingement wird Luft durch Flüssigkeit gesaugt und dabei in ihr befindliche Partikel (Bakterien, bakterielle Sporen und bakterientragende Partikel) in der Sammelflüssigkeit ausgewaschen. Der AGI-30-Impinger wurde mit 50 ml pyrogenfreiem Wasser bestückt und mit einem Luftdurchsatz von 12,5 l/min über einen Zeitraum von 30 min betrieben. Von den Impingerproben wurden 2 x 100 µl auf Casein-Sojamehlpepton-(CASO)-Agar ausgestrichen, für 48 h bei 37°C kultiviert und schließlich unter Berücksichtigung von der Sammelzeit und des Luftdurchsatzes die aerobe GKZ bestimmt.

3.5 Bestimmung der endotoxinbedingten und nicht-endotoxinbedingten proinflammatorischen Aktivität in potentiellen Quellen für Bioaerosole

Als mögliche Bioaerosolquellen wurden Futter, Kot und Einstreu aus den jeweiligen Tierställen untersucht. Proben dieser Materialien wurden am Tag der Stallluftmessungen gesammelt. Im Labor wurden die Proben in einem endotoxinfreien Glasgefäß bei 50-60°C bis zur Gewichtskonstanz (24-72 h) getrocknet, fein zermörsert bzw. das Heu und Stroh in

kleine Stücke geschnitten und 100 mg der Trockenmasse in 50 ml pyrogenfreiem Wasser extrahiert. Dazu wurden die Materialien 2 h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (22 rpm) geschüttelt und dann die Aktivität der Eluate im Vollbluttest (ohne und mit Zusatz des Endotoxininhibitors) und im LAL-Test, wie in den Kapiteln 3.2.2.2 und 3.3.2 beschrieben, bestimmt.

3.6 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte mit dem Computerprogramm Microsoft Office Excel Version 2003. Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels Statistikprogramm SPSS Version 12.0 durchgeführt.

Die Ergebnisse der zwei Blutspender pro Probe wurden als Mittelwert zusammengefasst und es wurde jeweils die Standardabweichung und die relative Standardabweichung berechnet. Alle weiteren Berechnungen (Mediane, U-Test, Korrelationen u.s.w) wurden mit den Originalmittelwerten durchgeführt, und nur zur grafischen Veranschaulichung wurden die Daten für die Übersichtlichkeit der Darstellung logarithmiert. Bei den dargestellten Streudiagrammen wurde zusätzlich eine Regressionsgleichung mit angegeben. Die als Boxplots dargestellten Verteilungen der Daten beinhalten Median, oberes und unteres Quantil, Minimum, Maximum, Ausreißer und Extremwerte.

Da die Messdaten als nicht normalverteilt zu betrachten sind und aufgrund des geringen Stichprobenumfangs wurde der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test angewendet, um definierte Gruppen miteinander zu vergleichen. Hierfür wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,01$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche zur Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität

4.1.1 Charakterisierung der endotoxinneutralisierenden Eigenschaften von Polymyxin B

4.1.1.1 Ermittlung der optimalen Konzentration von Polymyxin B

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration an Polymyxin B (PB) wurde die Wirkung des Antibiotikums auf *E.coli*-LPS (0111:B4, Sigma-Aldrich, 1 mg/ml bis 1 pg/ml) im Vollbluttest untersucht (siehe Kapitel 3.1.1.1). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass PB zu einer dosisabhängigen Neutralisation der endotoxischen Aktivität im Vollbluttest führte. Bei einer Konzentration des Antibiotikums von 5,0 µg/ml wurde die endotoxische Aktivität um 99% reduziert.

Tabelle 3: Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität von *E.coli*-LPS (0111:B4)

Konzentration an PB (µg/ml)	notwendige Konzentration an <i>E.coli</i> -LPS zur Auslösung einer positiven Reaktion im Vollbluttest (pg/ml)	Reduktion in %
0	10 ²	0
0,1	10 ²	0
1,0	10 ³	90
5,0	10 ⁴	99
50	10 ⁵	99,9

Einfluss von PB auf *Staphylococcus xylosus*:

Um zu prüfen, ob PB exklusiv die proinflammatorische (proinfl.) Aktivität von Endotoxinen neutralisiert, wurde der Einfluss dieses Antibiotikums auf die proinfl. Aktivität von *Staphylococcus xylosus* (*S.xylosus*) Trockensubstanz (TS) im Vollbluttest untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität von *S. xylosus* TS

Konzentration an PB (µg/ml)	notwendige Konzentration an <i>S. xylosus</i> TS zur Auslösung einer positiven Reaktion im Vollbluttest (pg/ml)
0	10 ⁶
0,1	10 ⁶
1,0	10 ⁶
5,0	10 ⁶
50	10 ⁵

Konzentrationen von 0,1 - 5,0 µg/ml PB führten zu keiner Veränderung der proinfl. Aktivität von *S. xylosus*. Bei einer Konzentration von 50,0 µg/ml PB kam es aber zu einer Zunahme der Aktivität. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde für alle weiteren Versuche eine Konzentration von 5,0 µg/ml PB eingesetzt, da diese Konzentration einerseits eine hohe Potenz aufweist, die proinfl. Aktivität von Endotoxinen zu neutralisieren, und andererseits die proinfl. Aktivität von Nicht-Endotoxinen scheinbar unbeeinflusst lässt.

4.1.1.2 Einfluss von PB auf *E.coli* LPS 0113:H10

Um den Einfluss von PB auf die proinfl. Aktivität eines weiteren Endotoxins zu bestimmen, wurde das Control-Standard-Endotoxin (CSE) *E.coli* 0113:H10 (Chromogenix) mit und ohne Zusatz von PB (5,0 µg/ml) auf seine Reaktivität im humanen Vollbluttest untersucht. PB reduzierte die proinfl. Aktivität des CSE um 99,8% (Tabelle 5).

Tabelle 5 : Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität von *E.coli* - LPS 0113:H10

Konzentration an PB (µg/ml)	minimale Konzentration an <i>E.coli</i> -LPS 0113:H10 (pg/ml) zur Auslösung einer positiven Reaktion im Vollbluttest	Reduktion in %
0	10 ²	99,8
5,0	5 x 10 ⁴	

4.1.1.3 Einfluss von PB auf weitere proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine

Um den Einfluss von PB auf die proinfl. Aktivität weiterer Substanzen mit Nicht-Endotoxinstruktur zu prüfen, wurde außerdem die Reaktivität von Quarzpartikeln sowie von den kommerziell erhältlichen β-1,3-D-Glucanen Curdlan und Barley-Glucan im Vollbluttest untersucht. Bei keinem der geprüften Substanzen konnte ein Einfluss von PB (5,0 µg/ml) auf die proinfl. Aktivität im Vollbluttest festgestellt werden.

4.1.1.4 Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen

Um den Einfluss von PB auf die proinfl. Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen zu prüfen, wurde beispielhaft aus einem Schafstall und einem Abkalbestall je eine Probe einatembarer Staub und PM10-Staub mit und ohne Zusatz von PB im Vollbluttest untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die proinfl. Aktivität der Bioaerosolproben durch PB um 83 - 92% reduziert wurde.

Tabelle 6: Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen

Tierstall	Konzentration PB (µg/ml)	proinflammatorische Aktivität in EEU/m ³		Reduktion in %	
		Einatembarer Staub	PM10	Einatembarer Staub	PM10
Schafstall	0	127,0	94,2	90,6	82,7
	5	11,9	16,3		
Abkalbestall	0	476,2	347,8	83,3	91,7
	5	79,4	29,0		

4.1.2 Charakterisierung der endotoxinneutralisierenden Eigenschaften von Endotoxin-Neutralizing-Protein (ENP)

4.1.2.1 Ermittlung der optimalen Konzentration des ENP

Die in Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse zeigen bei einer ENP-Konzentration von 0,5 µg/ml eine Reduktion der proinfl. Aktivität um 90%, die sich auch bei noch höheren ENP-Konzentrationen nicht steigern ließ. Daher wurde für den weiteren Verlauf der Arbeit diese als Arbeitskonzentration gewählt.

Tabelle 7: Einfluss von ENP auf die proinflammatorische Aktivität von *E.coli*-LPS (0111:B4)

Konzentration an ENP (µg/ml)	notwendige Konzentration (pg/ml) an <i>E.coli</i> -LPS zur Auslösung einer positiven Reaktion im Vollbluttest	Reduktion in %
0	10 ³	0
0,5	10 ⁴	90
1,0	10 ⁴	90
5,0	10 ⁴	90

4.1.2.2 Einfluss von ENP auf proinflammatorisch aktive Stoffe außer Endotoxine

Um den Einfluss von ENP auf die proinfl. Aktivität von Substanzen mit Nicht-Endotoxinstruktur zu prüfen, wurden auch hier *S. xylosus* TS, Quarzpartikel sowie kommerziell erhältliche β-1,3-D-Glucane (Curdlan und Barley-Glucan) im Vollbluttest untersucht.

Bei keinem der geprüften Substanzen konnte ein Einfluss von ENP (0,5 µg/ml) auf die proinfl. Aktivität im Vollbluttest festgestellt werden.

4.1.2.3 Einfluss von ENP auf die proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen

Um den Einfluss von ENP auf die proinfl. Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen zu testen, wurden die gleichen Proben wie unter 4.1.1.4 mit und ohne Zusatz von ENP (0,5 µg/ml) im Vollbluttest untersucht.

Anhand der Ergebnisse der Tabelle 8 lässt sich eine Reduktion der proinfl. Aktivität der Bioaerosolproben durch ENP um 33 - 81% verzeichnen.

Tabelle 8: Einfluss von ENP auf die proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen

Tierstall	Konzentration ENP (µg/ml)	proinflammatorische Aktivität in EEU/m ³		Reduktion in %	
		Einatembarer Staub	PM10	Einatembarer Staub	PM10
Schafstall	0	127,0	94,2	81,3	61,6
	0,5	23,8	36,2		
Abkalbestall	0	476,2	347,8	50,0	33,3
	0,5	238,1	231,9		

Aus den vorliegenden Untersuchungen wird deutlich, dass PB und auch ENP in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die proinfl. Aktivität von Quarzpartikeln, grampositiven Bakterien und β-1,3-D-Glucanen wie Curdlan oder Barley-Glucan haben. Hingegen reduzieren beide die proinfl. Aktivität von Endotoxin. Tabelle 9 zeigt die unterschiedlichen Reduktionsraten der proinfl. Aktivität von *E.coli*-Endotoxin und ausgewählten Bioaerosolproben bei Einsatz beider Endotoxininhibitoren auf.

Da PB sowohl die proinfl. Aktivität von Endotoxinen als auch von den untersuchten Bioaerosolproben stärker hemmte als ENP wurde für alle weiteren Versuche (Hauptversuche) ausschließlich PB als Endotoxininhibitor eingesetzt.

Tabelle 9: Prozentuale Reduktion der proinflammatorischen Aktivität von *E.coli*-Endotoxin und Bioaerosolproben bei Einsatz von PB bzw. ENP

Substanz	prozentuale Reduktion der proinflammatorischen Aktivität bei Einsatz von	
	PB	ENP
Endotoxin (<i>E.coli</i> 0111:B4)	99,0%	90,0%
Einatembarer Staub Schafstall	90,6%	81,7%
PM10-Staub Schafstall	82,7%	61,6%
Einatembarer Staub Abkalbestall	83,3%	50,0%
PM10-Staub Abkalbestall	91,7%	33,3%

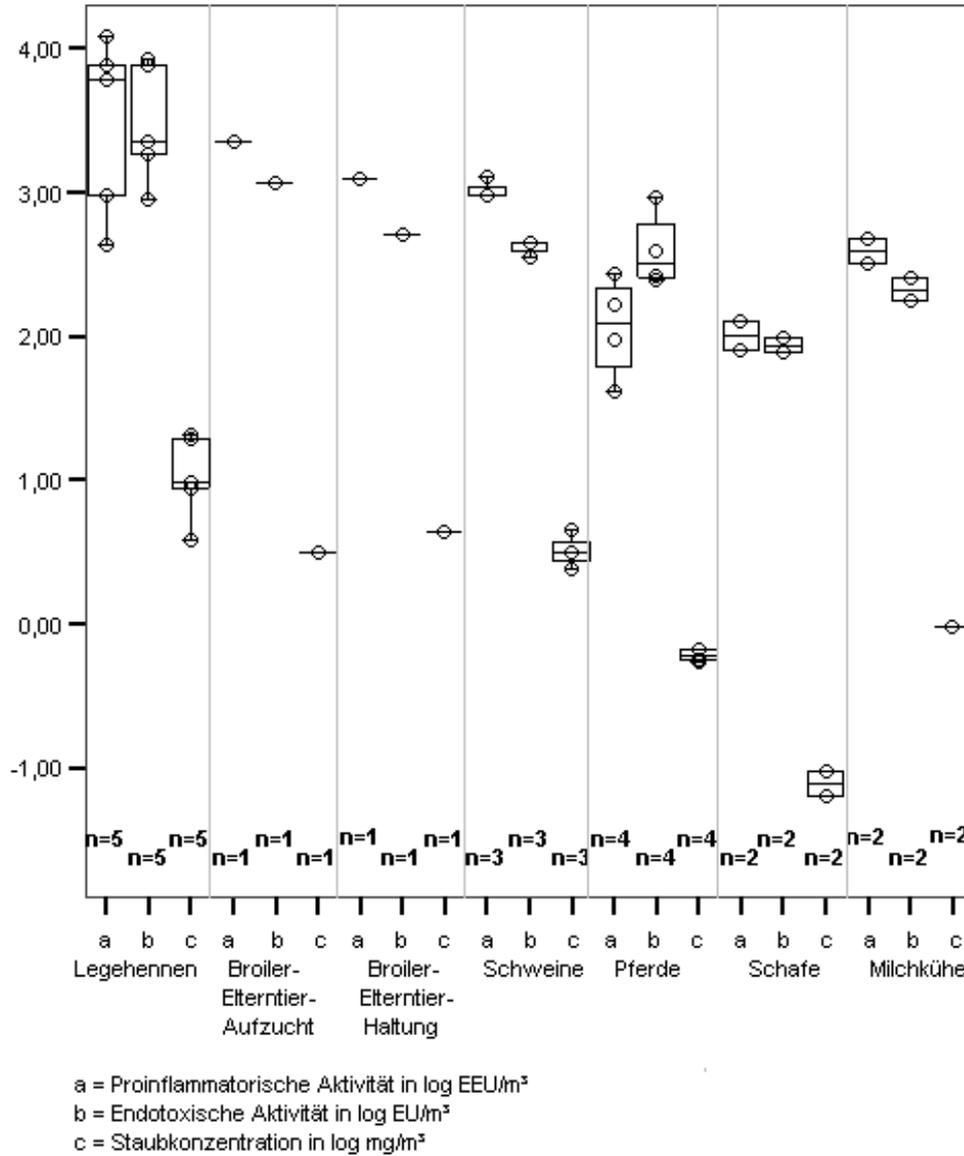
4.2 Hauptversuche zur Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen

4.2.1 Konzentration an luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffen, Endotoxinen, Staub und Bakterien in Bioaerosolen aus den untersuchten Tierställen

Es wurden 13 Tierställe mit insgesamt 7 verschiedenen Nutztierrichtungen beprobt (3 Legehennen-, 1 Broiler-Elterntier-Aufzucht-, 1 Broiler-Elterntier-Haltung-, 3 Schweinemast-, 2 Pferde-, 1 Schaf- und 2 Milchviehställe).

In allen Tierställen wurde die einatembare - bzw. die PM10-Staubfraktion auf Filtern gesammelt und die Konzentration an luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffen und Endotoxinen in diesen Staubfraktionen sowie die Masse dieser Staubfraktionen bestimmt. Die Einzelergebnisse dieser Messungen sind im Anhang (Tabelle 13, 14, 17) dargestellt. In Abbildung 7 und 8 ist die gesamt-proinfl. Aktivität (proinfl. Aktivität ohne Zusatz von PB), die endotoxische Aktivität und die Staubkonzentration der jeweils untersuchten Staubfraktion in den einzelnen Tierställen, zusammengefasst nach Nutzungsrichtungen, in Form von Boxplotgrafiken (mit Darstellung der einzelnen Werte) dargestellt.

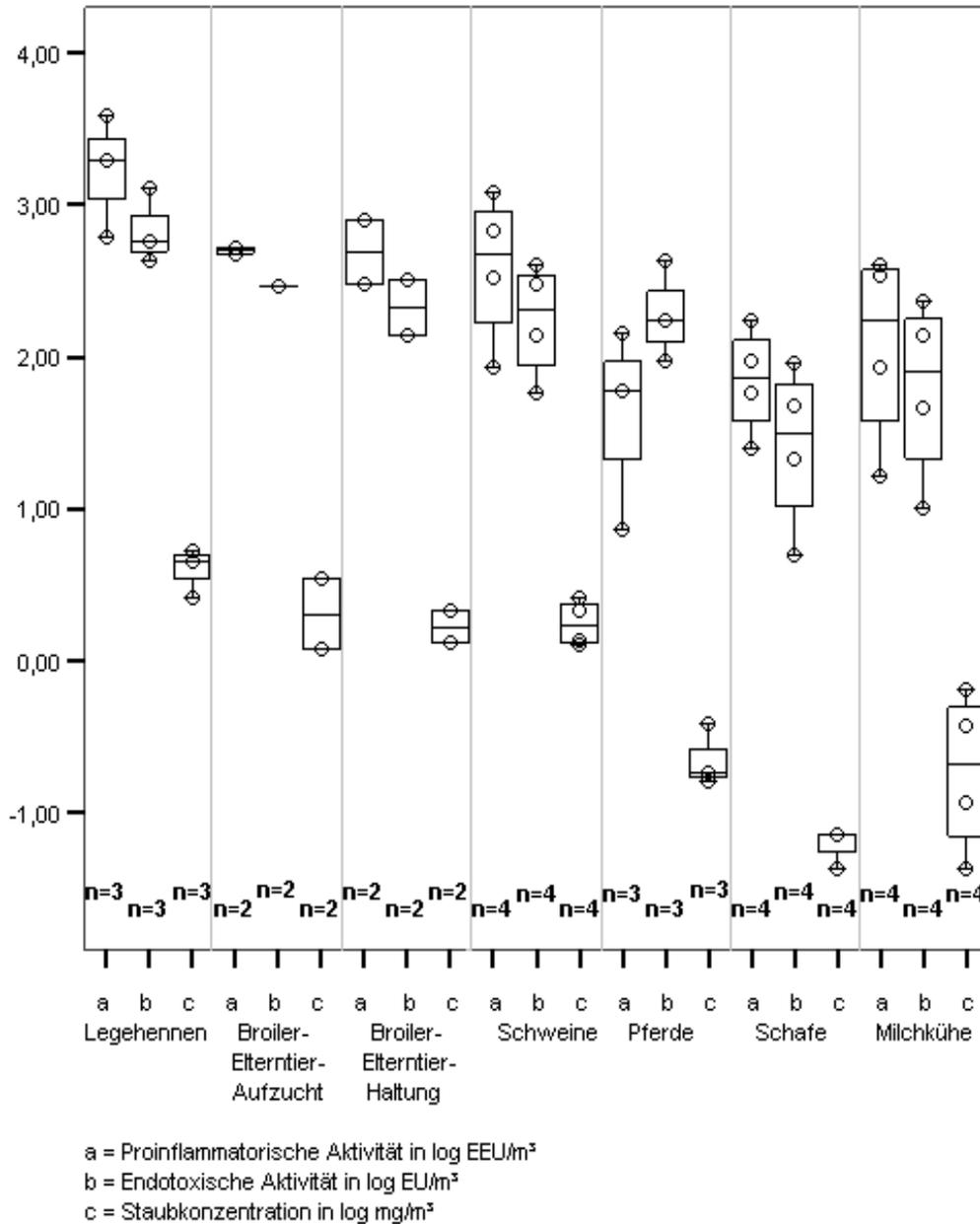
Einatembare Staubfraktion



Nutzungsrichtung

Abb. 7: Konzentration an proinflammatorisch aktiven Stoffen, Endotoxinen und einatembarem Staub in Bioaerosolproben der untersuchten Tierställe, zusammengefasst nach Nutzungsrichtungen, n = Anzahl der Proben

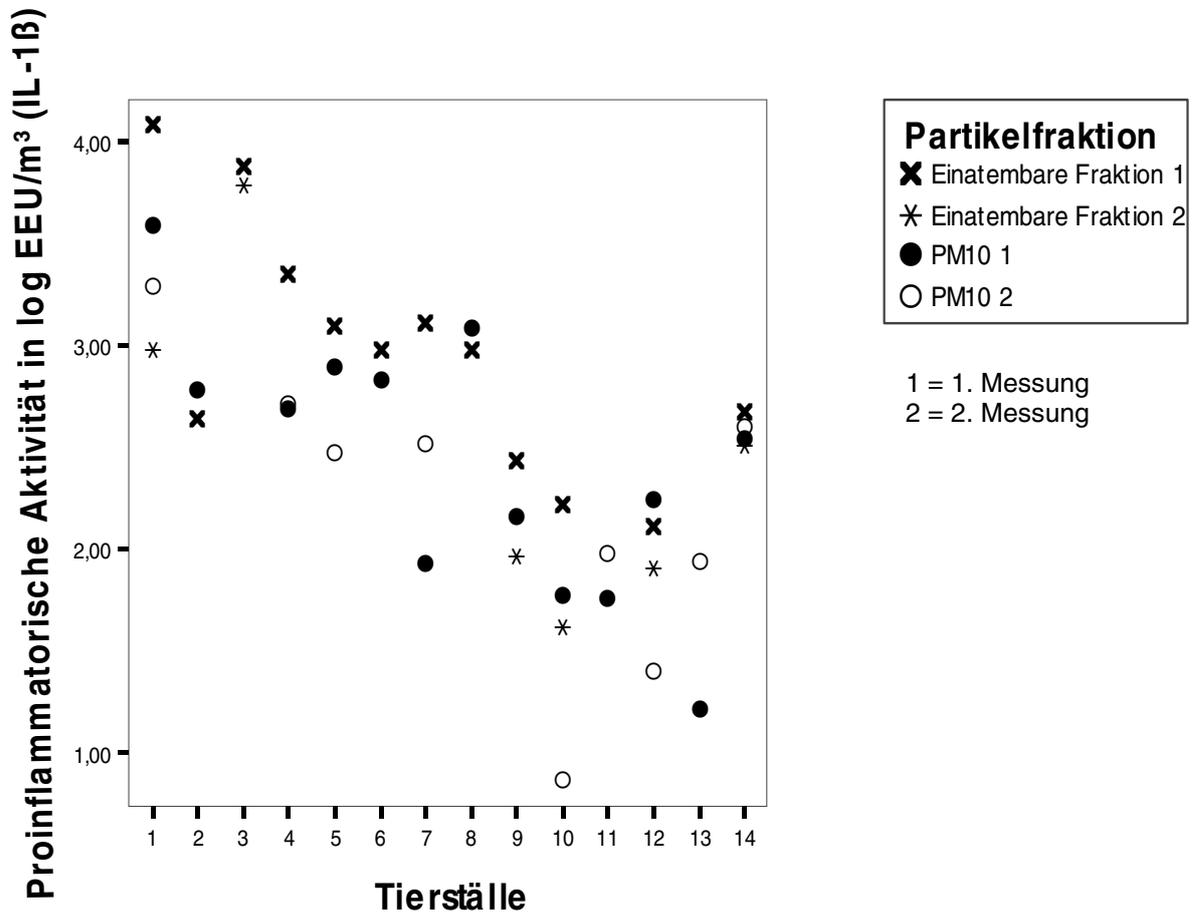
PM10-Staubfraktion



Nutzungsrichtung

Abb. 8: Konzentration an proinflammatorisch aktiven Stoffen, Endotoxinen und PM10-Staub in Bioaerosolproben der untersuchten Tierställe, zusammengefasst nach Nutzungsrichtungen, n = Anzahl der Proben

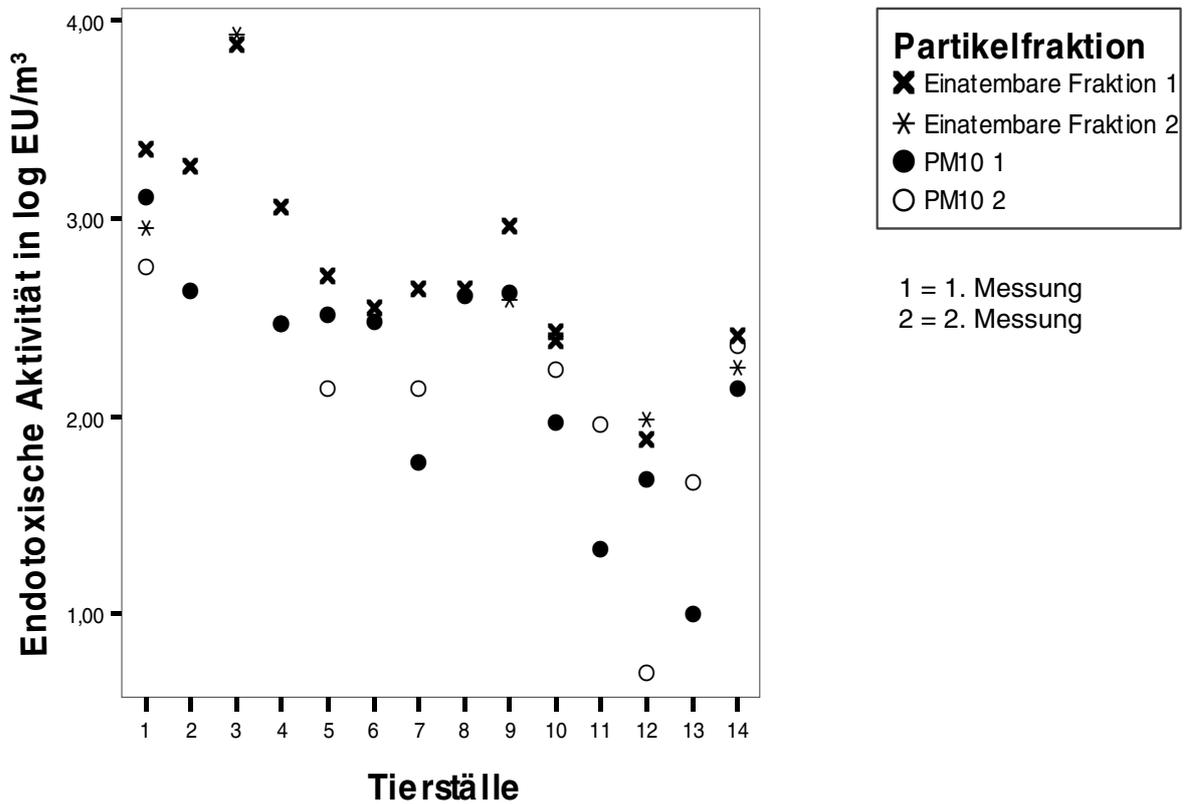
In Abbildung 9 und 10 ist eine Übersicht über die in den untersuchten Tierställen gesammelten Bioaerosolproben (Einatembare Staubfraktion, PM10-Fraktion) und deren proinfl. Aktivität (ermittelt im Vollbluttest) bzw. endotoxische Aktivität (ermittelt im LAL-Test) dargestellt.



Legende Tierställe:

1. Legehennen Stall 1
2. Legehennen Stall 2
3. Legehennen Stall 3
4. Broiler-Elterntier-Aufzucht
5. Broiler-Elterntier-Haltung
6. Schweinemast Stall 1
7. Schweinemast Stall 2
8. Schweinemast Stall 3
9. Pferdestall 1
10. Pferdestall 2
11. Schafe 1. Messung
12. Schafe 2. Messung
13. Milchkühe
14. Hochtragende Milchkühe

Abb. 9: Übersicht über die in den untersuchten Tierställen gesammelten Staubproben und deren proinflammatorische Aktivität



Legende Tierställe:

1. Legehennen Stall 1
2. Legehennen Stall 2
3. Legehennen Stall 3
4. Broiler-Elterntier-Aufzucht
5. Broiler-Elterntier-Haltung
6. Schweinemast Stall 1
7. Schweinemast Stall 2
8. Schweinemast Stall 3
9. Pferdestall 1
10. Pferdestall 2
11. Schafe 1. Messung
12. Schafe 2. Messung
13. Milchkühe
14. Hochtragende Milchkühe

Abb. 10: Übersicht über die in den untersuchten Tierställen gesammelten Staubproben und deren endotoxische Aktivität

Zur Darstellung der Verteilung der Ergebnisse des Vollbluttests und LAL-Tests für die untersuchten Bioaerosolproben wurde die proinfl. Aktivität und die endotoxische Aktivität aller Proben in einer Boxplotgrafik in Abbildung 11 dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass die Werte der endotoxischen Aktivität ($x_{\min}=5,04 \text{ EU/m}^3$, $x_{\max}=8448,50 \text{ EU/m}^3$) weitgehend innerhalb des Boxplots mit den Werten der proinfl. Aktivität ($x_{\min}=7,40 \text{ EEU/m}^3$, $x_{\max}=12093,80 \text{ EEU/m}^3$) liegen. Die Medianwerte beider Boxen liegen nah beieinander. Der Medianwert der proinfl. Aktivität beträgt $375,05 \text{ EEU/m}^3$ ($2,57 \text{ log EEU/m}^3$) und der endotoxischen Aktivität $293,75 \text{ EU/m}^3$ ($2,47 \text{ log EU/m}^3$).

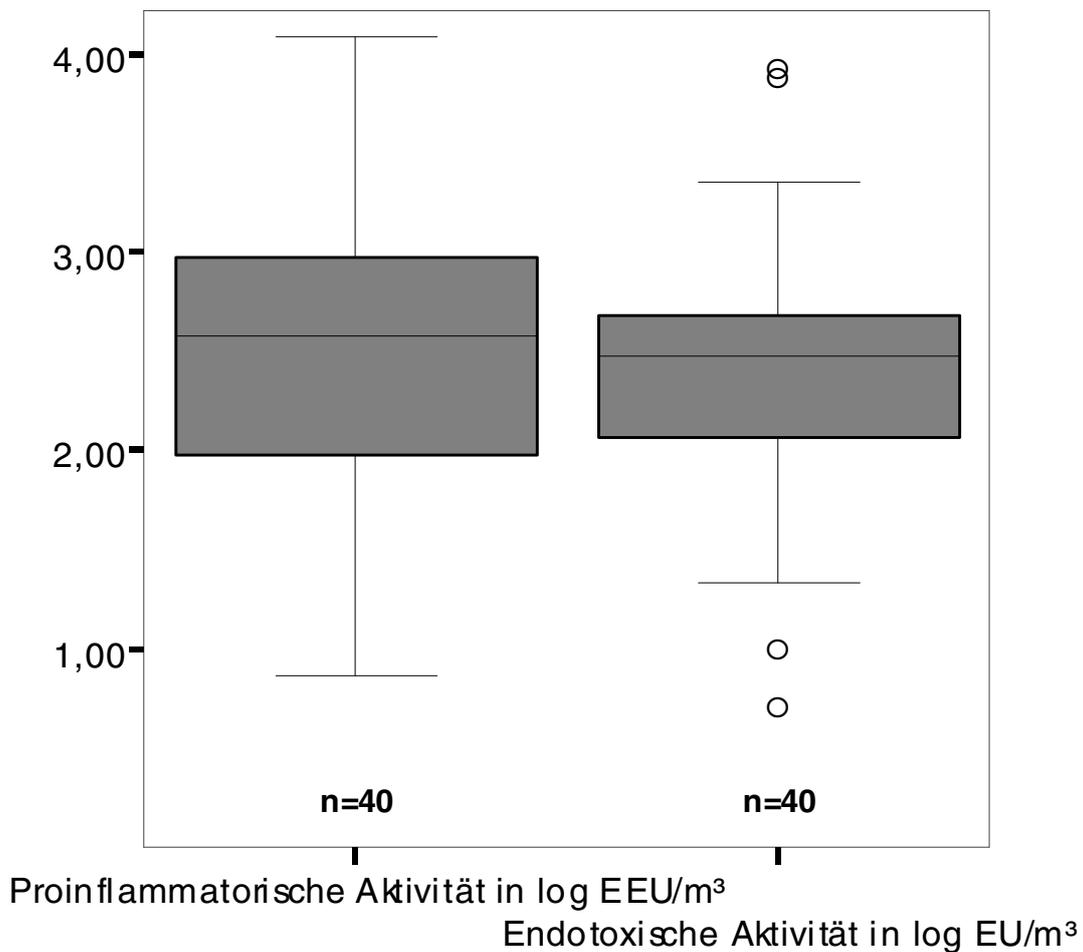


Abb. 11: Verteilung der proinflammatorischen Aktivität und der endotoxischen Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben, n = Anzahl der Proben

Zur Charakterisierung der mikrobiellen Luftbelastung der untersuchten Tierställe wurde mittels Impingement die Konzentration an luftgetragenen aeroben Bakterien (aerobe Gesamtkoloniezahl) bestimmt. Die Einzelergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 18 des Anhangs dargestellt. Abbildung 12 gibt diese Ergebnisse, zusammengefasst nach Nutzungsrichtungen, als Boxplotgrafik mit Angabe der Einzelwerte wieder.

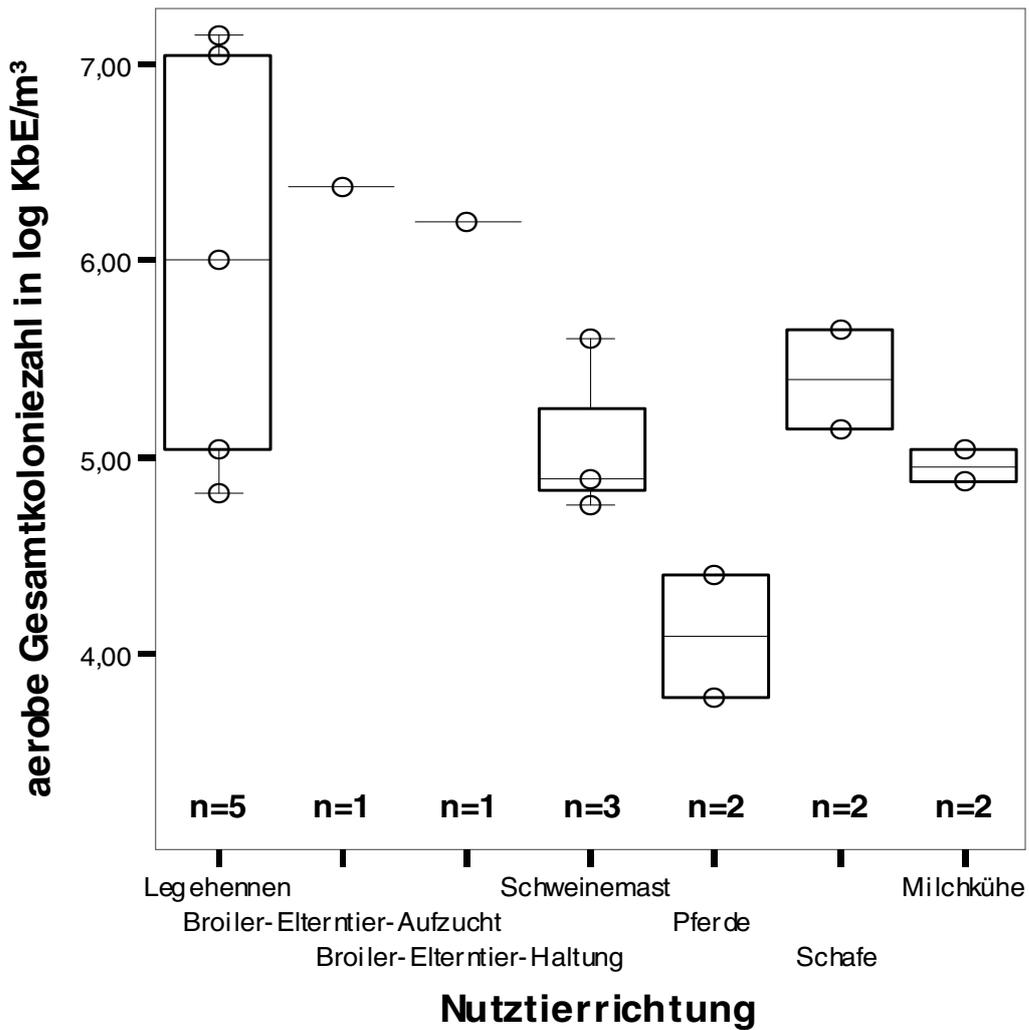


Abb. 12: Konzentration an luftgetragenen Bakterien (aerobe GKZ) in den untersuchten Tierställen, zusammengefasst nach Nutzungsrichtungen, n = Anzahl der Proben

Zusammenfassend lässt sich für diese Untersuchungen feststellen, dass beim Geflügel, und hier vor allem bei den Legehennen (Volierenhaltung mit Einstreu), in der einatembaren Staubfraktion die höchsten Konzentrationen an luftgetragenen proinfl. aktiven Stoffen (435 – 12094 EEU/m³), Endotoxinen (900 – 8450 EU/m³) und Staub (3,81 – 21 mg/m³) gefunden wurden. Auch die aerobe Bakterienzahl wies in den untersuchten Geflügelbetrieben durchschnittlich die höchsten Werte gegenüber den anderen Nutzungsrichtungen auf (6,5x10⁴ – 1,4x10⁷ KbE/m³). Die geringste Belastung an den aufgeführten Luftinhaltsstoffen wurde bei den Pferden und im Schafstall gemessen, mit einer Ausnahme bei den Schafen, hier war die aerobe Bakterienzahl verhältnismäßig hoch (10⁵ KbE/m³) und lag annähernd im Bereich der Werte der Geflügelbetriebe.

4.2.2 Gesamt-proinflammatorische - und nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität in den Bioaerosolproben

Alle untersuchten Bioaerosolproben wurden zusätzlich, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, mit PB vorbehandelt und anschließend deren proinfl. Potential im Vollbluttest bestimmt. In Abbildung 13 ist die proinfl. Aktivität von den untersuchten Bioaerosolproben mit und ohne Zusatz von PB zusammenfassend in einer Boxplotgrafik dargestellt. Die Einzelergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 13 (siehe Anhang) wiedergegeben. Hierbei wird deutlich, dass PB die proinfl. Aktivität aller untersuchten Bioaerosolproben um mindestens 50% reduzierte. Die mittlere Reduktion betrug 86,2%. Der Medianwert für die unbehandelten Proben (= gesamt-proinfl. Aktivität) lag bei 375,1 EEU/m³ (2,57 log EEU/m³), und für die mit PB behandelten Proben (= nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität) wurde ein Medianwert von 51,8 EEU/m³ (1,7 log EEU/m³) ermittelt. Der Mann-Whitney-U-Test ergab für beide Untersuchungsparameter einen signifikanten Gruppenunterschied (p<0,00, α=0,01).

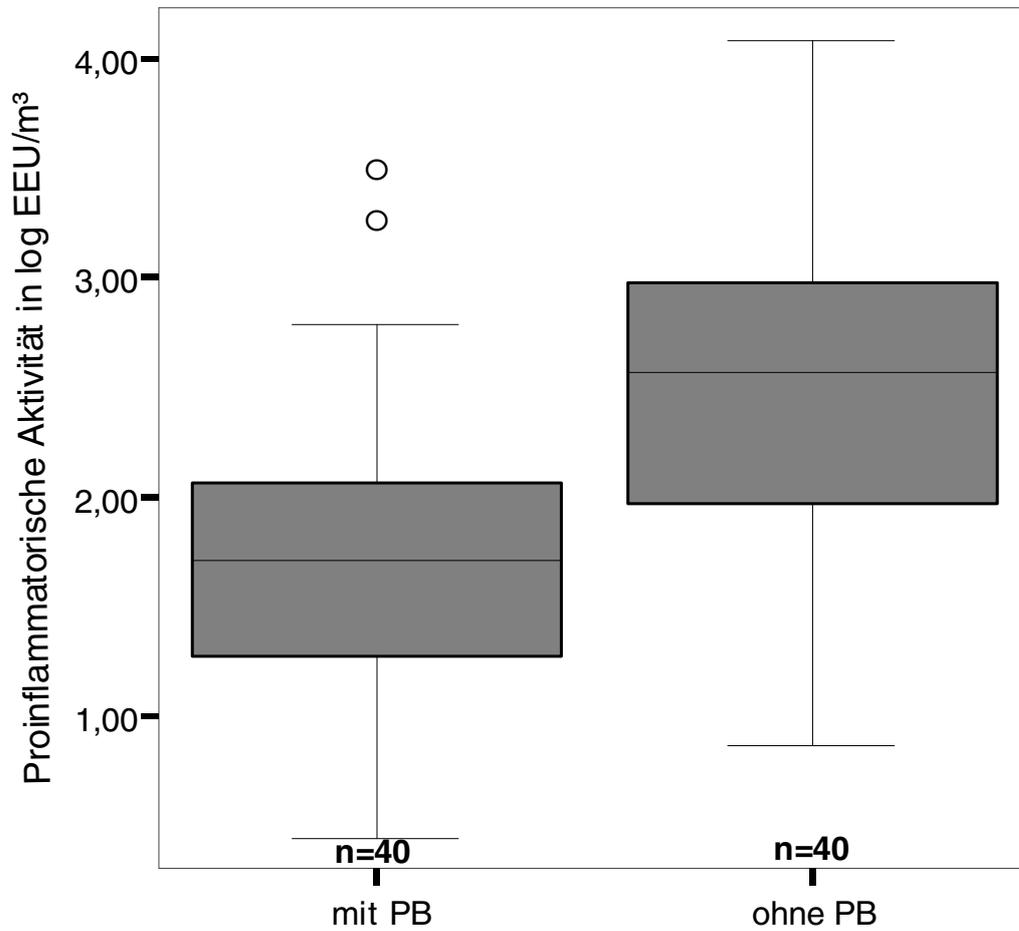


Abb. 13: Einfluss von Polymyxin B (PB) auf die proinflammatorische Aktivität der Bioaerosolproben aus 13 verschiedenen Tierställen, n = Anzahl der Proben
 U-Test: $p < 0,00$, $\alpha = 0,01$

ohne PB = gesamt-proinfl. Aktivität
 mit PB = nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität

4.2.2.1 Beziehungen zwischen gesamt-, endotoxinbedingter- und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität, Staubkonzentration sowie endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben

Die gesamt-proinfl. Aktivität der Bioaerosolproben wurde auf Basis der IL-1 β -Ausschüttung im humanen Vollbluttest ohne Zusatz von PB bestimmt. Die nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität der Proben wurde im Vollbluttest auf Basis der IL-1 β -Ausschüttung nach dem Zusatz von PB bestimmt (IL-1 β +PB) (siehe Tabelle 13 des Anhangs). Die Differenz aus der gesamt-proinfl. und der nicht-endotoxinbedingten proinfl. Aktivität ergab die endotoxinbedingte proinfl. Aktivität (IL-1 β - IL-1 β +PB). Die Staubkonzentration wurde nach Umrechnung des Staubgewichtes auf dem Filter unter Berücksichtigung des Luftdurchsatzes des Sammelgerätes ermittelt (siehe Tabelle 17 des Anhangs). Die endotoxische Aktivität wurde im LAL-Test mittels chromogener Endpunktmethode ermittelt (siehe Tabelle 14 des Anhangs).

Die Beziehungen zwischen endotoxinbedingter proinfl. -, nicht-endotoxinbedingter proinfl. -, gesamt-proinfl. - und endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben wurden mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Hierbei wurden folgende signifikante Korrelationen (Tabelle 10) festgestellt:

Tabelle 10: Beziehungen zwischen den untersuchten Parametern mittels Korrelation nach Spearman

untersuchte Parameter	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau α
endotoxische Aktivität / gesamt-proinfl. Aktivität	0,817	0,01
endotoxische Aktivität / nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,830	0,01
endotoxische Aktivität / endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,799	0,01
gesamt-proinfl. Aktivität / nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,913	0,01
gesamt-proinfl. Aktivität / endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,993	0,01
endotoxinbedingte proinfl. Aktivität / nicht- endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,890	0,01
Staubkonzentration / Endotoxinkonzentration	0,949	0,01

Zur grafischen Veranschaulichung der Beziehungen zwischen den einzelnen Parametern sind die jeweiligen Streudiagramme in den Abbildungen 14 - 19 dargestellt. Hierfür wurden die einzelnen Daten logarithmiert.

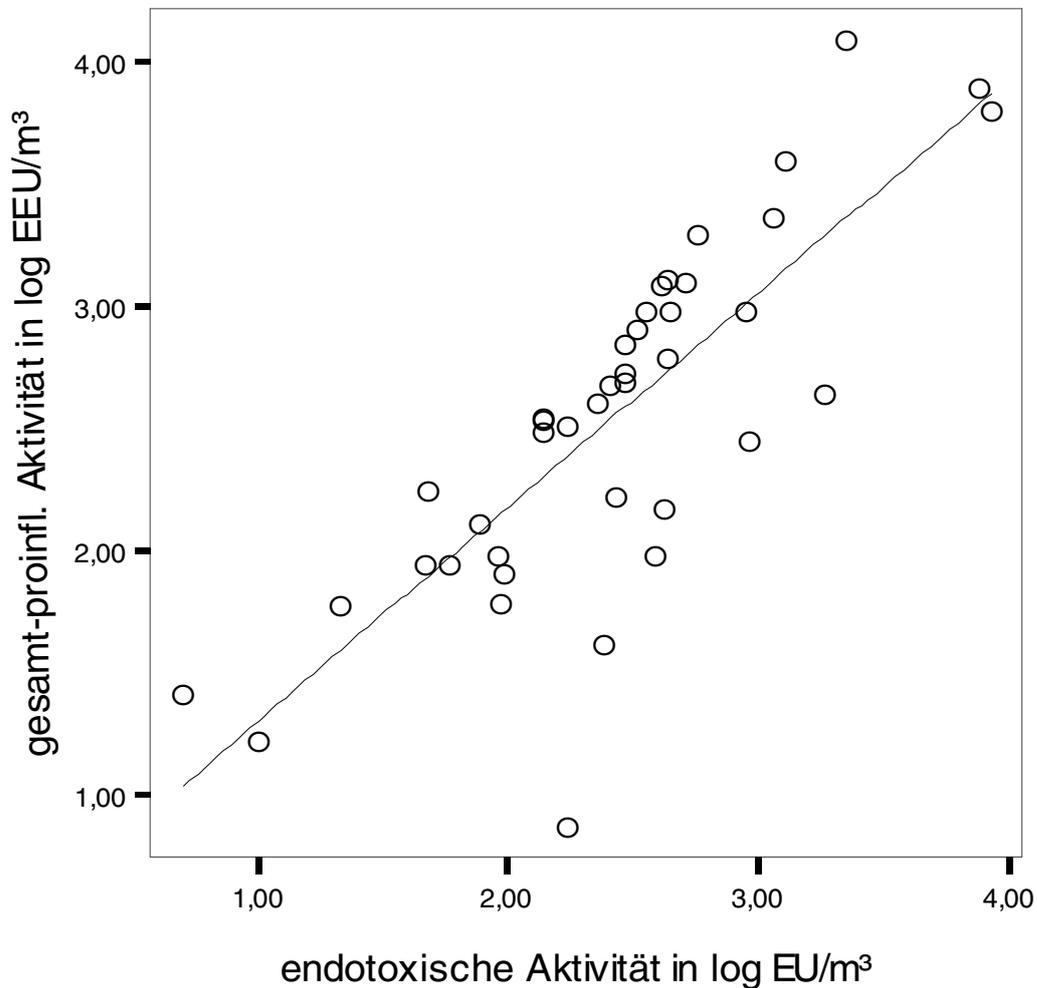


Abb. 14: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehung zwischen der endotoxischen Aktivität (log EU/m³, ermittelt im LAL-Test) und der gesamt-proinfl. Aktivität (IL-1 β , log EEU/m³, ermittelt im Vollbluttest) der untersuchten Bioaerosolproben
Korrelation nach Spearman; $r=0,817$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

$$\text{gesamt-proinfl. Aktivität} = 0,43 + 0,88 \times \text{endotoxische Aktivität}$$

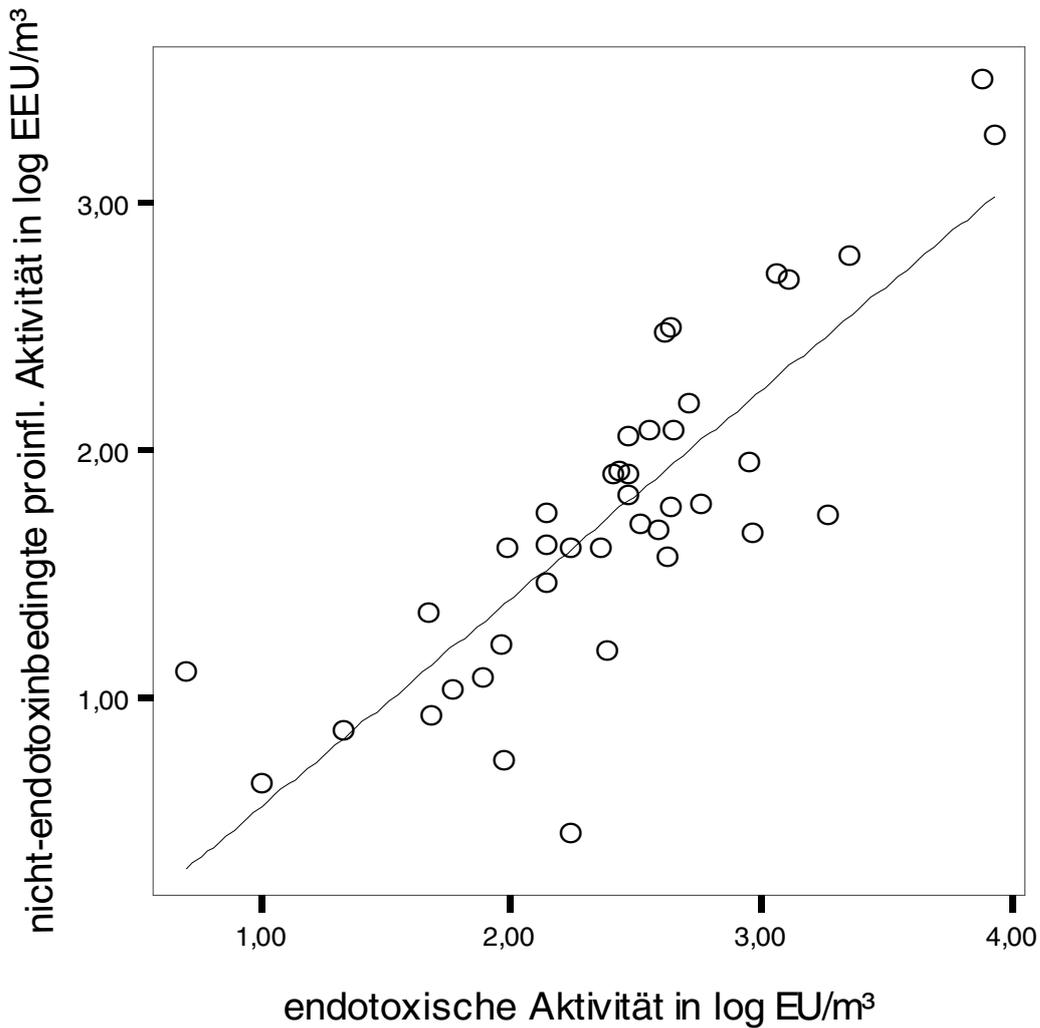


Abb. 15: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehung zwischen der endotoxischen Aktivität ($\log \text{EU}/\text{m}^3$, ermittelt im LAL-Test) und der nicht-endotoxinbedingten proinfl. Aktivität ($\text{IL-1}\beta + \text{PB}$, $\log \text{EEU}/\text{m}^3$, ermittelt im Vollbluttest nach Zusatz von PB) in den untersuchten Bioaerosolproben
Korrelation nach Spearman; $r=0,830$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität = $-0,29 + 0,84 \times \text{endotoxische Aktivität}$

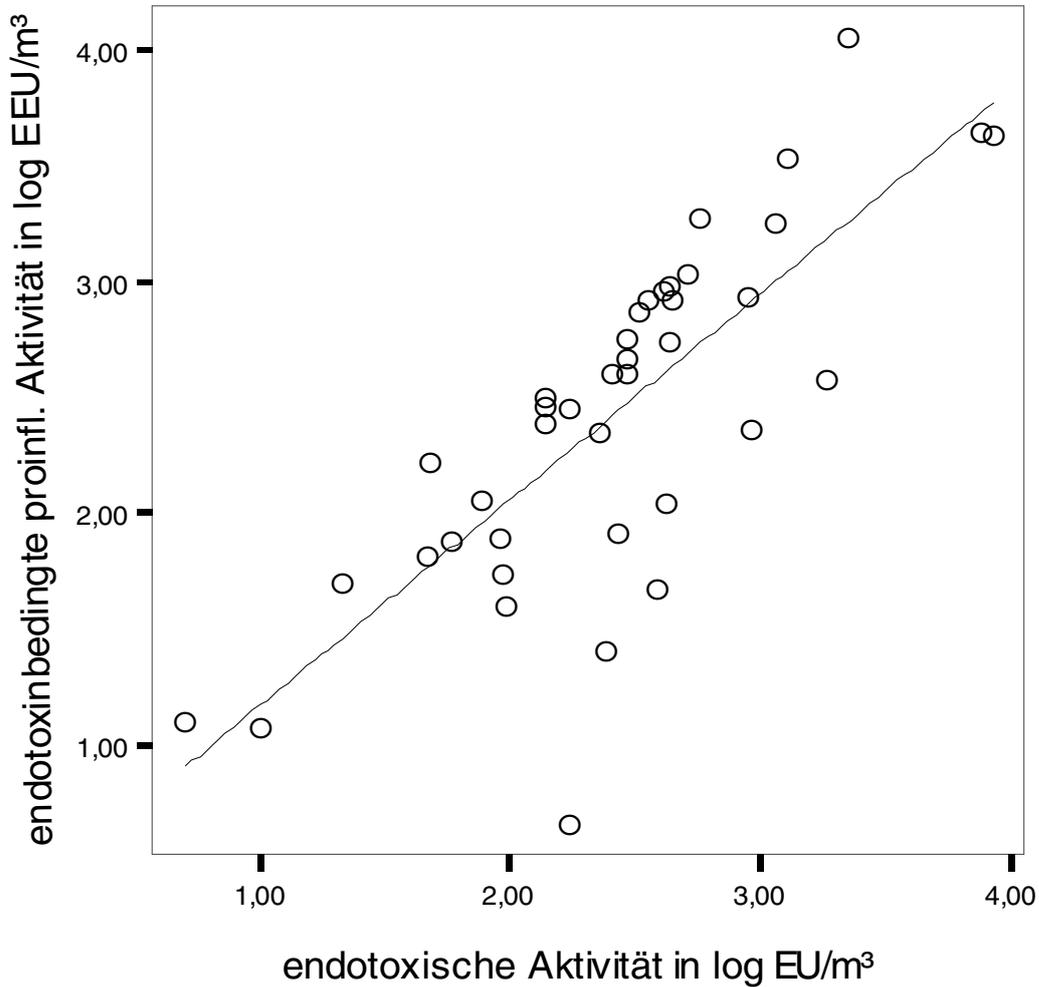


Abb. 16: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehung zwischen der endotoxischen Aktivität (log EU/m³, ermittelt im LAL-Test) und der endotoxinbedingten proinfl. Aktivität (berechnet aus der Differenz von IL-1 β und IL-1 β +PB, log EEU/m³) der untersuchten Bioaerosolproben

Korrelation nach Spearman; $r=0,799$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

endotoxinbedingte proinfl. Aktivität = $0,29+0,89 \times$ endotoxische Aktivität

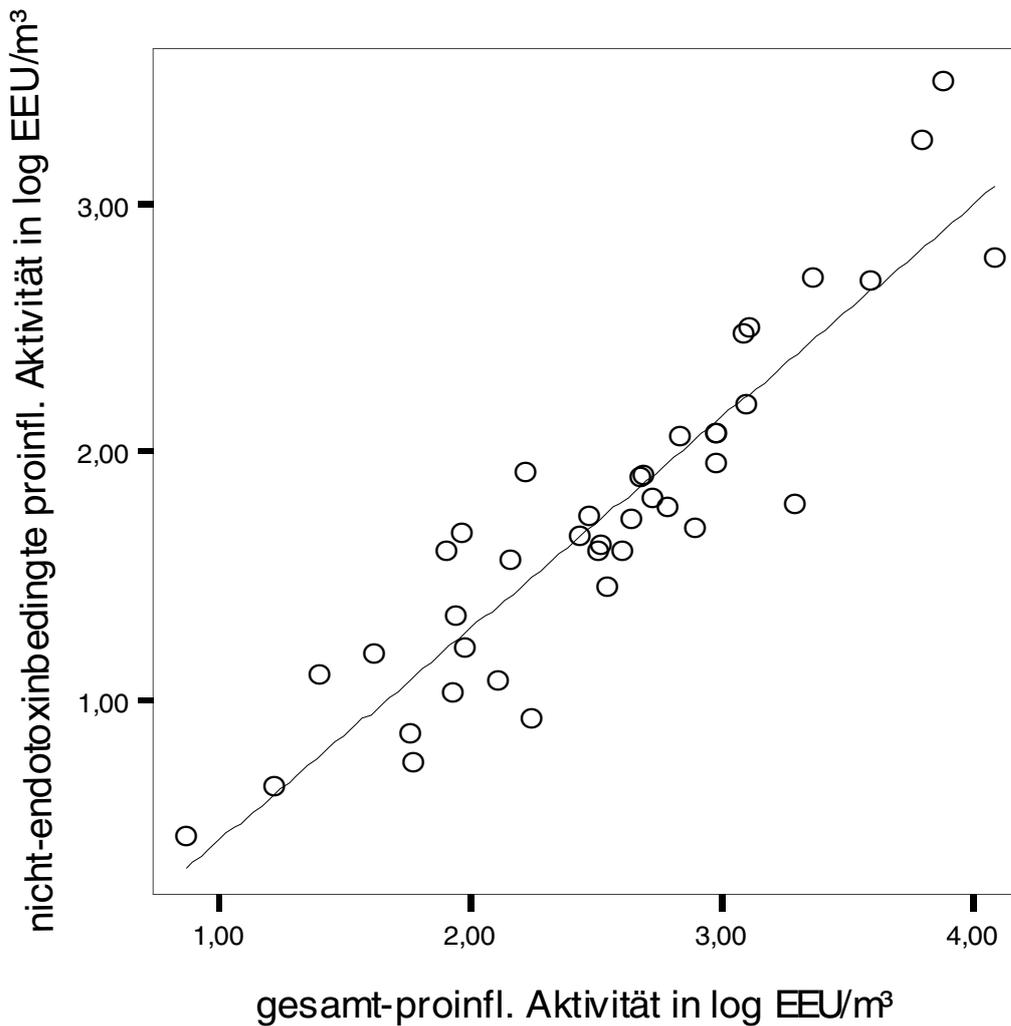


Abb.17: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehung zwischen der gesamt-proinfl. Aktivität (IL-1 β , log EEU/m³, ermittelt im Vollbluttest) und der nicht-endotoxinbedingten proinfl. Aktivität (IL-1 β +PB, log EEU/m³, ermittelt im Vollbluttest) der untersuchten Bioaerosolproben

Korrelation nach Spearman; $r=0,913$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität = $-0,43+0,86 \times$ gesamt-proinfl. Aktivität

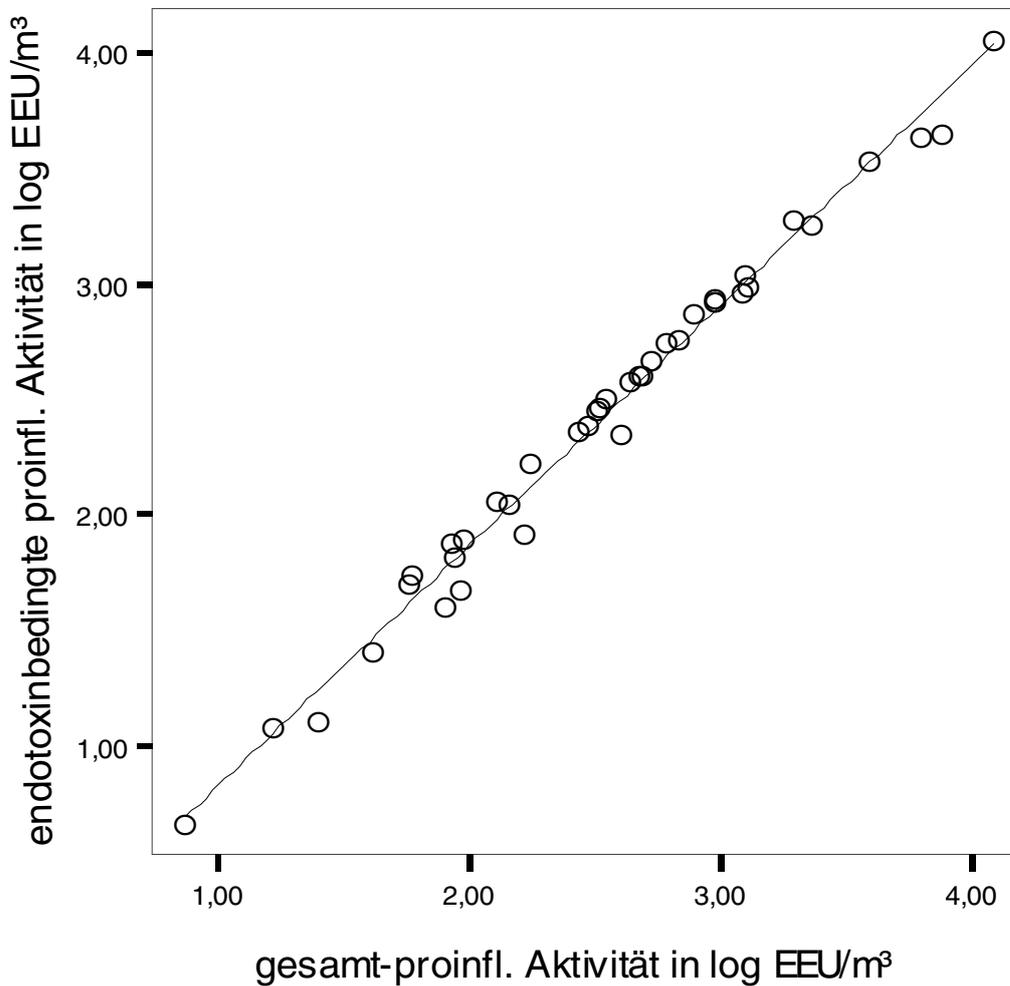


Abb. 18: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehung zwischen der gesamt-proinfl. Aktivität (IL-1 β , log EEU/m³, ermittelt im Vollbluttest) und der endotoxinbedingten proinfl. Aktivität (berechnet aus: IL-1 β – IL1 β +PB, log EEU/m³) der untersuchten Bioaerosolproben

Korrelation nach Spearman; $r=0,993$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

endotoxinbedingte proinfl. Aktivität = $-0,21 + 1,04 \times$ gesamt-proinfl. Aktivität

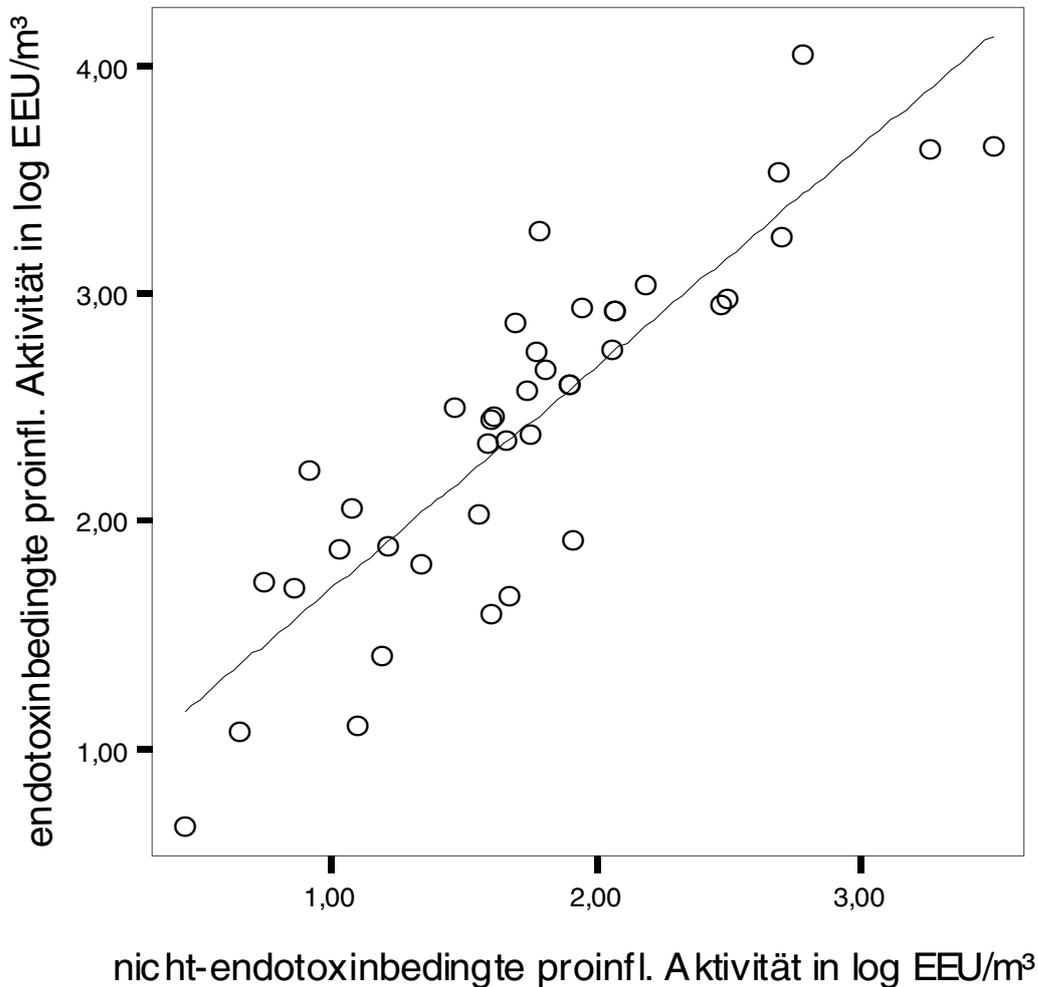


Abb. 19: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehung zwischen der endotoxinbedingten proinfl. Aktivität (berechnet aus: IL-1 β – IL-1 β +PB, log EEU/m³) und der nicht-endotoxinbedingten proinfl. Aktivität (IL-1 β +PB, log EEU/m³, ermittelt im Vollbluttest) der untersuchten Bioaerosolproben
Korrelation nach Spearman; $r=0,890$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

endotoxinbedingte proinfl. Aktivität = $0,74+0,97 \times$ nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität

Weiterhin wurde die Beziehung zwischen der Staubkonzentration und der Endotoxinkonzentration (= endotoxische Aktivität) der Bioaerosolproben mittels Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht (Abbildung 20), und es wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Parametern festgestellt ($r=0,949$, $\alpha=0,01$).

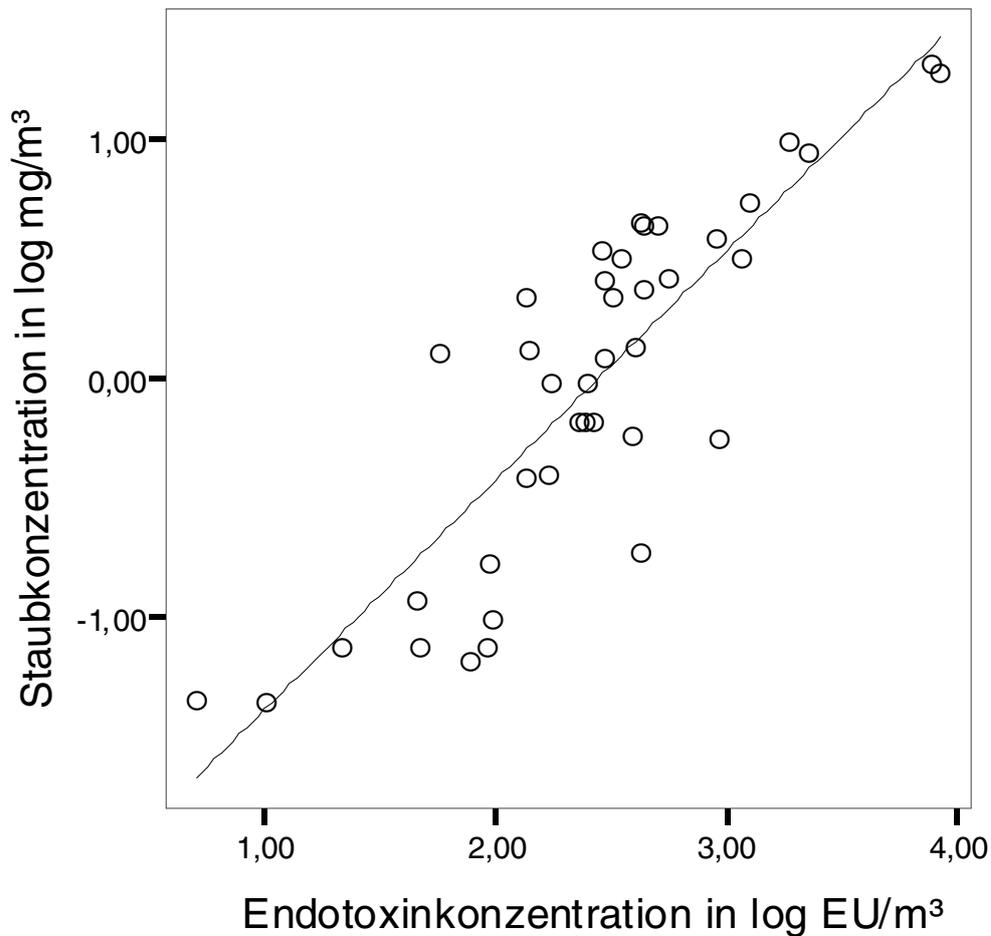


Abb. 20: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehung zwischen der Staubkonzentration ($\log \text{mg/m}^3$) und der Endotoxinkonzentration ($\log \text{EU/m}^3$, ermittelt im LAL-Test) der untersuchten Bioaerosolproben
Korrelation nach Spearman; $r=0,949$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

$$\text{Staubkonzentration} = -2,36 + 0,97 \times \text{Endotoxinkonzentration}$$

4.2.2.2 Vergleich der proinflammatorischen und der endotoxischen Aktivität in den untersuchten Staubfraktionen (Einatembare- und PM10- Staubfraktion)

Um eine Aussage treffen zu können über die proinfl. Aktivitäten in den untersuchten Staubfraktionen wurde die Aktivität der jeweiligen Staubfraktion unter Berücksichtigung von Lösungsvolumen und Staubgewicht auf dem Filter in EEU/mg luftgetragenen Staub berechnet (siehe Tabelle 15 des Anhangs). Anhand der Abbildung 21 wird deutlich, dass die Mediane der PM10-Staubfraktion (491,65 EEU/mg; 2,69 log EEU/mg) und der einatembaren Staubfraktion (325,23 EEU/mg; 2,51 log EEU/mg) relativ nah beieinander liegen. Der U-Test ergab für die beiden Staubfraktionen keinen signifikanten Gruppenunterschied ($p=0,411$, $\alpha=0,01$).

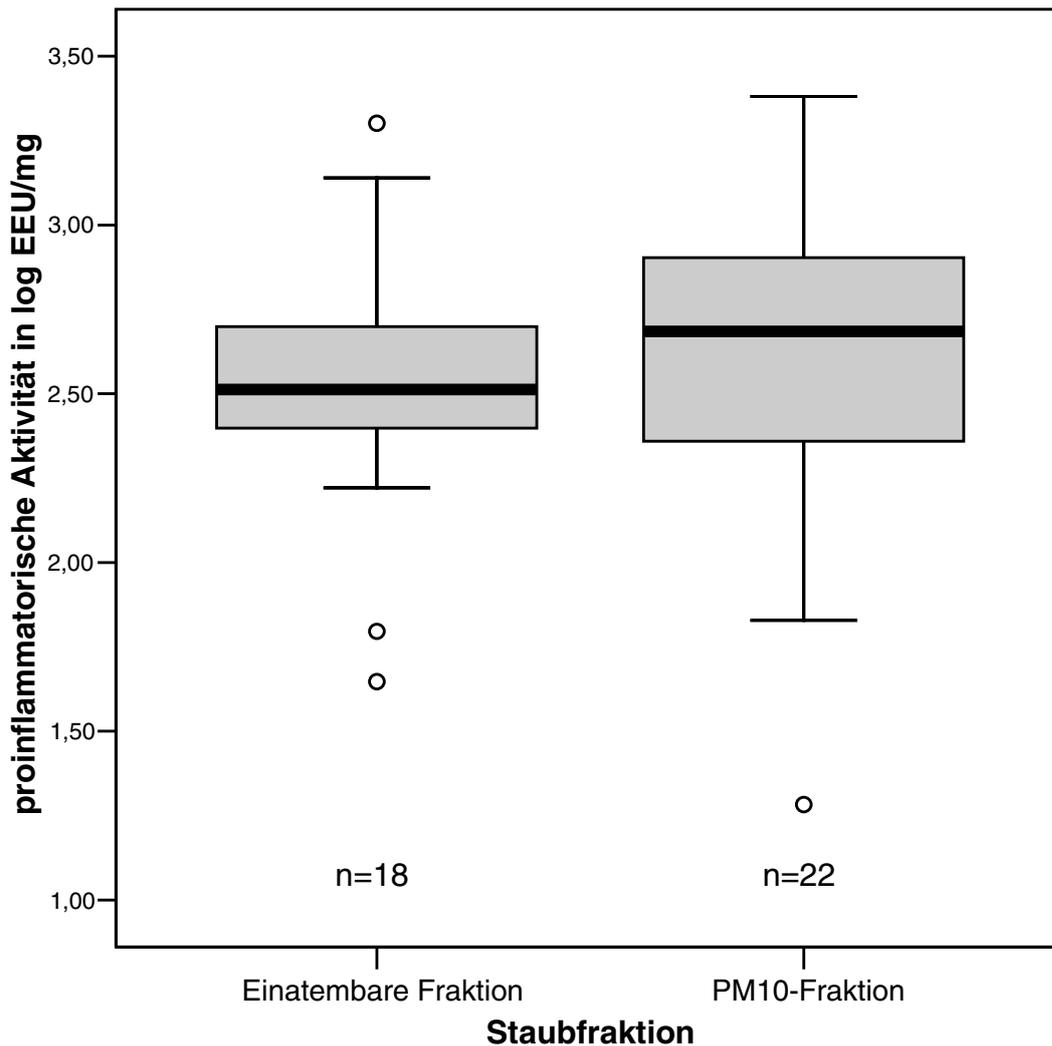


Abb. 21: Vergleich der Verteilung der proinflammatorischen Aktivität (log EEU/mg) in den untersuchten Staubfraktionen, n = Anzahl der Proben, U-Test: $p=0,411$, $\alpha=0,01$

Des Weiteren wurde die endotoxische Aktivität (bestimmt im LAL-Test) pro mg luftgetragenen Staub für die Bioaerosolproben wie oben beschrieben ermittelt (siehe Tabelle 15 des Anhangs), die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Anhand des U-Tests war kein signifikanter Gruppenunterschied für die beiden Staubfraktionen festzustellen ($p=0,527$, $\alpha=0,01$). Hier betrug der Medianwert für die PM10-Staubfraktion 241,34 EU/mg ($2,38 \log$ EU/mg) und für die einatembare Staubfraktion 315,45 EU/mg ($2,5 \log$ EU/mg).

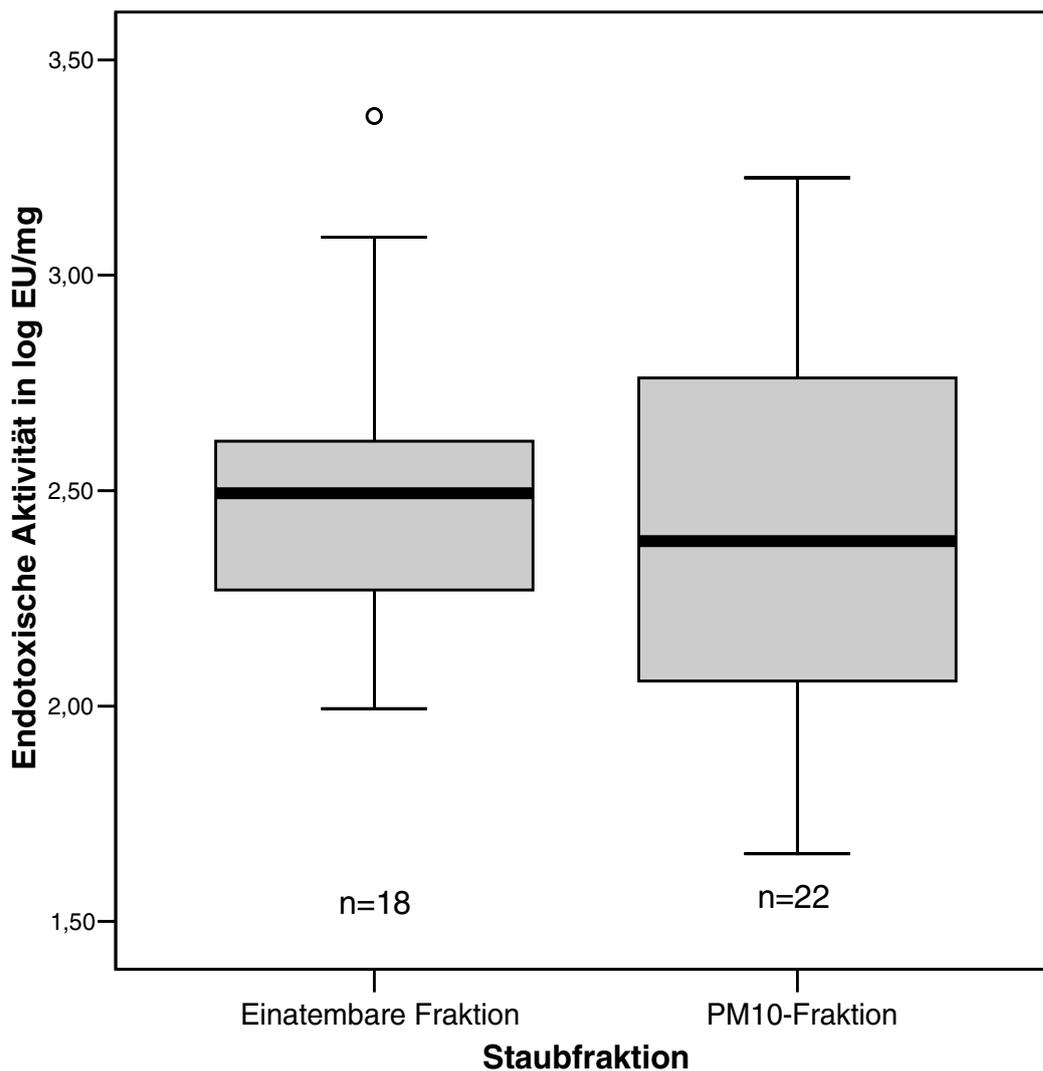
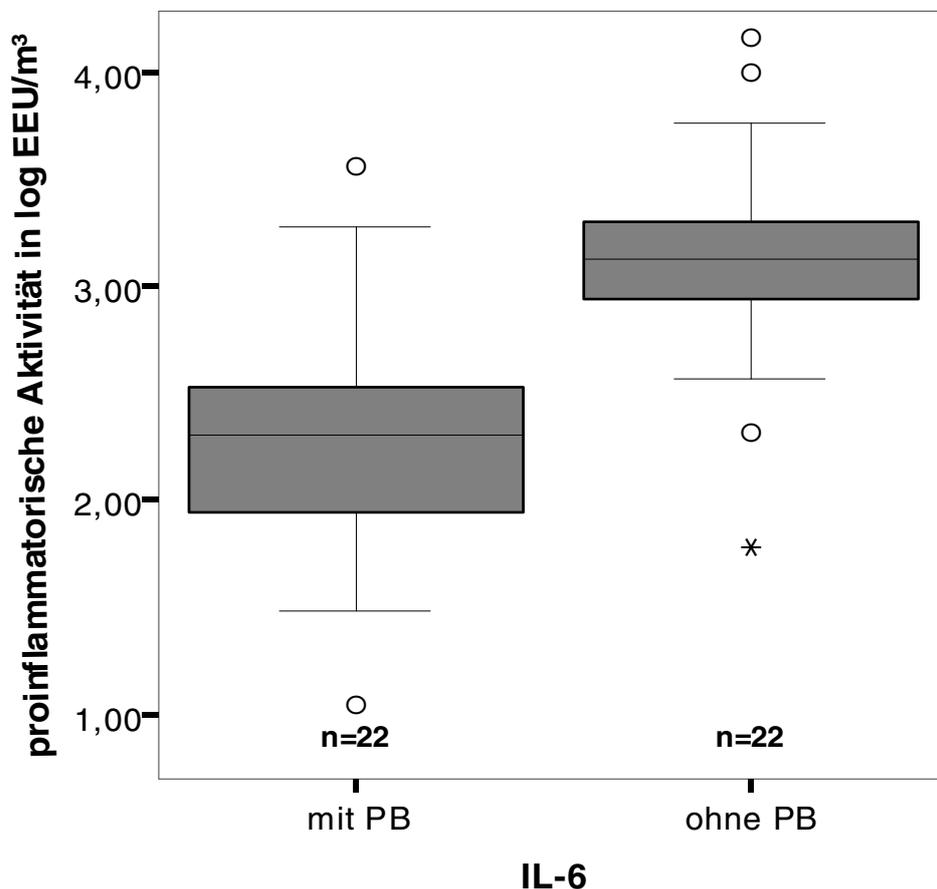


Abb. 22: Vergleich der Verteilung der endotoxischen Aktivität (log EU/mg) in den untersuchten Staubfraktionen, n = Anzahl der Proben
U-Test: $p=0,527$, $\alpha=0,01$

4.2.2.3 Bestimmung der proinflammatorischen Aktivität ausgewählter Bioaerosolproben mittels eines humanen Vollbluttestes auf Basis der IL-6-Aktivität

Zur weiteren Charakterisierung der proinfl. Potenz von Bioaerosolen aus Tierställen wurde von ausgewählten Bioaerosolproben zusätzlich zur IL-1 β - die IL-6-Aktivitätsbestimmung im Vollbluttest durchgeführt. In Abbildung 23 ist die proinfl. Aktivität auf Basis der IL-6-Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben mit und ohne Zusatz von PB zusammenfassend in einer Boxplotgrafik dargestellt. Die Einzelergebnisse dieser Untersuchungen (14 Proben in Geflügelställen, 4 Proben in Schweinemastställen, 4 Proben in Pferdeställen, n = 22) sind in Tabelle 19 (siehe Anhang) wiedergegeben. Hierbei wird deutlich, dass PB die proinfl. Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben um durchschnittlich 84,2% reduzierte. Der Medianwert für die unbehandelten IL-6-Proben betrug 1329,7 EEU/m³ (3,12 log EEU/m³) und für die mit PB behandelten Proben 199,6 EEU/m³ (2,30 log EEU/m³). Der Mann-Whitney-U-Test ergab einen signifikanten Gruppenunterschied (p<0,00, $\alpha=0,01$).



ohne PB = gesamt-proinfl. Aktivität
mit PB = nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität

Abb. 23: Einfluss von PB auf die gesamt-proinfl. Aktivität ausgewählter Bioaerosolproben auf Basis der IL-6-Ausschüttung, n = Anzahl der Proben, U-Test: p<0,00, $\alpha=0,01$

4.2.2.3.1 Beziehungen zwischen der gesamt-proinflammatorischen Aktivität auf Basis der IL-6- und IL-1 β -Aktivitätsbestimmung

Die Beziehungen zwischen der gesamt-proinfl. Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben auf Basis der IL-6- bzw. IL-1 β -Aktivität wurden anhand der Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht und als Streudiagramm in Abbildung 24 dargestellt. Die Korrelation war mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,819 auf dem Niveau von 0,01 zweiseitig signifikant.

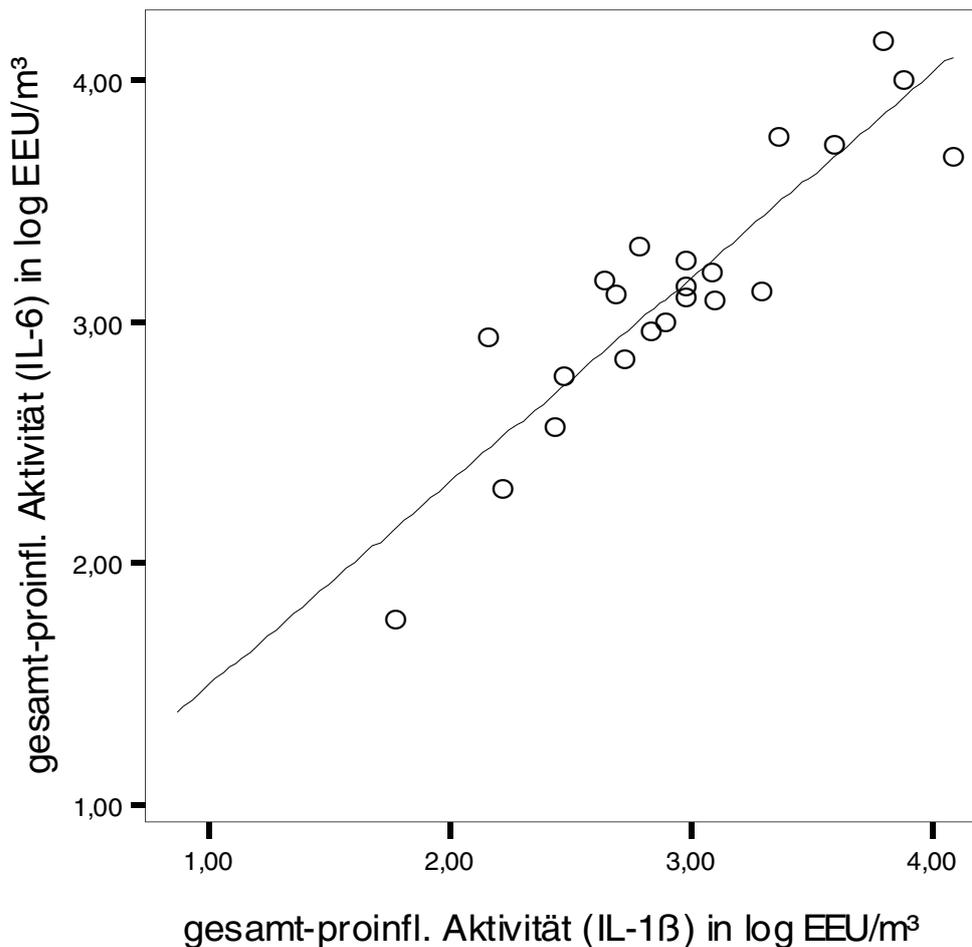


Abb. 24: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehungen zwischen den gesamt-proinfl. Aktivitäten (log EEU/m³, ermittelt im Vollbluttest) auf Basis der IL-1 β - und der IL-6-Aktivität; Korrelation nach Spearman; $r=0,819$, $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:

$$\text{gesamt-proinfl. Aktivität (IL-6)} = 0,65 + 0,85 \times \text{gesamt-proinfl. Aktivität (IL-1}\beta\text{)}$$

4.2.2.3.2 Beziehungen zwischen der endotoxischen Aktivität und der
gesamt-proinflammatorischen Aktivität (IL-6) ausgewählter Bioaerosolproben

Die Beziehung zwischen der endotoxischen Aktivität und der gesamt-proinfl. Aktivität auf Basis der IL-6 Aktivität ist mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Spearman ermittelt worden ($r=0,783$, $\alpha=0,01$) und in einem Streudiagramm in Abbildung 25 dargestellt.

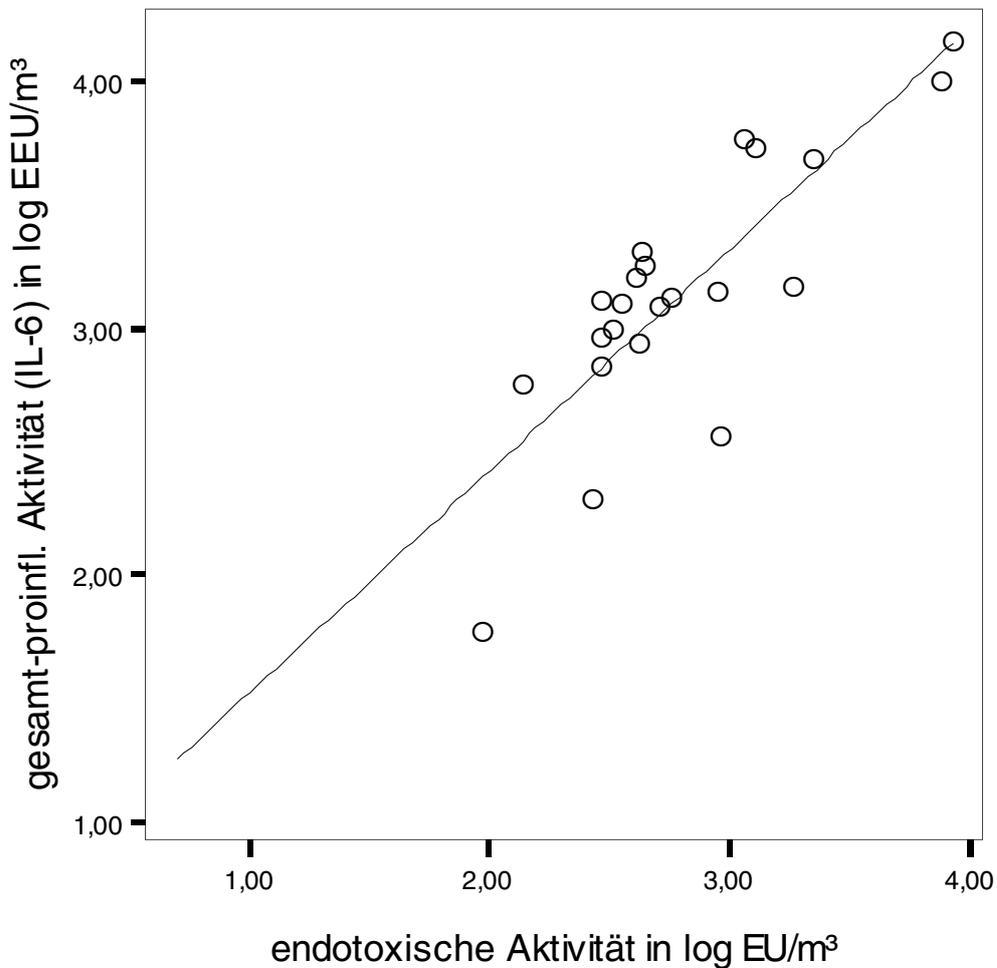


Abb. 25: Streudiagramm mit Regressionsgeraden zur Darstellung der Beziehungen zwischen der endotoxischen Aktivität (log EU/m³, ermittelt im LAL-Test) und der gesamt-proinfl. IL-6-Aktivität (log EEU/m³, ermittelt im Vollbluttest)
Korrelation nach Spearman; $r=0,783$; $\alpha=0,01$

Regressionsgleichung:
gesamt-proinfl. IL-6-Aktivität = $0,62+0,90 \times$ endotoxische Aktivität

4.2.3 Proinflammatorische Aktivität potentieller Bioaerosolquellen aus Tierställen

Zusätzlich zu den Bioaerosolproben wurden auch potentielle Bioaerosolquellen, wie Einstreu, Futter und Kot der Tiere, aus einigen ausgewählten Tierställen untersucht. In Abbildung 26 ist die proinfl. Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen zusammenfassend in einer Boxplotgrafik dargestellt. Hierbei wird deutlich, dass der Kot der Tiere die höchste proinfl. Potenz aufwies mit einem Medianwert von 192 EEU/mg (2,28 log EEU/mg), gefolgt von der Einstreu mit einem Median von 114 EEU/mg (2,06 log EEU/mg). Das untersuchte Futter wies die niedrigste Aktivität auf. Der Medianwert dieser Proben betrug 48 EEU/mg (1,68 log EEU/mg).

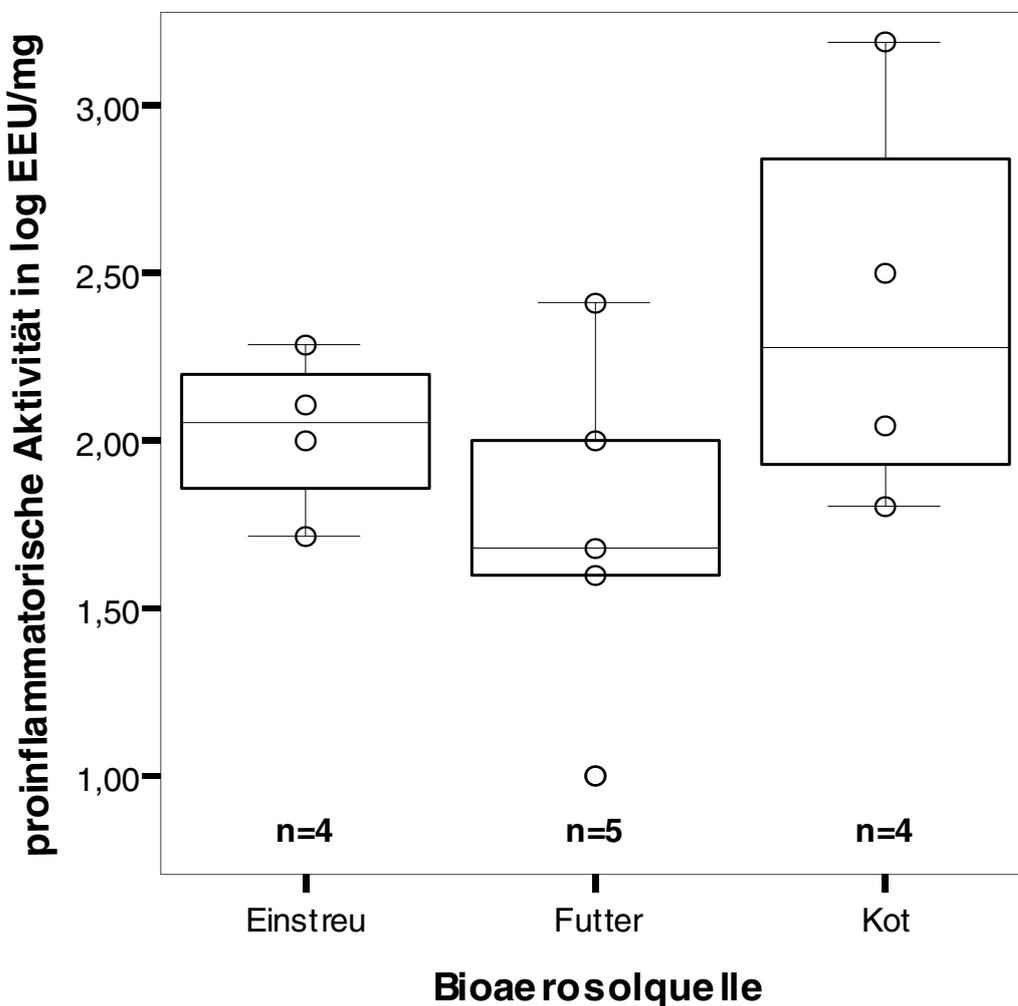
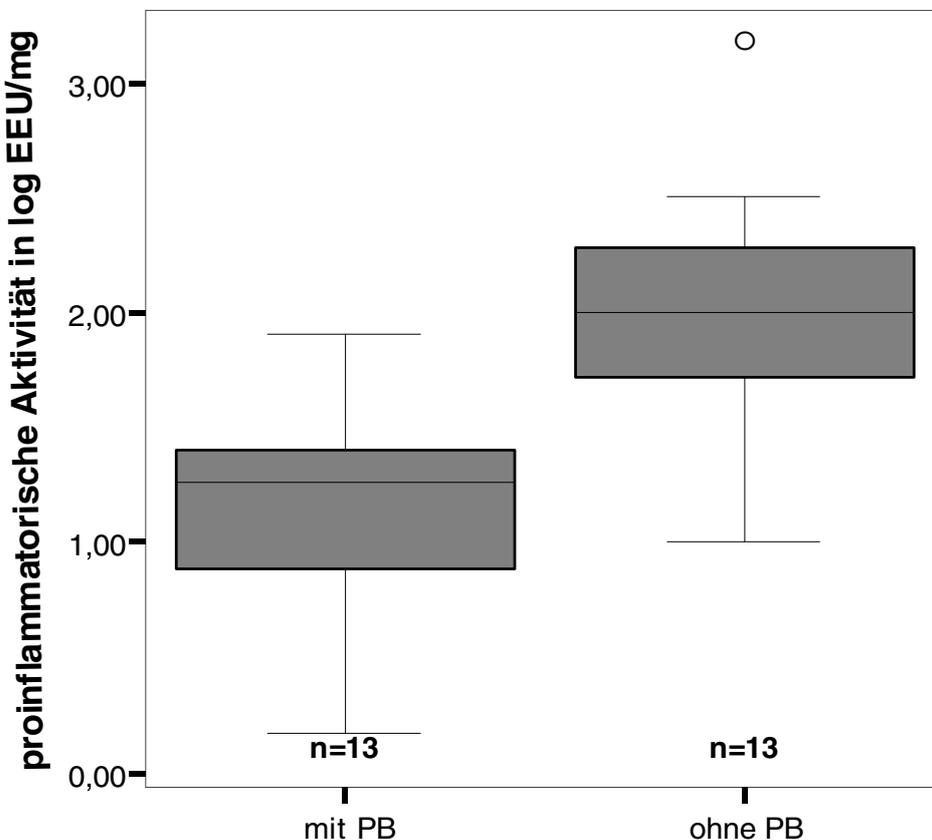


Abb. 26: proinflammatorische Aktivität in log EEU/mg der jeweils untersuchten Bioaerosolquellen aus verschiedenen Tierställen

4.2.3.1 Gesamt-proinflammatorische - und nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen

In Abbildung 27 ist die proinfl. Aktivität von Materialien aus den untersuchten Bioaerosolquellen mit und ohne PB-Zusatz zusammenfassend in einem Boxplot-Diagramm dargestellt. In Tabelle 20 (s. Anhang) sind die Einzelergebnisse aufgeführt (4 Proben aus einem Pferdestall, 3 Proben aus einem Geflügelstall, 3 Proben aus einem Schafstall und 3 Proben aus einem Milchviehstall, $n = 13$).

Bei den untersuchten Materialien konnte eine Reduktion der proinfl. Aktivität durch PB-Zusatz im Mittel um 85% verzeichnet werden. Der Medianwert für die unbehandelten Proben (= gesamt-proinfl. Aktivität) betrug 100 EEU/mg ($2,0 \log \text{ EEU/mg}$) und für die mit PB behandelten Proben (= nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität) 18 EEU/mg ($1,26 \log \text{ EEU/mg}$). Der U-Test ergab einen signifikanten Gruppenunterschied ($p < 0,00$, $\alpha = 0,01$).



ohne PB = gesamt-proinfl. Aktivität

mit PB = nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität

Abb. 27: Einfluss von PB auf die proinflammatorische Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen aus verschiedenen Tierställen ($n=13$, davon 4 Kotproben, 4 Einstreuproben und 5 Futterproben), U-Test: $p < 0,00$, $\alpha = 0,01$

4.2.3.2 Beziehungen zwischen gesamt-proinflammatorischer Aktivität, endotoxinbedingter -, nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität und endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen

Die Beziehungen zwischen endotoxinbedingter proinfl. -, nicht-endotoxinbedingter proinfl. -, gesamt-proinfl. - und endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen wurden mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Die Einzelergebnisse der Messungen sind in Tabelle 20 und 21 des Anhangs aufgelistet.

Es wurden hierbei folgende signifikante Korrelationen erhalten (Tabelle 11):

Tabelle 11: Beziehungen zwischen den einzelnen Parametern bei den untersuchten Bioaerosolquellen mittels Korrelation nach Spearman

untersuchte Parameter	Korrelationskoeffizient r	Signifikanzniveau α
endotoxische Aktivität / gesamt-proinfl. Aktivität	0,580	0,05
endotoxische Aktivität / nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,691	0,01
gesamt-proinfl. Aktivität / nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,596	0,05
endotoxische Aktivität / endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,619	0,05
gesamt-proinfl. Aktivität / endotoxinbedingte proinfl. Aktivität	0,972	0,01

5. Diskussion

5.1 Endotoxinneutralisierende Eigenschaften von Polymyxin B und Endotoxin-Neutralizing-Protein

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit bestand in der Abschätzung des Anteils der endotoxinbedingten proinflammatorischen (proinfl.) Aktivität an der gesamt-proinfl. Aktivität von Bioaerosolen in Tierställen. Hierfür wurden verschiedene endotoxinneutralisierende Substanzen (Polymyxin B (PB) und Endotoxin-Neutralizing-Protein (ENP)) getestet, die idealer Weise folgende Bedingungen erfüllen sollten:

1. möglichst vollständige Inaktivierung der endotoxischen Aktivität in Bioaerosolproben
2. keine Veränderung der proinfl. Aktivität von Substanzen mit Nicht-Endotoxin-Struktur
3. keine eigene proinfl. Aktivität.

Die Vorversuche mit PB zeigten, dass diese Substanz zu einer dosisabhängigen Neutralisation der endotoxischen Aktivität im Vollbluttest führte und bei einer Konzentration von bis zu 5 µg/ml die proinfl. Aktivität von Nicht-Endotoxinsubstanzen (Quarzpartikeln, grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus xylosus* und β -1,3-D-Glucanen wie Curdlan und Barley-Glucan) nicht beeinflusste. Das ENP wies bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml die höchste endotoxinneutralisierende Potenz auf, die sich auch bei Einsatz höherer Konzentrationen nicht mehr steigern ließ. Bei einer Konzentration des ENP von 0,5 µg/ml wurde die proinfl. Aktivität von Nicht-Endotoxinsubstanzen nicht beeinflusst. Alle weiteren Vorversuche mit Bioaerosolproben aus Tierställen wurden deshalb mit oben beschriebener Arbeitskonzentration durchgeführt.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der Vorversuche, dass PB und auch ENP keinen Einfluss auf die proinfl. Aktivität von Quarzpartikeln, grampositiven Bakterien wie *Staphylococcus xylosus* und β -1,3-D-Glucanen wie Curdlan und Barley-Glucan haben. Beide Substanzen reduzierten hingegen die proinfl. Aktivität von *E.coli* Endotoxin um mehr als 90%. Da aber PB sowohl die proinfl. Aktivität von Endotoxinen als auch von ausgewählten Bioaerosolproben stärker hemmte als ENP, wurde für alle weiteren Untersuchungen nur noch PB als Endotoxininhibitor eingesetzt. PB kann somit, wie schon mehrfach in der Literatur beschrieben (Morrison et Jacobs, 1976; Moore et al., 1986; Bucklin et al., 1995), als potenter, spezifischer Endotoxininhibitor angesehen werden.

5.2 Charakterisierung der Belastung der Stallluft mit luftgetragenen proinflammatorisch aktiven Stoffen, Endotoxinen, Staub und Bakterien

Die ermittelte proinfl. Aktivität, die Endotoxin- und die Staubkonzentration der untersuchten Bioaerosolproben bei den in dieser Arbeit untersuchten Tierställen zeigte, dass beim Geflügel, und hier vor allem bei den Legehennen (Volierenhaltung mit Einstreu), und in der Mastschweinehaltung die höchste Belastung besteht. Die niedrigste Belastung an den aufgeführten Luftinhaltsstoffen wurde bei den Pferden und den Schafen gefunden. Eine Übersicht über die bei den untersuchten Nutztierrichtungen ermittelten Konzentrationen an oben genannten Luftinhaltsstoffen in der einatembaren Staubfraktion bzw. der PM10-Staubfraktion und ein Vergleich mit einigen aktuelleren Literaturquellen ist in den Tabellen 22 und 23 des Anhangs dargestellt. Bezüglich der Konzentration an luftgetragenen proinfl. Stoffen wurden in den untersuchten Tierställen Werte in der einatembaren Staubfraktion zwischen 103,2 EEU/m³ (Schafe, Median) und 6144,5 EEU/m³ (Legehennen, Median) und in

der PM10-Staubfraktion zwischen 59,6 EEU/m³ (Pferde, Median) und 1942,8 EEU/m³ (Legehennen, Median) ermittelt. Damit konnte bei den Legehennen die höchste Konzentration an proinfl. aktiven Stoffen nachgewiesen werden.

Die Belastung der Stallluft mit luftgetragenen Endotoxinen lag im einatembaren Staubanteil zwischen 87,3 EU/m³ (Schafe, Median) und 2252,4 EU/m³ (Legehennen, Median) und im PM10-Staubanteil zwischen 34,5 EU/m³ (Schafe, Median) und 566,8 EU/m³ (Legehennen, Median). Die höchsten Endotoxinkonzentrationen wurden somit im einatembaren Staub im Legehennenstall ermittelt, gefolgt von der Broiler- (Median: 832,9 EU/m³) und Schweinehaltung (Median: 438,1 EU/m³). In einer Studie von Spaan et al. (2006) wurden vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Endotoxinkonzentration bei Legehennen gefunden. Dort wurde im einatembaren Staub eine Endotoxinkonzentration von im Median 2140 EU/m³ ermittelt. Radon et al. (2002) fanden beim Geflügel Endotoxinkonzentrationen in der einatembaren Staubfraktion im Mittel um 2576 EU/m³ und bei Schweinen um 763 EU/m³.

Die ermittelten Konzentrationen des einatembaren Staubes lagen in den untersuchten Tierställen zwischen 0,08 (Schafe, Median) und 9,8 (Legehennen, Median) mg/m³ Luft und die des PM10-Staubanteils zwischen 0,07 (Schafe, Median) und 4,5 (Legehennen, Median) mg/m³ Luft. Innerhalb der Legehennenbetriebe schwankte die Staubkonzentration von 3,81 bis 20,95 mg/m³ im einatembaren Staubanteil. Radon et al. (2002) fanden in ihren Untersuchungen in Geflügelbetrieben Staubkonzentrationen bis 21,75 mg/m³ (Median: 7,01 mg/m³). In den untersuchten Schweinebetrieben lag die ermittelte Staubkonzentration der einatembaren Staubfraktion im Median bei 3,17 mg/m³, was vergleichbar ist mit den Messungen von Radon et al. (2002; Median: 5,0 mg/m³) und Spaan et al. (2006; Median: 2,6 mg/m³) in Schweineställen.

Die Messungen der aeroben Gesamtkoloniezahl in den untersuchten Tierställen dienten als Anhaltspunkt für die mikrobielle Luftbelastung. Sie beschränken sich darauf, die Gesamtzahl der unter bestimmten Kulturbedingungen vermehrungsfähigen Keime zu bestimmen, ohne zwischen gesundheitlich relevanten und nicht relevanten Keimen zu unterscheiden. Die Gesamtkoloniezahl kann aber zur Beurteilung des allgemeinen Hygienestatus in Tierställen herangezogen werden (Chai, 1998). Diese Messwerte lagen in den hier untersuchten Tierställen zwischen $1,5 \times 10^4$ (Pferde, Median) und $2,0 \times 10^6$ (Broiler, Median) KbE/m³. In den Legehennenbetrieben wurde eine Gesamtkoloniezahl von im Median $1,0 \times 10^6$ KbE/m³ bestimmt. Diese Messungen bestätigen Ergebnisse anderer Studien, dass in Geflügelbetrieben durchschnittlich die höchsten Konzentrationen an luftgetragenen Bakterien vorkommen (Seedorf et al., 1998; Radon et al., 2002). Radon et al. (2002) fanden in Geflügelbetrieben Bakterienkonzentrationen im Mittel um $7,9 \times 10^7$ KbE/m³, also vergleichbar mit den in dieser Arbeit gefundenen Werten. Bei den Messungen in Schweineställen wurde in diesen Untersuchungen eine aerobe Gesamtkoloniezahl von im Median $7,9 \times 10^4$ KbE/m³ ermittelt, Radon et al. (2002) fanden im Vergleich dazu Werte um $5,8 \times 10^6$ KbE/m³.

Im untersuchten Schafstall wurde eine verhältnismäßig hohe aerobe Bakterienkonzentration festgestellt ($1,4 \times 10^5$ KbE/m³). Dies könnte auf das recht stark endotoxin-belastete Heu zurückzuführen sein (siehe Tabelle 21 im Anhang), woraus ein Übergang in den luftgetragenen Zustand stattfand. Fennrich et al. (2001) erhielten in Schafställen Messwerte um $4,0 \times 10^4$ KbE/m³.

Insgesamt kann man bezüglich der Belastung der Stallluft mit verschiedenen Bioaerosolbestandteilen der mehrfach in der Literatur vertretenen Auffassung zustimmen, dass in Schweine- und Geflügelställen besonders hohe Konzentrationen an luftgetragendem Staub, Endotoxinen und Mikroorganismen auftreten (Clark et al., 1983; Cormier et al., 1990; Seedorf et al., 1998; Seedorf et Hartung, 2000; Radon et al., 2002).

Die untersuchten Milchviehställe lagen in Bezug auf die Belastung an den aufgeführten Luftinhalstoffen im mittleren Wertebereich, d.h. Legehennen > Broiler > Mastschweine > Milchkühe > Pferde / Schafe.

Schlussfolgernd kann somit für die in dieser Studie ermittelten Daten festgestellt werden, dass die hier untersuchten Tierställe hinsichtlich der Luftbelastung repräsentativ für andere Ställe sind.

5.2.1 Endotoxinbedingte und nicht-endotoxinbedingte proinflammatorische Aktivität in den untersuchten Bioaerosolproben

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zur Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinfl. Aktivität weisen darauf hin, dass die proinfl. Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen hauptsächlich durch Endotoxine bedingt wird. Polymyxin B als potenter Endotoxininhibitor reduzierte die IL-1 β -Aktivität der Bioaerosolproben um durchschnittlich 85% (50 – 97%), d.h. nur etwa 15% der proinfl. Aktivität wurden durch andere Substanzen, wie zum Beispiel Schimmelpilzglucane oder Toxine grampositiver Bakterien verursacht, deren potentiell entzündliche Wirkung bereits von mehreren Autoren beschrieben wurde (Hansen et Christensen, 1990; Douwes et al., 2000). Die zusätzliche Untersuchung einiger ausgewählter Bioaerosolproben mittels IL-6-Aktivitätsbestimmung zeigte im Mittel eine Reduktion der proinfl. Aktivität durch PB-Zusatz um 84,2% (68,4 – 95,8%), also eine ähnliche Größenordnung wie bei den IL-1 β -Ergebnissen.

Obwohl grampositive Bakterien in der Luft von Tierställen und auch in der Stadtluft in viel höheren Konzentrationen vorkommen als gramnegative Bakterien (Zucker et al., 2000; Becker et al., 2002), scheinen letztere eine weitaus höhere entzündungsauslösende Wirkung im Atemtrakt zu haben. Experimente von Becker et al. (2002), die das zytokin-induzierende Potential von Stadtluft-Partikeln (PM_{2.5-10}), Staphylokokken, Streptokokken, Pseudomonaden und aufgereinigtem LPS untersuchten, zeigten, dass die Pseudomonaden die weitaus höchste Interleukin-Ausschüttung (in CHO-TLR4-Zellen) induzierten, gefolgt von LPS. In Untersuchungen zur Reaktivität verschiedener grampositiver und gramnegativer Bakterien von Zucker et al. (2004) mittels humanem Vollbluttest wiesen ebenfalls die gramnegativen Bakterien (z.B. *E.coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas putida*) das höchste proinflammatorische Potential im Vergleich zu grampositiven Keimen (wie *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus xylosus*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus luteus*) auf. Bei letzteren konnte aber auch ein Monozyten aktivierendes Potential nachgewiesen werden, so dass man daraus schließen kann, dass grampositive Zellkomponenten zur Entzündungsauslösung im Atemtrakt nach einer Bioaerosolexposition beitragen.

Eine vergleichende Studie von Endotoxinen und Glucanen ergab, dass beide in ähnlichen Konzentrationen in der Luft von Tierställen vorkommen, aber die Glucane eine viel geringere proinfl. Aktivität im Vollbluttest besitzen als die Endotoxine (Hinz et al., 2007). Es ist aber generell davon auszugehen, dass die in organischen Stäuben enthaltenen proinfl. Substanzen sich in ihrem Wirkpotential beeinflussen und auch synergistische bzw. additive Effekte im Organismus entfalten können (Fogelmark et al., 2001). So sprechen die Untersuchungsergebnisse von Fogelmark et al. (2001) dafür, dass eine Endotoxininhalation mit einem Anstieg der Zellzahl von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen einhergeht, wo hingegen eine Exposition mit β -(1,3)-D-Glucanen mit einer Erhöhung der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten verbunden ist. Das heißt, beide Substanzen besitzen proinfl. Eigenschaften durch Aktivierung verschiedener Immunzellen und -mechanismen. Ebenso kann die Immunantwort in den Atemwegsepithelien von β -(1,3)-D-Glucanen durch simultane

Endotoxinexposition gehemmt werden, was für eine komplexe Interaktion zwischen diesen beiden mikrobiellen Zellwandbestandteilen spricht (Fogelmark et al., 2001).

Da PB ausschließlich die proinfl. Aktivität von Endotoxinen reduziert, kann davon ausgegangen werden, dass in Bioaerosolproben aus Tierställen Endotoxine quantitativ die wichtigste entzündungsauslösende Komponente darstellen. Somit stellen Endotoxine in Bioaerosolen aus Tierställen sowohl die qualitativ (führen in Bezug auf die eingesetzte Substanzmenge zur höchsten Zytokinausschüttung) als auch quantitativ bedeutendste proinfl. Komponente dar.

5.2.2 Beziehungen zwischen endotoxinbedingter -, nicht-endotoxinbedingter -, gesamt-proinflammatorischer Aktivität, Staubkonzentration und endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben

Die endotoxinbedingte -, nicht-endotoxinbedingte - und gesamt-proinfl. Aktivität im humanen Vollbluttest und die endotoxische Aktivität im LAL-Test der untersuchten Bioaerosolproben korrelierten signifikant ($r=0,799 - 0,830$, $\alpha=0,01$). Obwohl der LAL-Test nur Endotoxine erfasst und dessen Grenzen und Fehlerquellen (siehe Kapitel 2.4.4.1) zu berücksichtigen sind (Hartung et al., 1998; Linsel et Kummer, 1998; Fennrich et al., 1999; Anonym, 2002), kann er zur Beschreibung der „gesamt-proinflammatorischen Potenz“ der Bioaerosole in Tierställen genutzt werden. Mittels LAL-Test wird schon laut Zucker (2003) in organischen Stäuben die potenteste proinfl. Substanzgruppe quantifiziert. Insofern sind hohe Endotoxinkonzentrationen in Bioaerosolproben, welche mittels LAL-Test bestimmt wurden, auf jeden Fall ein Hinweis für ein hohes entzündungsauslösendes und damit gesundheitsgefährdendes Potential. Zwar spiegelt der Vollbluttest eher die Entzündungsreaktionen im Respirationstrakt von Säugetieren wieder, aber wenn man Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand beider Testsysteme berücksichtigt, dann stellt der LAL-Test zurzeit die schnellere und in der Praxis deutlich einfacher handhabbare Methode zur Bestimmung der proinfl. Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen dar. Allerdings könnte die Anwendung des Vollbluttests bei Verfügbarkeit von kryokonserviertem Blut evtl. etwas erleichtert werden.

Die nicht-endotoxinbedingte proinfl. Aktivität der mit PB vorbehandelten Bioaerosolproben korrelierte signifikant sowohl mit der gesamt-proinfl. ($r=0,913$, $\alpha=0,01$) als auch mit der berechneten endotoxinbedingten proinfl. Aktivität ($r=0,890$, $\alpha=0,01$). Ebenso wurde eine signifikante Korrelation zwischen der endotoxinbedingten – und der gesamt-proinfl. Aktivität gefunden ($r=0,993$, $\alpha=0,01$). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass luftgetragene proinfl. aktive Stoffe mit Endotoxin- und Nicht-Endotoxinstruktur die gleichen potentiellen Quellen haben (z.B. Kot, Futter, Einstreu), und aus diesen Quellen der Übergang in den luftgetragenen Zustand mit einer relativ vergleichbaren Stärke stattfindet.

Zwischen der ermittelten Staubkonzentration und der Endotoxinkonzentration (= endotoxische Aktivität) konnte ebenfalls ein Zusammenhang festgestellt werden, die Korrelation war auf dem Niveau $\alpha=0,01$ zweiseitig signifikant ($r=0,949$). Das heißt, dort, wo die höchste Staubkonzentration vorlag, wurde auch die höchste endotoxische Potenz ermittelt. Der oben festgestellte Zusammenhang zwischen Staub- und Endotoxinkonzentration beruht laut Trojan (2001) darauf, dass Endotoxin vorrangig an Staub gebunden zu sein scheint und damit bei einem höheren Staubgehalt auch eine höhere Endotoxinkonzentration zu erwarten ist.

Die Korrelation zwischen der IL-1 β -Aktivität und der IL-6-Aktivität der untersuchten Bioaerosolproben zeigte eine zweiseitige Signifikanz von 0,829 ($\alpha=0,01$). Demnach ist eine Untersuchung von Bioaerosolen aus Tierställen mittels IL-6-Aktivitätsbestimmung durchaus geeignet, das proinfl. Potential dieser Proben zu beschreiben.

Die Untersuchung der Beziehungen zwischen der endotoxischen Aktivität und der gesamtproinfl. Aktivität auf Basis der IL-6-Ausschüttung der ausgewählten Bioaerosolproben mittels Korrelationsanalyse nach Spearman ergab ebenfalls ein signifikantes Ergebnis ($r=0,789$, $\alpha=0,01$). Hierdurch wird die oben beschriebene Feststellung bestätigt, dass der LAL-Test geeignet ist die proinfl. Aktivität von Bioaerosolproben aus Tierställen zu beschreiben. Insgesamt waren die Ergebnisse auf Basis der IL-6-Ausschüttung im Durchschnitt schlechter auswertbar, oft war schon im unstimulierten Blut der Spender IL-6 nachweisbar, IL-1 β hingegen nicht. Mehrere Autoren in der Literatur berichten von ähnlichen Ergebnissen, danach sezernieren Alveolarmakrophagen schon ohne LPS-Stimulation höhere Mengen von IL-6 bzw. TNF- α (Kotloff et al., 1990; Thomassen et al., 1992; Losa Garcia et al., 1999). Untersuchungen von Schindler (2005), die spezies-spezifische ELISA's und Bioassays verglich, ergaben, dass der IL-1 β -ELISA das beste Testsystem bezüglich Sensitivität, Varianz und Kontrollwerten darstellt und die ähnlichsten Ergebnisse im Vergleich zum Kaninchen-Pyrogentest aufwies. Aufgrund der insgesamt besser auswertbaren Ergebnisse auf Basis der IL-1 β - Ausschüttung und anhand der vorliegenden Literaturdaten wurde sich bei allen weiteren Untersuchungen auf den IL-1 β -ELISA beschränkt. Die proinfl. Aktivität von pyrogenbelasteten Substanzen und Bioaerosolen kann somit über die IL-1 β -Quantifizierung im humanen Vollbluttest adäquat nachgewiesen werden, wie auch schon mehrfach in der Literatur belegt wurde (Weigandt, 2000; Zucker, 2003; Schindler, 2005).

5.2.3 Über- und Unterbewertung der proinflammatorischen Potenz durch den LAL-Test

Je nach spezifischer Zusammensetzung des Bioaerosols besteht die Möglichkeit einer Über- oder Unterbewertung der entzündungsauslösenden Potenz durch den LAL-Test (Zucker, 2003; Zucker et al., 2004), hierbei ist vor allem die bakterielle Herkunft des Endotoxins von Bedeutung. In den vorliegenden Untersuchungsergebnissen wird diese Über- bzw. Unterbewertung des proinfl. Potentials durch den Limulustest ebenfalls bestätigt. So wiesen die Bioaerosolproben aus den untersuchten Hühner-, Schweine-, Schaf- und Milchviehställen generell eine Unterbewertung durch den LAL-Test um durchschnittlich Faktor 3 auf. Hingegen wurde die proinfl. Aktivität der Staubproben aus den beiden Pferdeställen durch den LAL-Test um durchschnittlich Faktor 6 überbewertet (siehe Tabelle 16 im Anhang).

Eine frühere Studie zu Untersuchungen in Entenställen ergab ebenfalls eine generelle Überbewertung des proinfl. Potentials durch den Limulustest um durchschnittlich Faktor 5 (Zucker et al., 2006). Als Gründe hierfür wurden aufgeführt, dass Endotoxine verschiedener Bakterien im Vollbluttest eine unterschiedliche Potenz besitzen, Makrophagen zu aktivieren. So seien die in Entenställen vornehmlich von *Pseudomonas* spp. anzutreffenden Endotoxine viel weniger potent Makrophagen zu aktivieren als z.B. *E.coli*- Endotoxine (Fennrich et al., 1998; Zucker et al., 2002). Hingegen wiesen beide Endotoxine im Limulustest ähnliche Aktivitäten auf, d.h. der LAL-Test kann nicht zwischen Endotoxinen verschiedenen bakteriellen Ursprungs unterscheiden. Des Weiteren konnte ein hemmender bzw. aktivierender Einfluss von β -Glucanen aus Schimmelpilzen auf die Zytokinproduktion nachgewiesen werden. Hoffman et al. (1993) und Olson et al. (1996) fanden heraus, dass bei niedrigen β -Glucan-Konzentrationen eine maximale TNF- α -Produktion erreicht wird, wo hingegen höhere Konzentrationen an β -Glucanen die TNF- α -Aktivität offensichtlich hemmten. Demnach ist es möglich, dass eine hohe Konzentration von luftgetragenen Schimmelpilzen in Bioaerosolen, wie sie z.B. in Tierställen mit Stroheinstreu häufig vorkommt, zu einer reduzierten Produktion proinflammatorischer Zytokine aufgrund der immunmodulatorischen Aktivität von β -Glucanen führt (Zucker et al., 2006). In den

vorliegenden Untersuchungen konnte der Einfluss von β -Glucanen auf die Zytokinproduktion aufgrund fehlender Glucanwerte nicht geprüft werden.

Wenn man also die Ergebnisse im Vollbluttest und LAL-Test miteinander vergleichen will, ist ein eventueller Faktor bei der Bewertung der proinfl. Potenz durch den LAL-Test je nach spezifischer Zusammensetzung des Bioaerosols und bakterieller Herkunft des Endotoxins gegebenenfalls zu berücksichtigen. Da die Zusammensetzung von Bioaerosolen aber starken räumlichen und zeitlichen Schwankungen unterliegen kann (Hoppenheidt, 2002), dürfte die Feststellung eines solchen Korrekturfaktors für Routineuntersuchungen stets mit einem erheblichen Aufwand verbunden sein. Trotz der gefundenen Schwankungsbreite der Messdaten in beiden Testsystemen kann man den LAL-Test aufgrund der hohen Korrelation zum Vollbluttest (siehe Kapitel 5.2.2) als Screeningverfahren zur Quantifizierung der proinfl. aktiven Stoffe und damit auch zur Bestimmung des gesundheitsgefährdenden Potentials von Bioaerosolproben einsetzen.

5.2.4 Verteilung der proinflammatorischen und der endotoxischen Aktivität in den untersuchten Staubfraktionen

Bei der Untersuchung der Bioaerosolproben in Abhängigkeit vom aerodynamischen Durchmesser der Staubpartikel wiesen die Ergebnisse im Vollbluttest und auch im LAL-Test darauf hin, dass die proinfl. Substanzen bzw. die Endotoxine relativ gleichmäßig in den beiden untersuchten Staubfraktionen verteilt sind. Der Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben ergab keinen signifikanten Gruppenunterschied ($p=0,411$ bzw. $p=0,527$, $\alpha=0,01$). Es ist anzunehmen, dass Endotoxine in der Luft von Tierställen als Endotoxinaggregate bzw. gebunden an Partikel vorkommen, wie auch schon die hohe Korrelation zwischen der Staub- und der Endotoxinkonzentration (siehe Kapitel 5.2.2) andeutet. Auch in der Literatur wurde bereits mehrfach belegt, dass vornehmlich Endotoxinaggregate die biologisch aktiven Einheiten sind und Monomere nicht in der Lage seien, eine Zytokinantwort der Monozyten zu stimulieren (Daniels et al., 2000; Mueller et al., 2004).

Hier sei nochmals darauf hingewiesen, dass PM₁₀ eine Teilfraktion des einatembaren Staubanteils darstellt und dass für kleinere Partikel generell eine bessere Atemweggängigkeit angenommen wird (Linsel, 2001; Anonym, 2005). Deshalb könnte man für die Übertragung auf die Entzündungsauslösung in den Atemwegen durchaus vermuten, dass im einatembaren Staubanteil auch die Teilchen \leq PM₁₀ den Hauptteil der proinfl. Aktivität bzw. der entzündungsauslösenden Potenz im Atemtrakt ausmachen.

Bei früheren Untersuchungen von Umweltstäuben stellte man fest, dass die „coarse inhalable particle fraction“ (PM₁₀) eine größere Zytokinproduktion stimulierte als feine Partikel (PM_{2.5}). Dies sei mit einem größeren Endotoxingehalt assoziiert, weil Polymyxin B die Zytokinproduktion der gröberen Partikel stärker hemmte als die der PM_{2.5}-Fraktion (Huang et al., 2002). Auch Soukup und Becker (2001) belegen, dass die „coarse particle fraction“ die größere Bedeutung bezüglich der Makrophagenstimulation besitzt als die feinen oder ultrafeinen Stäube. Untersuchungen von Berger et al. (2005) in Rinderställen zeigten große Unterschiede in der Endotoxinkonzentration zwischen der einatembaren (Median: 36 EU/m³) und der alveolengängigen (Median: 2 EU/m³) Staubfraktion, die darauf schließen ließen, dass Endotoxine in Tierställen an die größeren Partikel gebunden sind.

Es sollte in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden, wie sich die Verteilung der Endotoxine in weiteren Staubfraktionen aus Tierställen, z.B. PM_{2.5} und PM_{1.0} darstellt. Dies wäre z.B. für das in der Tierhaltung bzw. Landwirtschaft arbeitende Personal von Bedeutung beim Tragen von Atemmasken. So könnte abgeschätzt werden, welches Rückhalte-

vermögen Atemschutzmasken mindestens haben müssen, um eine signifikante Reduktion der aerogenen Belastung mit Endotoxinen bzw. proinflammatorisch wirksamen Substanzen zu erzielen.

5.3 Bestimmung der proinflammatorischen und der endotoxischen Aktivität von potentiellen Bioaerosolquellen

Eine Untersuchung potentieller Bioaerosolquellen bestätigte die von Zucker (2003) gemachten Ausführungen, dass der Kot der Tiere, unabhängig von der untersuchten Tierart und dem Haltungssystem, die höchsten Konzentrationen an Endotoxinen bzw. proinfl. Substanzen enthält. Die dominierende aerobe gramnegative Bakterienspezies im Kot stelle hierbei *E.coli* dar. Das in dieser Arbeit untersuchte Futter wies die geringste proinfl. Aktivität auf.

Der Endotoxininhibitor Polymyxin B reduzierte die Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen (Einstreu, Futter, Kot) im Mittel um 85% (50 – 97,4%), d.h. dass auch in den potentiellen Quellen für organische Stäube die Endotoxine den größten Anteil an der gesamt-proinfl. Aktivität ausmachen.

Die Beziehungen zwischen endotoxinbedingter proinfl. -, nicht-endotoxinbedingter proinfl. -, gesamt-proinfl. Aktivität und endotoxischer Aktivität der untersuchten Bioaerosolquellen wurden ebenfalls mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Spearman untersucht. Es wurde zwischen allen Parametern eine signifikante Korrelation gefunden. Das bedeutet auch für potentielle Bioaerosolquellen, dass die endotoxische Aktivität im LAL-Test recht gut die gesamt-proinfl. Potenz der Bioaerosolquellen, wie Kot, Futter und Einstreu, in Tierställen widerspiegelt.

Eine Korrelation auf hohem Signifikanzniveau war zwischen der gesamt-proinfl. Aktivität und der endotoxinbedingten proinfl. Aktivität ($r=0,972$, $\alpha=0,01$) zu verzeichnen, was ebenfalls darauf hindeutet, dass die in den untersuchten Quellen enthaltenen proinfl. aktiven Substanzen hauptsächlich endotoxischer Herkunft sind, d.h. auf Endotoxinstruktur beruhen.

5.4 Tier- und umwelthygienische Aspekte zur Verminderung von Bioaerosolbelastungen in Tierställen

Vorrangig sind in Tierställen Maßnahmen zur Verbesserung der Stallluftqualität von Bedeutung. Wichtig ist hierbei, die Gesamtexposition an Staub, Endotoxinen, Mikroorganismen, Ammoniak und Kohlendioxid zu vermindern. So sind Maßnahmen in der Betriebsführung zielführend. Diese umfassen unter anderem verbesserte Fütterungs-, Entsorgungs- und Lüftungsstrategien, angefeuchtetes Futter, Verbesserung der Futterqualität, Optimierung der Einstreumaßnahmen, Sauberkeit im Stall und die Anpassung des Stallklimas (Lüftungsraten, Stalltemperatur, Luftfeuchtigkeit).

Da der Kot der Tiere nachweislich eine der stärksten Quellen für luftgetragene Endotoxine in Stalleinrichtungen ist, dürften gerade die hygienischen Maßnahmen, die eine Aerosolbildung aus kothaltigen Substanzen reduzieren, besonders effektiv zu einer Minderung der proinfl. Aktivität von Bioaerosolen in Tierställen beitragen. So stehen eine schnelle Fäkalienentfernung aus dem Stall und Fäkalienbehandlung oder -aufarbeitung hierbei im Vordergrund (Hartung et Wendel, 1995). Maßnahmen wie Kotbandentlüftung und Überspülen des Kotstapels bei Lagerung im Stall mit dem Abluftstrom sind weitere Möglichkeiten zur Verminderung von Bioaerosolbelastungen in Tierställen (Lippmann, 2007). Zur Senkung der Staubkonzentration im Stall könnte der Einsatz von Öl- und

Wassersprühsystemen, die Zugabe von pflanzlichem Öl zum Futter und der Gebrauch von Nassmethoden zur Oberflächenreinigung eingesetzt werden (Pearson et Sharples, 1995).

Einer Wasserverrieselungsanlage zur Staubbindung konnte in Untersuchungen bei alternativen Legehennenhaltungsverfahren zwar keine adäquate Wirkung nachgewiesen werden, aber hier sei dringender Untersuchungsbedarf bezüglich Sprühfrequenz und –dauer gegeben. Auf jeden Fall kann solch eine Anlage einen Beitrag zur Befeuchtung der meist zu trockenen Stallluft leisten (Lippmann, 2007).

Diverse Studien stimmen darin überein, dass die Lüftung ein bedeutender Faktor in der Entwicklung von Atemwegserkrankungen bei Landwirten und Tieren darstellt (Donham, 1991; Vogelzang et al., 1997; Radon et al., 2001). Diesbezüglich müssen als technische Maßnahmen in Tierställen die Luftführung und Strömungsgeschwindigkeit individuell optimiert werden, so dass kein erneutes Absetzen und Aufwirbeln des Staubes gewährleistet ist. Insgesamt führen eine temperaturgesteuerte Unterdrucklüftung, wie sie heute hauptsächlich in Geflügel- und Schweineställen eingesetzt wird und die Lüftungskontrolle mittels Luftfeuchtigkeits- und Temperatursensor zu einer Reduktion der Gesamtexposition. Die Lüftungskontrolle mittels Sensor ermöglicht, dass bei einer oft zu geringen Luftfeuchtigkeit und zu hohen Temperatur über eine Erhöhung der Luftrate das Stallklima optimiert wird. Das Lüftungsmanagement und eine gute Stallisolation gewährleisten überwiegend, dass die Klimaparameter Lufttemperatur und Luftfeuchtigkeit in einem für die Tiere gut tolerierbaren Bereich liegen (Lippmann, 2007).

6. Zusammenfassung

Charakterisierung der endotoxinbedingten proinflammatorischen Potenz von Bioaerosolen aus Tierställen

Bioaerosole in Nutztierställen stellen ein komplexes Gemisch verschiedenster luftgetragener Stoffe organischer Herkunft dar, die beim Menschen und aufgestallten Tieren gesundheitliche Beeinträchtigungen vor allem aufgrund ihrer infektiösen, allergie- und entzündungsauslösenden Potenz hervorrufen können. Endotoxine als Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien stellen hierbei die bedeutendste proinflammatorisch aktiv wirkende Bioaerosolkomponente dar, deren entzündungsauslösendes Potential es in der vorliegenden Arbeit genauer zu charakterisieren galt. Ziel der Untersuchungen war zum einen die Differenzierung zwischen endotoxinbedingter und nicht-endotoxinbedingter proinflammatorischer Aktivität von Bioaerosolproben aus Tierställen und zum anderen die Untersuchung, wie die Endotoxine bzw. proinflammatorisch aktiven Substanzen in Abhängigkeit vom aerodynamischen Durchmesser der Staubpartikel verteilt sind. Hierzu wurde ein semiquantitativer humaner Vollbluttest angewendet, bei dem das proinflammatorische Potential der untersuchten Bioaerosolfraktionen (einatembarer Staub, PM₁₀) mit und ohne Zusatz von Polymyxin B, einem potenten Endotoxininhibitor, mittels immunologischer Standardverfahren (ELISA) ermittelt wurde. Zum Vergleich wurde ein Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in den Bioaerosolproben angewendet.

Die Untersuchungen zeigten, dass durch den Zusatz von Polymyxin B die proinflammatorische Aktivität der Bioaerosolproben und potentieller Bioaerosolquellen, wie Kot, Futter und Einstreu, im Mittel um 85% reduziert wurde. Die Endotoxine stellen somit die sowohl qualitativ als auch quantitativ bedeutendste proinflammatorisch aktive Bioaerosolkomponente dar.

Eine signifikante Korrelation zwischen der endotoxischen Aktivität im LAL-Test und der gesamt-proinflammatorischen Aktivität im Vollbluttest ($r=0,817$, $\alpha=0,01$) zeigte, dass der LAL-Test, obwohl er nur die Endotoxine erfasst, auch zur Charakterisierung des gesamt-proinflammatorischen Potentials von Bioaerosolproben aus Tierställen genutzt werden kann. Somit stellt der LAL-Test unter Berücksichtigung von Zeit-, Arbeits- und Materialaufwand zurzeit die schnellere und einfacher handhabbare Methode im Vergleich zum Vollbluttest dar, um die Belastung mit proinflammatorischen Stoffen in der Luft von Tierställen zu beschreiben.

Wichtig für die Anwendung beider Testsysteme sind auf jeden Fall standardisierte Bedingungen, wie Sammelmethode (definierte Messgeräte, Sammelzeit, Filtergröße etc.) und die Durchführung des Tests unter festgelegten, wiederholbaren Konditionen.

Zwischen der Staub- und der Endotoxinkonzentration der Bioaerosolproben konnte ebenfalls ein Zusammenhang festgestellt werden ($r=0,949$, $\alpha=0,01$). Das heißt, je höher die Staubkonzentration der untersuchten Proben war, umso höher war auch die jeweilige Endotoxinkonzentration. Die Endotoxine scheinen also in der Luft von Tierställen vorrangig an Partikel gebunden zu sein, was auch schon mehrfach in der Literatur bestätigt wurde.

Bezüglich der Verteilung der proinflammatorischen bzw. endotoxischen Aktivität in Abhängigkeit vom aerodynamischen Durchmesser der Staubpartikel konnte festgestellt werden, dass die proinflammatorischen Substanzen bzw. die Endotoxine relativ gleichmäßig in beiden untersuchten Staubfraktionen (einatembare Staubfraktion, PM₁₀-Staubfraktion) verteilt waren. In zukünftigen Untersuchungen sollte geklärt werden, wie sich die Verteilung der Endotoxine in weiteren Staubfraktionen aus Tierställen, wie PM_{2.5} und PM_{1.0} darstellt.

Eine Untersuchung potentieller Bioaerosolquellen, wie Kot, Futter und Einstreu, zeigte, dass der Kot der Tiere nachweislich eine der stärksten Quellen für luftgetragene Endotoxine darstellt. So dürften vor allem Maßnahmen, die eine Aerosolbildung aus kothaltigen Substanzen in Tierställen reduzieren, wie Überspülen des Kotstapels oder Kotbandes mit dem Abluftstrom, weiterhin Maßnahmen zur Staubbindung in der Stallluft (z.B. mit Wasser- oder Ölsprühsystemen) und eine optimierte Lüftungskontrolle einen effektiven Beitrag zur Verbesserung der Stallluftqualität liefern.

7. Summary

Characterization of the endotoxin related proinflammatory potential of bioaerosols from animal stables

Bioaerosols in animal stables represent a complex mixture of diverse airborne materials of organic origin, which can cause health impairments to humans and animals in stables due to their infectious, allergy and inflammation triggering potency. In this case endotoxins as a cell wall component of gramnegative bacteria represent the most important proinflammatory actively working component of bioaerosols, which was to be characterized in this thesis more precisely. Aim of this study was on the one hand the differentiation between endotoxic and non-endotoxic proinflammatory activity of bioaerosol samples from animal stables and on the other hand the analysis how the endotoxic and proinflammatory active substances are distributed depending on the aerodynamic diameter of the dust particles. For this a semiquantitative human whole blood test was used with which the proinflammatory potential of the analysed bioaerosol particles (inhalable dust, PM10-dust) was identified by immunological standard techniques (ELISA). The samples in the whole blood assay were tested with and without addition of Polymyxin B, a potent endotoxin inhibitor. For comparison a Limulus-Amoebocyte-Lysate (LAL)-test was used to determine the concentration of endotoxins in the bioaerosol samples.

The investigations showed that by addition of Polymyxin B the proinflammatory activity of the bioaerosol samples and potential sources of bioaerosol origins, like excrement, feed and litter, was reduced by 85% on the average. Endotoxins consequently represent the qualitative as well as quantitative most important proinflammatory active bioaerosol component.

A significant correlation between the endotoxic activity in the LAL-test and the total proinflammatory activity in the whole blood test ($r=0,817$, $\alpha=0,01$) proved that the LAL-test, although it only records endotoxins, can also be used for the characterization of the total proinflammatory potential of bioaerosol samples from animal stables. Thus the LAL-test in consideration of time, work and material expenditure represents the faster and simpler method in comparison to the whole blood test at the moment to describe the amount of proinflammatory substances in the air of animal stables.

For the application of both test systems standardized conditions, like collecting-method (defined measuring instruments, measuring time, filter size etc.) and the performance of the test under defined, repeatable conditions are most important.

There also was found a relationship between the concentration of dust and endotoxin in the bioaerosol samples ($r=0,949$, $\alpha=0,01$). That means, the higher the dust concentration of the analysed samples, the higher was the respective endotoxin concentration. Endotoxins seem to be mainly bound to particles in the air of animal stables, which was confirmed in literature for several times.

Concerning the distribution of the proinflammatory and endotoxic activity depending on the aerodynamic diameter of the dust particles it was established that the proinflammatory substances and the endotoxins were constantly distributed in both tested dust fractions (inhalable dust, PM10 dust). It should be analysed in future experiments how the endotoxins are distributed in further dust fractions from animal stables, like PM2.5 and PM1.0.

An investigation of potential bioaerosol sources, like excrement, feed and litter, suggest that the animal's excrement represent one of the highest sources for airborne endotoxins.

Measures for the reduction of emissions which reduce aerosol formation from excrement containing substances in animal stables, like flushing of the excrement pile or excrement belt with the exhaust air stream, further measures of binding dust in the stable air (for instance

water- or oil spraying systems) and an optimized ventilation control provide an effective contribution for improvement of the air quality in animal stables.

8. Literaturverzeichnis

Andra, J.; Garidel, P.; Majerle, A.; Jerala, R., et al. (2004):
Biophysical characterization of the interaction of *Limulus polyphemus* endotoxin neutralizing protein with lipopolysaccharide.
Eur J Biochem 271(10). S. 2037-2046.

Anonym (1998). Health based recommended Occupational Exposure Limit for Endotoxins.
Dutch expert committee on occupational standards, Rijswijk, Health Council for the Netherlands.

Anonym (2002):
Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz.
BIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen (Kennzahl 9450) 28(Lfg. IV/02).
Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz BGIA, Sankt Augustin.

Anonym (2003):
Arbeitsgruppe "Wirkungen von Feinstaub auf die menschliche Gesundheit" der Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN.
Umwelt med Forsch Prax 8. S. 257-278.

Anonym (2004^a):
Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft, Aktive Probenahme von Bioaerosolen.
Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN - Normenausschuss KRdL.
Richtlinienreihe VDI 4252 (Blatt 3).

Anonym (2004^b):
Verfahren zur Bestimmung der Bakterienkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz.
BIA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen (Kennzahl 9430) 32(Lfg. IV/04).
Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz BGIA, Sankt Augustin.

Anonym (2005):
MAK- und BAT-Werte-Liste.
Deutsche Forschungsgemeinschaft, Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bonn. S. 167-175.

Bannerman, D. D.; Fitzpatrick, M. J.; Anderson, D. Y.; Bhattacharjee, A. K., et al. (1998):
Endotoxin-neutralizing protein protects against endotoxin-induced endothelial barrier dysfunction.
Infect Immun 66(4). S. 1400-1407.

Basu, S.; Fenton, M. J. (2004):
Toll-like receptors: function and roles in lung disease.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286(5). S. L887-892.

Becker, S.; Fenton, M. J.; Soukup, J. M. (2002):
Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles.
Am J Respir Cell Mol Biol 27(5). S. 611-618.

Becker, S.; Soukup, J. M.; Sioutas, C.; Cassee, F. R. (2003):
Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles.
Exp Lung Res 29(1). S. 29-44.

Berger, I.; Schierl, R.; Ochmann, U.; Egger, U., et al. (2005):
Concentrations of dust, allergens and endotoxin in stables, living rooms and mattresses from cattle farmers in southern Bavaria.
Ann Agric Environ Med 12(1). S. 101-107.

Bergmann, K.-C., Müsken, H. (1994):
Endotoxine als Auslöser von Atemwegsobstruktionen bei Landwirten.
Atemwegs-Lungenkrankh Jahrgang 20 1/1994. S. 26-30.

Brachmann, P. S., Ehrlich, R., Eichenwald, H. F., Gabelli, V. J., Kethley, T. W., Madin, S. H., Maltmann, J. R., Middlebrook, G., Morton, J. D., Siver, I. H., Wolfe, E. K. (1964):
Standard Sampler for assay of airborne microorganisms.
Science 144. S. 1295.

Braun-Fahrlander, C. (2000):
Allergic diseases in farmers' children.
Pediatr Allergy Immunol 11 Suppl 13. S. 19-22.

Bucklin, S. E.; Lake, P.; Logdberg, L.; Morrison, D. C. (1995):
Therapeutic efficacy of a polymyxin B-dextran 70 conjugate in experimental model of endotoxemia.
Antimicrob Agents Chemother 39(7). S. 1462-1466.

Buhl, R.; Berdel, D.; Criée, C.-P.; Gillisen, A. et al. (2006):
Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit Asthma.
Pneumologie 2006. 60: S. 139-183.

Burkart, T. (2002):
Abbildung in: Pathogenität bakterieller Zellwandpolymere.
www.ifik.unibe.ch/files/uploads/education/13_pathogenitaet_bakt_zellwandpolymere.pdf. (18.06.2008)

Castellan, R. M.; Olenchock, S. A.; Kinsley, K. B.; Hankinson, J. L. (1987):
Inhaled endotoxin and decreased spirometric values. An exposure-response relation for cotton dust.
N Engl J Med 317(10). S. 605-610.

Chai, T. (1998). Vorkommen von luftgetragenen Keimen in Rinderställen und der Stallumgebung unter besonderer Berücksichtigung von *Clostridium perfringens*. Dissertation. Berlin. Veterinärmed. Fakultät.

Chow, J. C.; Young, D. W.; Golenbock, D. T.; Christ, W. J., et al. (1999):
Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction.
J Biol Chem 274(16). S. 10689-10692.

Chun, D. T.; Chew, V.; Bartlett, K.; Gordon, T., et al. (2002):
Second inter-laboratory study comparing endotoxin assay results from cotton dust.
Ann Agric Environ Med 9(1). S. 49-53.

Chun, D. T.; Chew, V.; Bartlett, K.; Gordon, T., et al. (2000):
Preliminary report on the results of the second phase of a round- robin endotoxin assay
study using cotton dust.
Appl Occup Environ Hyg 15(1). S. 152-157.

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. 537-541.

Cooper, J. F. (1990):
Resolving LAL Test interferences.
J Parenter Sci Technol 44(1). S. 13-15.

Cormier, Y.; Tremblay, G.; Meriaux, A.; Brochu, G., et al. (1990):
Airborne microbial contents in two types of swine confinement buildings in Quebec.
Am Ind Hyg Assoc J 51(6). S. 304-309.

Daniels, A. U.; Barnes, F. H.; Charlebois, S. J.; Smith, R. A. (2000):
Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro.
J Biomed Mater Res 49(4). S. 469-478.

Danuser, B.; Monn, C. (1999):
Endotoxins in the workplace and in the environment.
Schweiz Med Wochenschr 129(12). S. 475-483.

Danuser, B.; Wyss, C.; Hauser, R.; von Planta, U., et al. (1988):
Lung function and symptoms in employees of poultry farms.
Soz Praventivmed 33(6). S. 286-291.

Dentener, M. A.; Bazil, V.; Von Asmuth, E. J.; Ceska, M., et al. (1993):
Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8
release by human monocytes and alveolar macrophages.
J Immunol 150(7). S. 2885-2891.

- Donham, K. J. (1990):
Health effects from work in swine confinement buildings.
Am J Ind Med 17(1). S. 17-25.
- Donham, K. J. (1991):
Association of environmental air contaminants with disease and productivity in swine.
Am J Vet Res 52(10). S. 1723-1730.
- Donham, K. J.; Cumro, D.; Reynolds, S. J.; Merchant, J. A. (2000):
Dose-response relationships between occupational aerosol exposures and cross-shift declines of lung function in poultry workers: recommendations for exposure limits.
J Occup Environ Med 42(3). S. 260-269.
- Douwes, J.; Heederik, D. (1997):
Epidemiologic investigation of endotoxins.
Int J Occup Environ Health. Suppl. 3, S. 26-32.
- Douwes, J.; Pearce, N.; Heederik, D. (2002):
Does environmental endotoxin exposure prevent asthma?
Thorax 57(1). S. 86-90.
- 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., et al. (2000):
Upper airway inflammation assessed by nasal lavage in compost workers: A relation with bio-aerosol exposure.
Am J Ind Med 37(5). S. 459-468.
- Emanuel, D. A.; Wenzel, F. J.; Lawton, B. R. (1975):
Pulmonary mycotoxicosis.
Chest 67(3). S. 293-297.
- Fennrich, S.; Fischer, M.; Hartung, T.; Lexa, P., et al. (1998):
[Evaluation and further development of a pyrogenicity assay based on human whole blood].
Altex 15(3). S. 123-128.
- Fennrich, S.; Fischer, M.; Hartung, T.; Lexa, P., et al. (1999):
Detection of endotoxins and other pyrogens using human whole blood.
Dev Biol Stand 101. S. 131-139.

- Fennrich, S.; Zucker, B.; Hartung, T. (2001):
A new application for the human whole blood test: development of an assay to assess the health risk of air-borne microbial contaminations.
Altex 18(1). S. 41-46.
- Fenton, M. J.; Golenbock, D. T. (1998):
LPS-binding proteins and receptors.
J Leukoc Biol 64(1). S. 25-32.
- Ferwerda, B.; McCall, M. B.; Verheijen, K.; Kullberg, B. J., et al. (2008):
Functional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms.
Mol Med 14(5-6). S. 346-352.
- Fletcher, M. A.; McKenna, T. M.; Quance, J. L.; Wainwright, N. R., et al. (1993):
Lipopolysaccharide detoxification by endotoxin neutralizing protein.
J Surg Res 55(2). S. 147-154.
- Fogelmark, B.; Thorn, J.; Rylander, R. (2001):
Inhalation of (1-->3)-beta-D-glucan causes airway eosinophilia.
Mediators Inflamm 10(1). S. 13-19.
- Frey, H.-H., Löscher, W. (2002):
Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, 2. Auflage. / (Hrsg.).
Enke Verlag Stuttgart. S. 375-376.
- Gorny, R. L.; Douwes, J.; Versloot, P.; Heederik, D., et al. (1999):
Application of the classic Limulus test and the quantitative kinetic chromogenic LAL method for evaluation of endotoxin concentration in indoor air.
Ann Agric Environ Med 6(1). S. 45-51.
- Hajjar, A. M.; Ernst, R. K.; Tsai, J. H.; Wilson, C. B., et al. (2002):
Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications.
Nat Immunol 3(4). S. 354-359.
- Hansen, E. W.; Christensen, J. D. (1990):
Comparison of cultured human mononuclear cells, Limulus amoebocyte lysate and rabbits in the detection of pyrogens.
J Clin Pharm Ther 15(6). S. 425-433.
- Hartung, J. (1992):
[Emissions of airborne substances from stalls of domestic animals].
Pneumologie 46(5). S. 196-202.

Hartung, J. (1995):

[Gas and particle emissions from housing in animal production].

Dtsch Tierarztl Wochenschr 102(7). S. 283-288.

Hartung, T.; Fennrich, S.; Fischer, M.; Montag-Lessing, T., et al. (1998):

[Development and evaluation of a pyrogen test based on human whole blood].

Altex 15(5). S. 9-10.

Hartung, T.; Wendel, A. (1995):

[Detection of Pyrogens using human whole blood].

Altex 12(2). S. 70-75.

Heederik, D.; Douwes, J.; Wouters, I.; Doekes, G. (2000):

Organic dusts: Beyond endotoxin.

Inhalation Toxicol 12. S. 27-33.

Heederik, D.; Dowes, J. (1997):

Towards an occupational exposure limit for endotoxins.

Ann Agric Environ Med 4. S. 17-19.

Helander, I.; Saxen, H.; Salkinoja-Salonen, M.; Rylander, R. (1982):

Pulmonary toxicity of endotoxins: comparison of lipopolysaccharides from various bacterial species.

Infect Immun 35(2). S. 528-532.

Hinz, S., Eckardt, K., Zucker, B.A. (2007):

Untersuchungen zur proinflammatorischen Aktivität von Glucanen und Endotoxinen in Bioaerosolen aus Tierställen. In: KRdL-Expertenforum Mikrobielle Luftverunreinigungen.

Freising-Weihenstephan: Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN -

Normenausschuss KRdL. ISBN: 3-931384-60-8. S. 114-119.

Hirschfeld, M.; Ma, Y.; Weis, J. H.; Vogel, S. N., et al. (2000):

Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2.

J Immunol 165(2). S. 618-622.

Hirschfeld, M.; Weis, J. J.; Toshchakov, V.; Salkowski, C. A., et al. (2001):

Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages.

Infect Immun 69(3). S. 1477-1482.

Hirst, J. M. (1995):

Bioaerosols: Introduction, Retrospect and Prospect.

In: Bioaerosols Handbook. / C. S. Cox, Wathes, C.M. (Hrsg.). S. 5-7.

Hoess, A.; Watson, S.; Siber, G. R.; Liddington, R. (1993):
Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5 Å resolution.
Embo J 12(9). S. 3351-3356.

Hoffmann, O. A., Olson, E. J., and Limper, A. H. (1993):
Fungal β -glucans modulate macrophage release of tumor necrosis factor- α in response to bacterial lipopolysaccharide.
Immunol Lett 37. S. 19-25.

Hollander, A.; Heederik, D.; Versloot, P.; Douwes, J. (1993):
Inhibition and enhancement in the analysis of airborne endotoxin levels in various occupational environments.
Am Ind Hyg Assoc J 54(11). S. 647-653.

Hoppenheidt, K. (2002):
Bioaerosole als Bestandteile von Feinstäuben.
In: Beitrag für der Tagungsband der Fachtagung "Wirkung und Erfassung von Fein- und Ultrafeinstäuben".
14.02.2002. München.

Huang, S. L.; Cheng, W. L.; Lee, C. T.; Huang, H. C., et al. (2002):
Contribution of endotoxin in macrophage cytokine response to ambient particles in vitro.
J Toxicol Environ Health A 65(17). S. 1261-1272.

Imrich, A.; Ning, Y.; Kobzik, L. (2000):
Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses in vitro.
Toxicol Appl Pharmacol 167(2). S. 140-150.

Iversen, M.; Pedersen, B.; Dahl, R. (1990):
Relationship between respiratory symptoms and bronchial hyperreactivity in pig farmers.
Am J Ind Med 17(1). S. 64-65.

Jacobs, R. R. (1997):
Endotoxins in the Environment.
Int J Occup Environ Health 3. S. 3-5.

Kappos, A., Bruckmann, P., Eikmann, T., Englert, N. et al. (2003):
Bewertung des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes zur gesundheitlichen Wirkung von Partikeln in der Luft - Arbeitsgruppe "Wirkungen von Feinstaub auf die menschliche Gesundheit" der Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN.
Umwelt med Forsch Prax 8. S. 257-278.

Kentner, M., Hofmann, A. (1986):

Diagnostische, gutachterliche und prophylaktische Aspekte bei der Farmerlunge.
Arbeitsmedizin, Sozialmed., Präventivmed. 21. S. 69-71.

Kindinger, I.; Daneshian, M.; Baur, H.; Gabrio, T., et al. (2005):

A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response.

J Immunol Methods 298(1-2). S. 143-153.

Kirschning, C. J.; Wesche, H.; Merrill Ayres, T.; Rothe, M. (1998):

Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide.

J Exp Med 188(11). S. 2091-2097.

Koch, P.-J. (1998): Untersuchungen zur Wechselwirkung von Polymyxin B mit bakteriellen Lipopolysacchariden. Dissertation. Fachbereich Chemie der Freien Universität Berlin

Konietzko, N. (1995):

Bronchitis (Hrsg).

Urban und Schwarzenberg Verlag, München.

Kooguchi, K.; Hashimoto, S.; Kobayashi, A.; Kitamura, Y., et al. (1998):

Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia.

Infect Immun 66(7). S. 3164-3169.

Kotloff, R. M.; Little, J.; Elias, J. A. (1990):

Human alveolar macrophage and blood monocyte interleukin-6 production.

Am J Respir Cell Mol Biol 3(5). S. 497-505.

Kreyling, W. G. (2001). Wirkung ultrafeiner Partikel auf die menschliche Gesundheit.

Universität Osnabrück, Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Projektfeld "Gesundheitsrelevanz von Aerosolen" S. 10.

Kurt-Jones, E. A.; Popova, L.; Kwinn, L.; Haynes, L. M., et al. (2000):

Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus.

Nat Immunol 1(5). S. 398-401.

Laitinen, S.; Kangas, J.; Kotimaa, M.; Liesivuori, J., et al. (1994):

Workers' exposure to airborne bacteria and endotoxins at industrial wastewater treatment plants.

Am Ind Hyg Assoc J 55(11). S. 1055-1060.

Larsson, B. M.; Larsson, K.; Malmberg, P.; Palmberg, L. (1999):
Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells.
Inflammation 23(3). S. 217-230.

Lehnardt, S.; Schott, E.; Trimbuch, T.; Laubisch, D., et al. (2008):
A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS.
J Neurosci 28(10). S. 2320-2331.

Lentsch, A. B.; Czermak, B. J.; Bless, N. M.; Van Rooijen, N., et al. (1999):
Essential role of alveolar macrophages in intrapulmonary activation of NF-kappaB.
Am J Respir Cell Mol Biol 20(4). S. 692-698.

Levin, J.; Bang, F. B. (1964):
A Description of Cellular Coagulation in the Limulus.
Bull Johns Hopkins Hosp 115. S. 337-345.

Levitz, S. M. (2004):
Interactions of Toll-like receptors with fungi.
Microbes Infect 6(15). S. 1351-1355.

Liebers, V.; Bruning, T.; Raulf-Heimsoth, M. (2006):
Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans.
Am J Ind Med 49(6). S. 474-491.

Lien, E.; Means, T. K.; Heine, H.; Yoshimura, A., et al. (2000):
Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide.
J Clin Invest 105(4). S. 497-504.

Linaker, C.; Smedley, J. (2002):
Respiratory illness in agricultural workers.
Occup Med (Lond) 52(8). S. 451-459.

Linsel, G. (2001):
Bioaerosole - Entstehung und biologische Wirkungen.
In: Sicherer Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen und Zytostatika.
Braunschweig, 12.03.-13.03.2001

Linsel, G., Kummer, B. (1998):
Endotoxine in der Luft am Arbeitsplatz.
Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft 58 (Nr. 7/8). S. 281-287.

Lippmann, J. (2007):

Untersuchungen zur Wirksamkeit emissionsmindernder Maßnahmen bei alternativen Legehennenhaltungsverfahren zur Reduzierung der Gase, Stäube und Keimbelastung. Schriftenreihe der sächsischen Landesanstalt für Landwirtschaft, Heft 3.

Liu, A. H. (2002):

Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. J Allergy Clin Immunol 109(3). S. 379-392.

Losa Garcia, J. E.; Rodriguez, F. M.; Martin de Cabo, M. R.; Garcia Salgado, M. J., et al. (1999):

Evaluation of inflammatory cytokine secretion by human alveolar macrophages. Mediators Inflamm 8(1). S. 43-51.

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. 481-490.

Means, T. K.; Golenbock, D. T.; Fenton, M. J. (2000):

The biology of Toll-like receptors.

Cytokine Growth Factor Rev 11(3). S. 219-232.

Mehlhorn, G. (1979):

Lehrbuch der Tierhygiene, Teil 1. / (Hrsg.). VEB Gustav Fischer Verlag Jena. S. 118-120.

Meier, A.; Kirschning, C. J.; Nikolaus, T.; Wagner, H., et al. (2003):

Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 are essential for Aspergillus-induced activation of murine macrophages.

Cell Microbiol 5(8). S. 561-570.

Merchant, J., Donham, K. (1989):

Health risks from animal confinement units.

In: Dosman, J., Cockroft, D.W. (Hrsg.): Principles of health and safety in agriculture. Florida CRC Press, S. 58-61.

Michel, O.; Duchateau, J.; Sergysels, R. (1989):

Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects.

J Appl Physiol 66(3). S. 1059-1064.

Michel, O.; Ginanni, R.; Duchateau, J.; Vertongen, F., et al. (1991):

Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma.

Clin Exp Allergy 21(4). S. 441-448.

Michel, O.; Ginanni, R.; Le Bon, B.; Content, J., et al. (1992):
Inflammatory response to acute inhalation of endotoxin in asthmatic patients.
Am Rev Respir Dis 146(2). S. 352-357.

Michel, O.; Nagy, A. M.; Schroeven, M.; Duchateau, J., et al. (1997):
Dose-response relationship to inhaled endotoxin in normal subjects.
Am J Respir Crit Care Med 156(4 Pt 1). S. 1157-1164.

Miller, S. I.; Ernst, R. K.; Bader, M. W. (2005):
LPS, TLR4 and infectious disease diversity.
Nat Rev Microbiol 3(1). S. 36-46.

Monton, C.; Torres, A. (1998):
Lung inflammatory response in pneumonia.
Monaldi Arch Chest Dis 53(1). S. 56-63.

Moore, R. A.; Bates, N. C.; Hancock, R. E. (1986):
Interaction of polycationic antibiotics with *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide and lipid A studied by using dansyl-polymyxin.
Antimicrob Agents Chemother 29(3). S. 496-500.

Morita, T.; Ohtsubo, S.; Nakamura, T.; Tanaka, S., et al. (1985):
Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS).
J Biochem (Tokyo) 97(6). S. 1611-1620.

Morrison, D. C.; Jacobs, D. M. (1976):
Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides.
Immunochemistry 13(10). S. 813-818.

Morrison, D. C.; Kline, L. F. (1977):
Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS).
J Immunol 118(1). S. 362-368.

Morrison, D. C.; Ryan, J. L. (1979):
Bacterial endotoxins and host immune responses.
Adv Immunol 28. S. 293-450.

Mueller, M.; Brandenburg, K.; Dedrick, R.; Schromm, A. B., et al. (2005):
Phospholipids inhibit lipopolysaccharide (LPS)-induced cell activation: a role for LPS-binding protein.
J Immunol 174(2). S. 1091-1096.

Mueller, M.; Lindner, B.; Kusumoto, S.; Fukase, K., et al. (2004):
Aggregates are the biologically active units of endotoxin.
J Biol Chem 279(25). S. 26307-13.

Muta, T.; Miyata, T.; Tokunaga, F.; Nakamura, T., et al. (1987):
Primary structure of anti-lipopolysaccharide factor from American horseshoe crab, *Limulus polyphemus*.
J Biochem (Tokyo) 101(6). S. 1321-1330.

Muta, T.; Takeshige, K. (2001):
Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations.
Eur J Biochem 268(16). S. 4580-4589.

Muzio, M.; Mantovani, A. (2001):
The Toll receptor family.
Allergy 56(2). S. 103-108.

Netea, M. G.; van Deuren, M.; Kullberg, B. J.; Cavaillon, J. M., et al. (2002):
Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?
Trends Immunol 23(3). S. 135-139.

Nieuwenhuijsen, M. J.; Noderer, K. S.; Schenker, M. B.; Vallyathan, V., et al. (1999):
Personal exposure to dust, endotoxin and crystalline silica in California agriculture.
Ann Occup Hyg 43(1). S. 35-42.

Nieuwenhuijsen, M. J. e. a. (1996):
Exposure to dust, noise, and pesticides, their determinants, and use of protective equipment among California farm operators.
Appl Occup Environ Hyg 11. S. 1215-1217.

Nikaido, H.; Vaara, M. (1985):
Molecular basis of bacterial outer membrane permeability.
Microbiol Rev 49(1). S. 1-32.

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. 225-234.

Oberdorster, G.; Sharp, Z.; Atudorei, V.; Elder, A., et al. (2004):
Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain.
Inhal Toxicol 16(6-7). S. 437-445.

Oberdorster, G.; Utell, M. J. (2002):

Ultrafine particles in the urban air: to the respiratory tract--and beyond?
Environ Health Perspect 110(8). S. A440-441.

Ohashi, K.; Burkart, V.; Flohe, S.; Kolb, H. (2000):

Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex.

J Immunol 164(2). S. 558-561.

Olson, E. J., Standing, J. E., Griego-Harper, N., Hoffman, O. A. and Limper, A. H. (1996):

Fungal β -glucan interacts with vitronectin and stimulates tumor necrosis factor alpha release from macrophages.

Infect Immun 64, S. 3548-3554.

O'Neill, L. A.; Greene, C. (1998):

Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants.

J Leukoc Biol 63(6). S. 650-657.

Owen, M. K. (1992):

Airborne particle sizes and sources found in indoor air.

Atmospheric Environment 26A. S. 2149-2162.

Pearson, C. C., Sharples, T.J. (1995):

Airborne dust concentrations in livestock buildings and effect of feeds.

J Agr Eng Res 60(3). S. 145-154.

Pereira, H. A.; Erdem, I.; Pohl, J.; Spitznagel, J. K. (1993):

Synthetic bactericidal peptide based on CAP37: a 37-kDa human neutrophil granule-associated cationic antimicrobial protein chemotactic for monocytes.

Proc Natl Acad Sci U S A 90(10). S. 4733-4737.

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. 676-683.

Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M. Y., et al. (1998):

Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.

Science 282(5396). S. 2085-2088.

Pratt, D. S.; May, J. J. (1984):

Feed-associated respiratory illness in farmers.

Arch Environ Health 39(1). S. 43-48.

Purdy, C. W.; Straus, D. C.; Chirase, N.; Parker, D. B., et al. (2002):
Effects of aerosolized feedyard dust that contains natural endotoxins on adult sheep.
Am J Vet Res 63(1). S. 28-35.

Radon, K. (2006):
The two sides of the "endotoxin coin".
Occup Environ Med 63(1). S. 73-78, 10.

Radon, K.; Danuser, B.; Iversen, M.; Monso, E., et al. (2002):
Air contaminants in different European farming environments.
Ann Agric Environ Med 9(1). S. 41-48.

Radon, K.; Garz, S.; Riess, A.; Koops, F., et al. (2003):
[Respiratory diseases in European farmers-II. Part of the European farmers' project].
Pneumologie 57(9). S. 510-517.

Radon, K.; Monso, E.; Weber, C.; Danuser, B., et al. (2002):
Prevalence and risk factors for airway diseases in farmers--summary of results of the
European Farmers' Project.
Ann Agric Environ Med 9(2). S. 207-213.

Radon, K.; Nowak, D. (2002):
Farming. In: Hendrick, D.; Beckett, W.; Burge, S. P.; Churg, A. (eds). Occupational disorders
of the lung - recognition, management, and prevention.
London, W. B. Saunders - Harcourt Publishers. S. 425-435.

Radon, K.; Nowak, D. (2003):
[Respiratory diseases in European farmers. Part 1: Literature review].
Pneumologie 57(8). S. 444-448.

Radon, K.; Opravil, U.; Hartung, J.; Szadkowski, D., et al. (1999):
Work-related respiratory disorders and farming characteristics among cattle farmers in
Northern Germany.
Am J Ind Med 36(4). S. 444-449.

Radon, K.; Weber, C.; Iversen, M.; Danuser, B., et al. (2001):
Exposure assessment and lung function in pig and poultry farmers.
Occup Environ Med 58(6). S. 405-410.

Raetz, C. R.; Whitfield, C. (2002):
Lipopolysaccharide endotoxins.
Annu Rev Biochem 71. S. 635-700.

Rask-Andersen, A. (1989):

Organic dust toxic syndrome among farmers.

Br J Ind Med 46(4). S. 233-238.

Rassa, J. C.; Meyers, J. L.; Zhang, Y.; Kudravalli, R., et al. (2002):

Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4.

Proc Natl Acad Sci U S A 99(4). S. 2281-2286.

Remes, S. T.; Iivanainen, K.; Koskela, H.; Pekkanen, J. (2003):

Which factors explain the lower prevalence of atopy amongst farmers' children?

Clin Exp Allergy 33(4). S. 427-434.

Ried, C.; Wahl, C.; Miethke, T.; Wellenhofer, G., et al. (1996):

High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant Limulus anti-lipopolysaccharide factor.

J Biol Chem 271(45). S. 28120-27.

Rietschel, E. T.; Brade, H.; Brade, L.; Kaca, W., et al. (1985):

Newer aspects of the chemical structure and biological activity of bacterial endotoxins.

Prog Clin Biol Res 189. S. 31-51.

Rietschel, E. T.; Wollenweber, H. W.; Russa, R.; Brade, H., et al. (1984):

Concepts of the chemical structure of lipid A.

Rev Infect Dis 6(4). S. 432-438.

Robertson, J.; Caldwell, J. R.; Castle, J. R.; Waldman, R. H. (1976):

Evidence for the presence of components of the alternative (properdin) pathway of complement activation in respiratory secretions.

J Immunol 117(3). S. 900-903.

Rylander, R. (1994):

Organic dusts--from knowledge to prevention.

Scand J Work Environ Health 20 Spec No. S. 116-122.

Rylander, R. (1997):

Confusion factors in risk assessment: coexistence of biological factors and chemicals.

Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi 18(6). S. 359-360.

Rylander, R. (2002):

Endotoxin in the environment--exposure and effects.

J Endotoxin Res 8(4). S. 241-252.

Schenker, M. B. (1998):

Respiratory health hazards in agriculture.

Am J Respir Crit Care Med 158. S. 1-76.

Schindler, S. (2005):

The use of species-specific ELISA's and bioassays for the purpose of detection pyrogenic contaminations. Dissertation
Institut für Tier- und Umwelthygiene des Fachbereichs Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin.

Schromm, A. B.; Brandenburg, K.; Loppnow, H.; Moran, A. P., et al. (2000):

Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion.
Eur J Biochem 267(7). S. 2008-2013.

Schulz, H. (2003):

Workshop: Aerosole in Medizin und Veterinärmedizin - Partikeldeposition.
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Inhalationsbiologie.
Neuherberg / München.
Pneumologie 2003. 57: S. 166-177.

Schumann, R. R.; Rietschel, E. T.; Loppnow, H. (1994):

The role of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein (LBP) in the activation of different cell types by endotoxin.
Med Microbiol Immunol (Berl) 183(6). S. 279-297.

Schwandner, R.; Dziarski, R.; Wesche, H.; Rothe, M., et al. (1999):

Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2.
J Biol Chem 274(25). S. 17406-9.

Schwartz, D. A. (2002):

TLR4 and LPS hyporesponsiveness in humans.
Int J Hyg Environ Health 205(3). S. 221-227.

Seaton, A.; MacNee, W.; Donaldson, K.; Godden, D. (1995):

Particulate air pollution and acute health effects.
Lancet 345(8943). S. 176-178.

Seedorf, J., Hartung, J., Schröder, M., Linkert, K.H., Pedersen, S. et al. (1998):

Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganismus in livestock buildings in Northern Europe.
J Agr Eng Res 70. S. 97-109.

Seedorf, J. et Hartung, J. (2000):

Workshop: Emission of Airborne Particulates from Animal Production.
Institute for Animal Hygiene and Animal Welfare of the School of Veterinary Medicine Hannover.
<http://www.agriculture.de/acms1/conf6/ws4dust.htm>. (02.07.2008)

- Seydel, U.; Oikawa, M.; Fukase, K.; Kusumoto, S., et al. (2000):
Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity.
Eur J Biochem 267(10). S. 3032-3039.
- Shimazu, R.; Akashi, S.; Ogata, H.; Nagai, Y., et al. (1999):
MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4.
J Exp Med 189(11). S. 1777-1782.
- Shoham, S.; Huang, C.; Chen, J. M.; Golenbock, D. T., et al. (2001):
Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to
Cryptococcus neoformans polysaccharide capsule.
J Immunol 166(7). S. 4620-4626.
- Soukup, J. M.; Becker, S. (2001):
Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with
insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin.
Toxicol Appl Pharmacol 171(1). S. 20-26.
- Spaan, S.; Wouters, I. M.; Oosting, I.; Doekes, G., et al. (2006):
Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries.
J Environ Monit 8(1). S. 63-72.
- Stetzenbach, L. D. (1997). Introduction to aerobiology. In: Hurst, C.J. (ed.). Manual of
environmental microbiology. Washington, D.C.
ASM Press. S. 619-628.
- Sukupolvi, S.; Vaara, M. (1989):
Salmonella typhimurium and Escherichia coli mutants with increased outer membrane
permeability to hydrophobic compounds.
Biochim Biophys Acta 988(3). S. 377-387.
- Taylor, A. H.; Heavner, G.; Nedelman, M.; Sherris, D., et al. (1995):
Lipopolysaccharide (LPS) neutralizing peptides reveal a lipid A binding site of LPS binding
protein.
J Biol Chem 270(30). S. 17934-38.
- Theegarten, D.; Sachse, K.; Mentrup, B.; Fey, K., et al. (2008):
Chlamydomphila spp. infection in horses with recurrent airway obstruction: similarities to
human chronic obstructive disease.
Respir Res 9. S. 14.
- Thomassen, M. J.; Meeker, D. P.; Antal, J. M.; Connors, M. J., et al. (1992):
Synthetic surfactant (Exosurf) inhibits endotoxin-stimulated cytokine secretion by human
alveolar macrophages.
Am J Respir Cell Mol Biol 7(3). S. 257-260.

Thorne, P. S.; Duchaine, C.; Douwes, J.; Eduard, W., et al. (2004):
Working Group report 4: exposure assessment for biological agents.
Am J Ind Med 46(4). S. 419-422.

Trojan, S. (2001):
Luftgetragene gramnegative Bakterienflora und luftgetragenes Endotoxin in Rinderställen.
Dissertation. Institut für Tier- und Umwelthygiene, FB Veterinärmedizin, FU Berlin.

Ulevitch, R. J.; Tobias, P. S. (1995):
Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.
Annu Rev Immunol 13. S. 437-457.

Underhill, D. M.; Ozinsky, A. (2002):
Toll-like receptors: key mediators of microbe detection.
Curr Opin Immunol 14(1). S. 103-110.

Valcin, M.; Henneberger, P. K.; Kullman, G. J.; Umbach, D. M., et al. (2007):
Chronic bronchitis among nonsmoking farm women in the agricultural health study.
J Occup Environ Med 49(5). S. 574-583.

Vandenbulcke, L.; Bachert, C.; Van Cauwenberge, P.; Claeys, S. (2006):
The innate immune system and its role in allergic disorders.
Int Arch Allergy Immunol 139(2). S. 159-165.

Vogelzang, P. F.; van der Gulden, J. W.; Preller, L.; Tielen, M. J., et al. (1997):
Bronchial hyperresponsiveness and exposure in pig farmers.
Int Arch Occup Environ Health 70(5). S. 327-333.

von Essen, S.; Robbins, R. A.; Thompson, A. B.; Rennard, S. I. (1990):
Organic dust toxic syndrome: an acute febrile reaction to organic dust exposure distinct from
hypersensitivity pneumonitis.
J Toxicol Clin Toxicol 28(4). S. 389-420.

von Mutius, E.; Braun-Fahrländer, C.; Schierl, R.; Riedler, J., et al. (2000):
Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development
of atopy.
Clin Exp Allergy 30(9). S. 1230-1234.

Wainwright, N. R., Miller, R.J., Paus, E., Novitsky, T.J., Fletcher, M.A., Mc Kenna, T.M. and
Williams, T. in Nowotny, A., Spitzer, J.J. and Ziegler, E.J. (1990):
Cellular and Molecular Aspects of Endotoxin Reactions.
Elsevier Science Publishers B.V., New York. S. 315-325.

Wang, Y.; Hollingsworth, R. I. (1996):

An NMR spectroscopy and molecular mechanics study of the molecular basis for the supramolecular structure of lipopolysaccharides.
Biochemistry 35(18). S. 5647-5654.

Wang, Z.; Larsson, K.; Palmberg, L.; Malmberg, P., et al. (1997):

Inhalation of swine dust induces cytokine release in the upper and lower airways.
Eur Respir J 10(2). S. 381-387.

Weber, S., Petsonk, E., Kullmann, G., Jones, W., Olenchok, G., Sorenson, W., Parker, J. (1990):

Hypersensitivity pneumonitis or organic dust toxic syndrome? The clinical dilemma in organic dust exposure.
Amer Rev respir Diss 141 (suppl) A 588.

Weigandt, M. (2000):

Der Humane Vollblut-Pyrogentest. Dissertation.
Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.

Werts, C.; Tapping, R. I.; Mathison, J. C.; Chuang, T. H., et al. (2001):

Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism.
Nat Immunol 2(4). S. 346-352.

Williams, L. K.; Ownby, D. R.; Maliarik, M. J.; Johnson, C. C. (2005):

The role of endotoxin and its receptors in allergic disease.
Ann Allergy Asthma Immunol 94(3). S. 323-332.

Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J., et al. (1990):

CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.
Science 249(4975). S. 1431-1433.

Wurfel, M. M.; Monks, B. G.; Ingalls, R. R.; Dedrick, R. L., et al. (1997):

Targeted deletion of the lipopolysaccharide (LPS)-binding protein gene leads to profound suppression of LPS responses ex vivo, whereas in vivo responses remain intact.
J Exp Med 186(12). S. 2051-2056.

Zanobetti, A.; Schwartz, J.; Dockery, D. W. (2000):

Airborne particles are a risk factor for hospital admissions for heart and lung disease.
Environ Health Perspect 108(11). S. 1071-1077.

Zimmermann, G. (1985):

Störende Substanzen bei der Endotoxinbestimmung mittels Limulustest und Möglichkeiten ihrer Ausschaltung.
Pharm Ind. 47. S. 203-207.

Zock, J. P.; Hollander, A.; Heederik, D.; Douwes, J. (1998):
Acute lung function changes and low endotoxin exposures in the potato processing industry.
Am J Ind Med 33(4). S. 384-391.

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.

Zucker, B.-A., Linsel, G., Fennrich, S., Kindinger, I., Hartung, T. and Müller, W. (2002):
Characterisation of organic dust exposure by using a human whole blood assay.
Landbauforschung Völkenrode 235. S. 125-128.

Zucker, B.-A. (2003). Luftgetragene Endotoxine in Tierställen. Konzentrationen, Quellen,
Umweltstabilität und Bewertung der Markerfunktion zur Beurteilung gesundheitlicher
Gefahren infolge organischer Staubbelastungen. Habilitation. Institut für Tier- und
Umwelthygiene. FB Veterinärmedizin. FU Berlin.

Zucker, B.-A., Linsel, G., Fennrich, S., Müller, W. (2004):
Die Charakterisierung der entzündungsauslösenden Potenz von Bioaerosolen mittels der
Interleukinfreisetzung aus humanem Vollblut
Gefahrstoffe-Reinhaltung der Luft 04-2004. S. 153.

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. 176-180.

9. Anhang

Tabellen 12 – 23

Tabelle 12.: Beschreibung der untersuchten Tierställe

Tierstall	Bauhülle	Belegdichte	Haltungstechnologie	Lüftung	Meßpunkt
Legehennen Stall 1	88x12m	8900 Tiere im Alter von 40 Wochen	Volierenhaltung auf Einstreu (Sägemehl)	Unterdrucklüftung	Unten: Scharraum Oben: Höhe: 2,5m (1,5m), seitl. Abstand zum Lüfter: 1,5m (4,5m)
Legehennen Stall 2, Stall 3	88x12m	8500 Tiere im Alter von 38-40 Wochen	Volierenhaltung auf Einstreu (Sägemehl)	Unterdrucklüftung	Mitte des Tierstalls unter der Lüftung
Broilereltern-tier-aufzucht	88x12m Leichtbauhülle	8350 Tiere im Alter von 16 Wochen	Bodenhaltung auf Einstreu (Sägemehl)	Unterdrucklüftung	Mitte des Tierstalls unter der Lüftung
Broilereltern-tier-haltung	88x12m Leichtbauhülle	6800 Tier im Alter von 40 Wochen	2-reihige Legenester auf Kotrosten in der Mitte des Stalls	Unterdrucklüftung	Mitte des Tierstalls unter der Lüftung
Schweinemast Stall 1	56x12m Rekonstruierter Stall	575 Tiere a 70kg	Gruppenhaltung auf Teilspaltenboden	Unterdrucklüftung	Wand Abluftseite Stallmitte, Meßhöhe: Einatembereich der Tiere
Schweinemast Stall 2	56x12m	560 Tiere a 70kg	Gruppenhaltung auf Teilspaltenboden	Unterdrucklüftung	Mittelgang, 1. Stalldriftel, Meßhöhe: Einatembereich der Tiere
Schweinemast Stall 3	56x12m	580 Tiere a 70kg	Gruppenhaltung auf Teilspaltenboden	Unterdrucklüftung	Mittelgang, Stallmitte Meßhöhe: Einatembereich der Tiere
Pferde Stall 1	38x15m, Massivbau	26 Tiere zw. 4 und 14 Jahren	Boxen mit Einstreu (Stroh, Späne)	Dachfirstlüftung	An Wand in Stallmitte, Meßhöhe: Einatembereich der Tiere
Pferde Stall 2	72x10m	24 Tiere zw. 4 und 25 Jahren	Boxen mit Einstreu (Stroh, Späne)	Fensterlüftung	An Wand in Stallmitte, Meßhöhe: Einatembereich der Tiere
Schafe	Massivbau 10x5m	6 Tiere	Laufstall mit Einstreu	Seitenfenster	Stallmitte
Milchkühe, großer Produktionsstall	157x36,5x3,8m Massivbau	800 Tiere zw. 2 und 5 Jahren	Einstreuloser Laufstall mit Liegeboxen, Spaltenboden im Laufbereich	Fenster, Tore, Firstöffnungen, 8 Lüfter	Mittlere Stallabteilung
Milchkühe, Abkalbestall	75x21x3,63m	70 Tiere zw. 2 und 5 Jahren	Laufstall mit Stroheinstreu	Fenster, Tore	Mittelgang

Tabelle 13: Einzelergebnisse der proinflammatorischen Aktivität auf Basis der IL-1 β -Ausschüttung der Mittelwerte der ohne und mit PB behandelten Bioaerosolproben aus den untersuchten Tierställen

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	Probenart	IL-1 β MW in EEU/m ³	log EEU/m ³ (IL-1 β)	s (IL-1 β) in EEU/m ³	relative s (IL-1 β)	IL-1 β +PB MW in EEU/m ³	log EEU/m ³ (IL-1 β +PB)	s (IL-1 β +PB) in EEU/m ³	relative s (IL-1 β +PB)	Reduktion %
Legehennen Stall 1	1	Ein. F. 1	12093,80	4,08	10261,90	0,85	907,10	2,96	427,60	0,47	92,50
	2	PM10 1	3886,70	3,53	1832,20	0,47	485,90	2,69	229,00	0,47	87,50
	3	PM10 2	1942,80	3,29	915,30	0,47	60,80	1,78	28,60	0,47	96,90
Legehennen Stall 2	4	Ein. F. 2	952,40	2,98	0,00	0,00	89,30	1,95	42,10	0,47	90,60
	5	PM10	611,20	2,79	96,00	0,16	59,50	1,77	36,00	0,60	90,30
Legehennen Stall 3	6	Ein. F.	434,80	2,64	263,50	0,61	54,40	1,74	32,90	0,60	87,50
	7	Ein. F. 1	7619,00	3,88	3592,10	0,47	3174,00	3,50	2694,10	0,85	58,30
	8	Ein. F. 2	6144,50	3,79	5213,50	0,85	1843,50	3,27	869,00	0,47	70,00
Broiler-Elterntier-Aufzucht	9	PM10 1	481,70	2,68	227,10	0,47	80,30	1,90	0,00	0,00	83,30
	10	Ein. F.	2267,60	3,36	1924,10	0,85	510,20	2,71	561,20	1,10	77,50
	11	PM10 2	521,80	2,72	245,90	0,47	65,20	1,81	30,80	0,47	87,50
Broiler-Elterntier-Haltung	12	PM10 1	787,60	2,90	-	-	49,20	1,69	-	-	93,80
	13	Ein. F.	1242,20	3,09	-	-	155,30	2,19	-	-	87,50
Schweinmast Stall 1	14	PM10 2	298,20	2,47	0,00	0,00	55,90	1,75	26,30	0,47	81,30
	15	Ein. F.	952,40	2,98	448,90	0,47	119,00	2,08	56,10	0,47	87,50
	16	PM10	685,70	2,84	323,30	0,47	114,30	2,06	0,00	0,00	83,30
Schweinmast Stall 2	17	PM10 1	85,70	1,93	40,40	0,47	10,70	1,03	5,00	0,47	87,60
	18	PM10 2	333,30	2,52	0,00	0,00	41,60	1,62	0,00	0,00	87,50
	19	Ein. F.	1269,80	3,10	0,00	0,00	317,50	2,50	0,00	0,00	75,00
Schweinmast Stall 3	20	Ein. F.	952,30	2,98	448,90	0,47	119,00	2,08	56,10	0,47	87,50
	21	PM10	1200,00	3,08	565,70	0,47	300,00	2,48	141,40	0,47	75,00
Pferde Stall 1	22	PM10 1	145,40	2,16	0,00	0,00	36,40	1,56	0,00	0,00	75,00
	23	Ein. F. 1	274,70	2,44	129,50	0,47	45,70	1,66	0,00	0,00	83,40
	24	Ein. F. 2	93,40	1,97	0,00	0,00	46,70	1,67	0,00	0,00	50,00

Fortsetzung Tabelle 13

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	Probenart	IL-1β MW in EEU/m ³	log EEU/m ³ (IL-1β)	s (IL-1β) in EEU/m ³	relative s (IL-1β)	IL-1β+PB MW in EEU/m ³	log EEU/m ³ (IL-1β+PB)	s (IL-1β+PB) in EEU/m ³	relative s (IL-1β+PB)	Reduktion %
Pferde Stall 2	25	Ein. F. 1	164,20	2,22	0,00	0,00	82,10	1,91	0,00	0,00	50,00
	26	PM10 1	59,60	1,78	0,00	0,00	5,60	0,75	2,60	0,46	90,70
	27	Ein. F. 2	41,10	1,61	0,00	0,00	15,40	1,19	7,20	0,47	62,50
	28	PM10 2	7,40	0,87	0,00	0,00	2,80	0,45	1,30	0,46	62,60
Schafe 1. Messung	29	PM10 1	58,00	1,76	0,00	0,00	7,30	0,86	0,00	0,00	87,50
	30	PM10 2	94,20	1,97	30,70	0,33	16,30	1,21	2,50	0,15	82,70
Schafe 2. Messung	31	PM10 1	175,40	2,24	82,70	0,47	8,30	0,92	8,90	1,07	95,30
	32	PM10 2	25,40	1,40	15,30	0,60	12,68	1,10	7,70	0,61	50,00
	33	Ein. F. 1	127,00	2,10	0,00	0,00	11,90	1,08	5,60	0,47	90,60
Milchkühe	34	Ein. F. 2	79,40	1,90	-	-	39,68	1,60	-	-	50,00
	35	PM10 1	16,40	1,21	17,80	1,09	4,50	0,65	3,90	0,87	72,30
	36	PM10 2	87,00	1,94	41,00	0,47	21,70	1,34	10,20	0,47	75,00
	37	Ein. F. 1	476,20	2,68	224,50	0,47	79,40	1,90	0,00	0,00	83,30
hochtragende Milchkühe	38	PM10 1	347,80	2,54	164,00	0,47	29,00	1,46	0,00	0,00	91,70
	39	Ein. F. 2	317,50	2,50	-	-	39,70	1,60	-	-	87,50
	40	PM10 2	402,30	2,60	243,80	0,61	39,50	1,60	45,70	1,16	90,20
Median	Gesamt		375,10	2,57	112,80	0,47	51,80	1,7	7,50	0,47	86,20
	Ein. F.		714,25	2,83	224,50	0,47	85,70	1,93	32,90	0,47	83,36
	PM10		315,75	2,50	82,70	0,47	37,95	1,58	5,00	0,47	87,50
Minimum	Gesamt		7,40	0,87	0,00	0,00	2,80	0,45	0,00	0,00	50,00
	Ein. F.		41,05	1,61	0,00	0,00	11,90	1,08	0,00	0,00	50,00
	PM10		7,40	0,87	0,00	0,00	2,80	0,45	0,00	0,00	50,00
Maximum	Gesamt		12093,80	4,08	10261,90	1,09	3174,00	3,50	2694,10	1,16	96,90
	Ein. F.		12093,80	4,08	10261,90	0,85	3174,00	3,50	2694,10	1,10	92,50
	PM10		3886,70	3,59	1832,20	1,09	485,90	2,69	229,00	1,16	96,90

Ein. F. = Einatembare Fraktion

MW: Mittelwert

s: Standardabweichung

Tabelle 14: Einzelergebnisse der Endotoxinbestimmung mittels LAL-Test der Bioaerosolproben in den untersuchten Tierställen

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	Probenart	Endotoxische Aktivität in EU/m ³	Endotoxische Aktivität In log EU/m ³
Legehennen Stall 1	1	Ein. F. 1	2252,40	3,35
	2	PM10 1	1275,30	3,11
	3	PM10 2	566,80	2,75
	4	Ein. F. 2	900,00	2,95
Legehennen Stall 2	5	PM10	430,80	2,63
	6	Ein. F.	1855,60	3,27
Legehennen Stall 3	7	Ein. F. 1	7698,40	3,89
	8	Ein. F. 2	8448,50	3,93
Broiler-Elterntier-Aufzucht	9	PM10 1	296,00	2,47
	10	Ein. F.	1156,50	3,06
	11	PM10 2	291,50	2,46
Broiler-Elterntier-Haltung	12	PM10 1	325,20	2,51
	13	Ein. F.	509,30	2,71
	14	PM10 2	137,90	2,14
Schweinemast Stall 1	15	Ein. F.	353,90	2,55
	16	PM10	297,10	2,47
Schweinemast Stall 2	17	PM10 1	57,80	1,76
	18	PM10 2	137,50	2,14
	19	Ein. F.	438,10	2,64
Schweinemast Stall 3	20	Ein. F.	442,80	2,65
	21	PM10	406,70	2,61
Pferde Stall 1	22	PM10 1	425,40	2,63
	23	Ein. F. 1	924,90	2,97
	24	Ein. F. 2	389,30	2,59
Pferde Stall 2	25	Ein. F. 1	266,80	2,43
	26	PM10 1	94,60	1,98
	27	Ein. F. 2	243,02	2,39
	28	PM10 2	171,80	2,24
Schafe 1. Messung	29	PM10 1	42,80	1,63
	30	PM10 2	91,30	1,96
Schafe 2. Messung	31	PM10 1	47,50	1,68
	32	PM10 2	5,04	0,70
	33	Ein. F. 1	77,70	1,89
	34	Ein. F. 2	96,84	1,99
Milchkühe	35	PM10 1	10,07	1,00
	36	PM10 2	46,40	1,67
hochtragende Milchkühe	37	Ein. F. 1	253,97	2,40
	38	PM10 1	137,68	2,14
	39	Ein. F. 2	174,60	2,24
	40	PM10 2	229,90	2,36
Median		Gesamt	293,75	2,47
		Ein. F.	440,45	2,64
		PM10	154,85	2,19
Minimum		Gesamt	5,04	0,70
		Ein. F.	77,70	1,89
		PM10	5,04	0,70
Maximum		Gesamt	8448,50	3,93
		Ein. F.	8448,50	3,93
		PM10	1275,30	3,11

Tabelle 15: Einzelergebnisse der proinflammatorischen Aktivität und der endotoxischen Aktivität pro mg luftgetragenen Staub in den untersuchten Tierställen

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	Probenart	EEU/mg luftgetragenen Staub	log EEU/mg	EU/mg luftgetragenen Staub	log EU/mg
Legehennen Stall 1	1	Ein. F. 1	1379,30	3,14	256,90	2,41
	2	PM10 1	721,80	2,86	236,84	2,37
	3	PM10 2	738,50	2,87	215,38	2,33
	4	Ein. F. 2	250,00	2,39	236,25	2,37
Legehennen Stall 2	5	PM10	135,85	2,13	95,75	1,98
	6	Ein. F.	44,40	1,65	189,68	2,27
Legehennen Stall 3	7	Ein. F. 1	363,60	2,56	367,42	2,56
	8	Ein. F. 2	317,46	2,50	436,50	2,64
Broiler-Elterntier-Aufzucht	9	PM10 1	400,00	2,60	245,83	2,39
	10	Ein. F.	714,30	2,85	364,29	2,56
	11	PM10 2	150,00	2,17	83,81	1,92
Broiler-Elterntier-Haltung	12	PM10 1	363,60	2,56	148,86	2,17
	13	Ein. F.	285,70	2,45	117,14	2,06
	14	PM10 2	228,60	2,36	105,71	2,02
Schweinemast Stall 1	15	Ein. F.	300,00	2,47	111,50	2,04
	16	PM10	263,70	2,42	114,29	2,05
Schweinemast Stall 2	17	PM10 1	67,42	1,83	45,45	1,65
	18	PM10 2	153,85	2,18	63,46	1,80
	19	Ein. F.	285,70	2,45	98,57	1,99
Schweinemast Stall 3	20	Ein. F.	400,00	2,60	186,00	2,27
	21	PM10	888,80	2,95	300,00	2,47
Pferde Stall 1	22	PM10 1	800,00	2,90	1683,30	3,22
	23	Ein. F. 1	500,00	2,69	2340,00	3,37
	24	Ein. F. 2	166,60	2,22	695,00	2,84
Pferde Stall 2	25	Ein. F. 1	250,00	2,39	406,25	2,61
	26	PM10 1	363,60	2,56	577,27	2,76
	27	Ein. F. 2	62,50	1,79	370,00	2,57
	28	PM10 2	19,20	1,28	448,08	2,65
Schafe 1. Messung	29	PM10 1	800,00	2,90	590,00	2,77
	30	PM10 2	1300,00	3,11	1260,00	3,10
Schafe 2. Messung	31	PM10 1	2400,00	3,38	650,00	2,81
	32	PM10 2	583,30	2,76	115,83	2,06
	33	Ein. F. 1	2000,00	3,30	1225,00	3,09
	34	Ein. F. 2	833,30	2,92	411,66	2,61
Milchkühe	35	PM10 1	383,30	2,58	233,30	2,36
	36	PM10 2	750,00	2,87	400,00	2,60
hochtragende Milchkühe	37	Ein. F. 1	500,00	2,69	266,60	2,42
	38	PM10 1	923,00	2,96	365,38	2,56
	39	Ein. F. 2	333,00	2,52	183,30	2,26
	40	PM10 2	615,00	2,78	615,4	2,79
Median		Ein. F.	325,23	2,51	315,45	2,50
		PM10	491,65	2,69	241,34	2,38
Minimum		Ein. F.	44,40	1,64	98,57	1,99
		PM10	19,20	1,28	45,45	1,65
Maximum		Ein. F.	2000,00	3,30	2340,00	3,37
		PM10	2400,00	3,38	1683,30	3,22

Tabelle 16: Bewertung der Bioaerosolproben durch den LAL-Test

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	Probenart	EU/m ³ / EEU/m ³	EEU/m ³ / EU/m ³
Legehennen Stall 1	1	Ein. F. 1	0,2	5,4
	2	PM10 1	0,3	3,0
	3	PM10 2	0,3	3,4
	4	Ein. F. 2	0,9	1,1
Legehennen Stall 2	5	PM10	0,7	1,4
	6	Ein. F.	4,3	0,2
Legehennen Stall 3	7	Ein. F. 1	1,0	1,0
	8	Ein. F. 2	1,4	0,7
Broiler-Elterntier- Aufzucht	9	PM10 1	0,6	1,6
	10	Ein. F. 1	0,5	2,0
	11	PM10 2	0,6	1,8
Broiler-Elterntier- Haltung	12	PM10 1	0,4	2,4
	13	Ein. F.	0,4	2,4
	14	PM10 2	0,5	2,2
Schweinemast Stall 1	15	Ein. F.	0,4	2,7
	16	PM10	0,4	2,3
Schweinemast Stall 2	17	PM10 1	0,7	1,5
	18	PM10 2	0,4	2,4
	19	Ein. F.	0,3	2,9
Schweinemast Stall 3	20	Ein. F.	0,5	2,2
	21	PM10	0,3	3,0
Pferde Stall 1	22	PM10 1	2,9	0,3
	23	Ein. F. 1	3,4	0,3
	24	Ein. F. 2	4,2	0,2
Pferde Stall 2	25	Ein. F. 1	1,6	0,6
	26	PM10 1	1,6	0,6
	27	Ein. F. 2	5,9	0,2
	28	PM10 2	23,2	0,0
Schafe 1. Messung	29	PM10 1	0,7	1,4
	30	PM10 2	1,0	1,0
Schafe 2. Messung	31	PM10 1	0,3	3,7
	32	PM10 2	0,2	5,0
	33	Ein. F. 1	0,6	1,6
	34	Ein. F. 2	1,2	0,8
Milchkühe	35	PM10 1	0,6	1,6
	36	PM10 2	0,5	1,9
hochtragende Milchkühe	37	Ein. F. 1	0,5	1,9
	38	PM10 1	0,4	2,5
	39	Ein. F. 2	0,5	1,8
	40	PM10 2	0,6	1,7
Median			0,6	1,7
Minimum			0,2	0,0
Maximum			23,2	5,4

Ein. F.: Einatembare Fraktion

Tabelle 17: Einzelergebnisse der Staubkonzentration in den untersuchten Tierställen

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	Probenart	Staubkonzentration in mg/m ³	Staubkonzentration in log mg/m ³
Legehennen Stall 1	1	Ein. F. 1	8,77	0,94
	2	PM10 1	5,38	0,73
	3	PM10 2	2,63	0,42
	4	Ein. F. 2	3,81	0,58
Legehennen Stall 2	5	PM10	4,50	0,65
	6	Ein. F.	9,79	0,99
Legehennen Stall 3	7	Ein. F. 1	20,95	1,32
	8	Ein. F. 2	19,36	1,29
Broiler-Elterntier-Aufzucht	9	PM10 1	1,20	0,08
	10	Ein. F.	3,17	0,50
	11	PM10 2	2,17	0,34
Broiler-Elterntier-Haltung	12	PM10 1	4,35	0,64
	13	Ein. F.	3,48	0,54
	14	PM10 2	1,30	0,12
Schweinemast Stall 1	15	Ein. F.	3,17	0,50
	16	PM10	2,60	0,42
Schweinemast Stall 2	17	PM10 1	1,27	0,10
	18	PM10 2	2,17	0,34
	19	Ein. F.	4,44	0,65
Schweinemast Stall 3	20	Ein. F.	2,38	0,38
	21	PM10	1,35	0,13
Pferde Stall 1	22	PM10 1	0,18	-0,74
	23	Ein. F. 1	0,55	0,26
	24	Ein. F. 2	0,56	0,25
Pferde Stall 2	25	Ein. F. 1	0,66	0,18
	26	PM10 1	0,16	-0,79
	27	Ein. F. 2	0,66	0,18
	28	PM10 2	0,39	-0,41
Schafe 1. Messung	29	PM10 1	0,07	1,14
	30	PM10 2	0,07	1,14
Schafe 2. Messung	31	PM10 1	0,07	1,14
	32	PM10 2	0,04	1,36
	33	Ein. F. 1	0,06	-1,20
	34	Ein. F. 2	0,10	-1,02
Milchkühe	35	PM10 1	0,04	1,37
	36	PM10 2	0,12	0,94
hochtragende Milchkühe	37	Ein. F. 1	0,95	0,02
	38	PM10 1	0,38	0,42
	39	Ein. F. 2	0,95	0,02
	40	PM10 2	0,65	0,18
Median		Ein. F.	2,77	0,44
		PM10	0,93	-0,52
Minimum		Ein. F.	0,06	-1,20
		PM10	0,04	-1,37
Maximum		Ein. F.	20,95	1,32
		PM10	5,38	0,73

Ein. F.: Einatembare Fraktion

Tabelle 18: aerobe Gesamtkoloniezahl in den untersuchten Tierställen

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	aerobe GKZ in KbE/m³	aerobe GKZ in log KbE/m³
Legehennen Stall 1 1. Messung	1	6,5x10 ⁴	4,81
Legehennen Stall 1 2. Messung	2	1,1x10 ⁵	5,04
Legehennen Stall 2	3	1,0x10 ⁶	6,00
Legehennen Stall 3 1. Messung	4	1,1x10 ⁷	7,04
Legehennen Stall 3 2. Messung	5	1,4x10 ⁷	7,15
Broiler-Elterntier- Aufzucht	6	2,4x10 ⁶	6,38
Broiler-Elterntier- Haltung	7	1,6x10 ⁶	6,20
Schweinemast Stall 1	8	7,9x10 ⁴	4,89
Schweinemast Stall 2	9	5,8x10 ⁴	4,76
Schweinemast Stall 3	10	4,0x10 ⁵	5,60
Pferde Stall 1	11	2,5x10 ⁴	4,39
Pferde Stall 2	12	6,0x10 ³	3,78
Schafe 1. Messung	13	4,5x10 ⁵	5,65
Schafe 2. Messung	14	1,4x10 ⁵	5,15
Milchkühe	15	1,1x10 ⁵	5,04
hochtragende Milchkühe	16	7,4x10 ⁴	4,87

GKZ: Gesamtkoloniezahl

KbE: Kolonie bildende Einheiten

Tabelle 19: Einzelergebnisse der proinflammatorischen Aktivität auf Basis der IL-6-Ausschüttung ausgewählter Bioaerosolproben

Tierart /Stall	Lfd. Nr.	Probenart	IL-6 MW in EEU/m ³	IL-6 MW in log EEU/m ³	s (IL-6 in EEU/m ³)	relative s (IL-6)	IL-6 +PB MW in EEU/m ³	IL-6 +PB MW in log EEU/m ³	s (IL-6+PB in EEU/m ³)	relative s (IL-6+PB)	Reduktion %
Legehennen Stall 1	1	Ein. F. 1	8677,00	3,94	5430,23	0,63	1530,00	3,10	1309,49	0,86	82,40
	2	PM10 1	5457,00	3,74	387,92	0,07	402,00	2,60	339,27	0,84	92,60
	3	PM10 2	1343,00	3,13	67,32	0,05	96,00	1,98	21,43	0,22	92,80
Legehennen Stall 2	4	Ein. F. 2	1429,00	3,16	673,45	0,47	268,00	2,43	294,65	1,10	81,30
	5	PM10	2037,00	3,31	960,39	0,47	340,00	2,53	0,00	0,00	83,30
Legehennen Stall 3	6	Ein. F.	1491,00	3,17	1405,45	0,94	280,00	2,45	43,91	0,16	81,30
	7	Ein. F. 1	10159,00	4,01	0,00	0,00	1904,00	3,28	898,03	0,47	81,30
Broiler-Elterntier-Aufzucht	8	Ein. F. 2	14747,00	4,17	6951,57	0,47	3686,50	3,57	1738,78	0,47	75,00
	9	PM10 1	1316,00	3,12	408,64	0,31	165,00	2,22	51,12	0,31	87,50
	10	Ein. F. 1	5833,00	3,77	970,15	0,17	1145,00	3,06	721,53	0,63	80,40
Broiler-Elterntier-Haltung	11	PM10 2	696,00	2,84	-	-	87,00	1,94	-	-	87,50
	12	PM10 1	985,00	2,99	-	-	246,00	2,39	-	-	75,00
	13	Ein. F.	1242,00	3,09	-	-	155,00	2,19	-	-	87,50
Schweinemast Stall 1	14	PM10 2	596,00	2,78	-	-	75,00	1,88	-	-	87,50
	15	Ein. F.	1269,80	3,10	0,00	0,00	158,70	2,20	0,00	0,00	87,50
	16	PM10	914,30	2,96	0,00	0,00	288,60	2,46	0,00	0,00	68,44
Schweinemast Stall 2	17	Ein. F.	1905,00	3,28	756,46	0,40	198,00	2,30	168,29	0,85	89,60
	18	PM10	1600,70	3,20	-	-	200,80	2,30	-	-	87,50
Pferde Stall 1	19	PM10	872,70	2,94	411,39	0,47	36,40	1,56	-	-	95,80
	20	Ein. F.	366,30	2,56	0,00	0,00	68,65	1,84	32,46	0,47	81,30
Pferde Stall 2	21	PM10	59,60	1,77	0,00	0,00	11,15	1,05	5,30	0,47	81,30
	22	Ein. F.	205,10	2,31	173,80	0,85	30,75	1,49	14,50	0,47	85,00
Median			1329,73	3,12	398,28	0,24	181,48	2,26	38,18	0,47	84,15
Minimum			59,60	1,77	0,00	0,00	11,15	1,05	0,00	0,00	68,44
Maximum			14747,00	4,17	6951,57	0,94	3686,50	3,57	1738,78	1,10	95,80

Ein. F.: Einatembare Fraktion

MW: Mittelwert

s: Standardabweichung

Tabelle 20: Einzelergebnisse der proinflammatorischen Aktivität ohne und mit PB-Zusatz der untersuchten Bioaerosolquellen

Tierart / Stall	Lfd. Nr.	Probenart	IL-1 β MW in EEU/mg	IL-1 β in log EEU/mg	S (IL-1 β MW in EEU/mg)	relative s	IL1 β +PB MW in log EEU/mg	S (IL-1 β +PB MW in EEU/mg)	relative s	Reduktion in %
Legehennen Stall 3	1	Futter	10,00	1,00	8,50	0,85	0,18	0,70	0,47	85,00
	2	Einstreu	52,00	1,72	17,00	0,33	0,41	1,90	0,73	95,00
	3	Kot	112,00	2,05	67,90	0,61	0,85	4,20	0,60	93,75
Pferde Stall 1	4	Hafer	40,00	1,60	0,00	0,00	0,88	3,50	0,47	81,25
	5	Kot	320,00	2,50	0,00	0,00	1,90	0,00	0,00	75,00
	6	Heu	100,00	2,00	-	-	1,40	-	-	75,00
Schafe	7	Stroh	100,00	2,00	-	-	1,40	-	-	75,00
	8	Einstreu	192,00	2,28	90,5	0,47	1,08	5,70	0,48	93,80
	9	Kot	64,00	1,81	0,00	0,00	1,51	0,00	0,00	50,00
Milchkühe	10	Heu	256,00	2,41	0,00	0,00	1,30	17,00	0,85	92,20
	11	Kot	1536,00	3,19	724,10	0,47	1,60	33,90	0,85	97,40
	12	Futter	48,00	1,68	45,3	0,94	1,26	2,80	0,16	62,50
hochtragende Milchkühe	13	Einstreu	128,00	2,11	0,00	0,00	1,08	5,70	0,48	90,60
Median			100,00	2,00	8,50	0,33	1,26	3,50	0,48	85,00
Minimum			10,00	1,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00	50,00
Maximum			1536,00	3,19	724,10	0,94	1,90	33,90	0,85	97,40

MW: Mittelwert

s: Standardabweichung

Tabelle 21: Endotoxische Aktivität ermittelt im LAL-Test der untersuchten Bioaerosolquellen

Tierart / Stall	Lfd. Nr.	Probenart	Endotoxin-konzentration in EU/mg	Endotoxin-konzentration in log EU/mg
Legehennen Stall 3	1	Futter	3,05	0,48
	2	Einstreu	28,00	1,44
	3	Kot	45,50	1,65
Pferde Stall 1	4	Hafer	48,50	1,68
	5	Kot	1240,00	3,09
	6	Heu	136,50	2,13
	7	Stroh	439,50	2,64
Schafe	8	Einstreu	3,83	0,58
	9	Kot	31,00	1,49
	10	Heu	395,50	2,59
Milchkühe	11	Kot	410,00	2,61
	12	Futter	20,20	1,30
hochtragende Milchkühe	13	Einstreu	41,20	1,61
Median			45,50	1,66
Minimum			3,05	0,48
Maximum			1240,00	3,09

Tabelle 22: Übersicht über die Konzentration an Staubinhalstoffen in der einatembaren Staubbfraktion und Vergleich mit Literaturquellen:

Nutzungsrichtung	Konzentration an proinfl. aktiven Stoffen in EEU/m ³	Endotoxinkonzentration in EU/m ³	Staubkonzentration in mg/m ³	aerobe Bakterienkonzentration in KbE/m ³
Legehennen n=5	434,8 – 12094 Median: 6144,5	900 - 8448,5 Median: 2252,4	3,81 - 20,95 Median: 9,79	6,5x10 ⁴ – 1,4x10 ⁷ Median: 1,0x10 ⁶
	1242,2 – 2268 Median: 1754,9	Radon et al., 2002: 2576 EU/m ³ Spaan et al., 2006: 2140 EU/m ³	Seedorf et Hartung, 2000: 10 mg/m ³ Radon et al., 2002: 7 mg/m ³ Spaan et al., 2006: 3,6 mg/m ³	Zucker et al., 2000: 10 ⁴ KbE/m ³ Radon et al., 2002: 7,9x10 ⁷ KbE/m ³
Broiler n=2	1242,2 – 2268 Median: 1754,9	509,3 – 1156,5 Median: 832,9	3,17 – 4,35 Median: 3,76	1,6x10 ⁶ – 2,4x10 ⁶ Median: 2,0x10 ⁶
	952,3 – 1270 Median: 952,4	354 – 442,8 Median: 438,1	2,38 – 4,44 Median: 3,17	5,8x10 ⁴ – 4,0x10 ⁵ Median: 7,9x10 ⁴
Schweinemast n=3	Zucker et al., 2004: 560 EEU/m ³	Radon et al., 2002: 763 EU/m ³ Zucker et al., 2004: 788 EU/m ³ Spaan et al., 2006: 1510 EU/m ³	Fennrich et al., 2001: 3,1 mg/m ³ Radon et al., 2002: 5,0 mg/m ³ Spaan et al., 2006: 2,6 mg/m ³	Zucker et al., 2000: 1,75x10 ⁵ KbE/m ³ Radon et al., 2002: 5,8x10 ⁶ KbE/m ³
	41,05 – 274,7 Median: 128,8	243 – 925 Median: 328,1	0,55 – 0,66 Median: 0,61	6,0x10 ³ – 2,5x10 ⁴ Median: 1,55x10 ⁴
Schafe n=2	79,4 – 127,0 Median: 103,2	77,7 – 96,84 Median: 87,3	0,06 – 0,10 Median: 0,08	1,4x10 ⁵
	Zucker et al., 2004: 1387 EEU/m ³	Fennrich et al., 2001: 512 EU/m ³ Zucker et al., 2004: 304 EU/m ³	Fennrich et al., 2001: 0,5 mg/m ³	Fennrich et al., 2001: 4,0x10 ⁴ KbE/m ³
Milchkühe n=2	317,5 – 476,2 Median: 396,8	174,6 – 254 Median: 214,3	0,95	7,4x10 ⁴
		Spaan et al., 2006: 560 EU/m ³	Seedorf et Hartung, 2000: 1,2 mg/m ³ Spaan et al., 2006: 1,3 mg/m ³	Zucker et al., 2000: 1,9x10 ⁴ KbE/m ³

n = Anzahl der Messungen

Tabelle 23: Übersicht über die Konzentration an Staubinhaltsstoffen in der PM10-Staubfraktion bei den untersuchten Nutzungsrichtungen:

Nutzungsrichtung	Konzentration an proinfl. aktiven Stoffen in EEU/m ³	Endotoxinkonzentration in EU/m ³	Staubkonzentration in mg/m ³	aerobe Bakterienkonzentration in KbE/m ³
Legehennen n=3	611,2 – 3886,7 Median: 1942,8	430,8 – 1275,3 Median: 566,8	2,63 – 5,38 Median: 4,5	6,5x10 ⁴ – 1,4x10 ⁷ Median: 1,0x10 ⁶
Broiler n=4	298,2 – 787,6 Median: 501,8	137,9 – 325,2 Median: 293,8	1,20 – 3,48 Median: 1,74	1,6x10 ⁶ – 2,4x10 ⁶ Median: 2,0x10 ⁶
Schweinemast n=4	85,7 – 1200,0 Median: 509,5	57,8 – 406,7 Median: 217,3	1,27 – 2,60 Median: 1,76	5,8x10 ⁴ – 4,0x10 ⁵ Median: 7,9x10 ⁴
Pferde n=4	7,4 – 145,4 Median: 59,6	94,6 – 425,4 Median: 171,8	0,16 – 0,39 Median: 0,18	6,0x10 ³ – 2,5x10 ⁴ Median: 1,55x10 ⁴
Schafe n=4	25,4 – 175,4 Median: 76,1	5,04 – 91,3 Median: 34,5	0,04 – 0,07 Median: 0,07	1,4x10 ⁵
Milchkühe n=4	16,4 – 402,3 Median: 217,4	10,07 – 229,9 Median: 92,0	0,04 – 0,65 Median: 0,24	7,4x10 ⁴

n = Anzahl der Messungen

Liste von einigen vorab veröffentlichten Ergebnissen

Poster:

Eckardt, Kathrin:

Proinflammatorische Aktivität von Bioaerosolen: Bedeutung von Endotoxinen.

1. Doktoranden-Symposium. Berlin, 23.6.2006

Berlin: Mensch und Buch, 2006. - S. 36

ISBN:3-89820-793-5

Zucker, B. A.; 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

Vortrag:

Eckardt, Kathrin:

Charakterisierung der endotoxinbedingten proinflammatorischen Aktivität von Bioaerosolen aus Tierställen.

2. Doktoranden-Symposium. Berlin, 8.6.2007

Berlin: Mensch und Buch, 2007. - S. 11

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

Hiermit möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer Herr PD Dr. B.-A. Zucker für die Überlassung des Themas sowie für die engagierte wissenschaftliche Betreuung und seine fachliche Unterstützung bei der Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt ebenso den Mitarbeitern des Instituts für Tier- und Umwelthygiene des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, insbesondere Frau S. Hinz und Frau K. Fiedler, für die stets freundliche und tatkräftige Unterstützung und das nette Arbeitsklima.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. G. Linsel und Frau K. Klug von der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin für die hilfsbereite Zusammenarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau A. Lüdecke vom Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung für die sehr engagierte Hilfestellung bei der statistischen Auswertung des Datenmaterials.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Enrico Lehmann bedanken, der mir die gesamte Arbeit über persönlich den Rücken gestärkt hat, mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat und mir immer zur Seite stand. Vielen Dank für Deine außerordentliche Geduld mit mir! Auf Dich ist immer Verlass! Meiner kleinen Tochter Johanna danke ich für ihre stetige Gesundheit, ohne die ein schnelles Vorankommen der Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Du zauberst mir immer ein Lächeln auf die Lippen und gibst mir Kraft!

Nicht zuletzt bedanke ich mich herzlich bei meiner gesamten Familie, vor allem meinen Eltern und meiner Oma, und bei meinen Freunden, insbesondere Solveig Müller, die mich zu jeder Zeit und in allen Lebenslagen unterstützten, motivierten und immer für mich da waren. Vielen, vielen Dank!!!

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Kathrin Eckardt, die vorliegende Arbeit selbständig und nur auf Grundlagen der angegebenen Hilfsmittel und Literaturquellen verfasst zu haben.

Kathrin Eckardt
Berlin, den 11. August 2008