

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Charakterisierung luftgetragener Toxine und Entwicklung
von Standard/Referenzmaterialien zum Aufbau eines auf
humanem Vollblut basierenden IPT-Bioindikators zur
Erfassung luftgetragener Kontaminationen**

von

Thomas Hartung

Fachbereich Biologie, Lehrstuhl für Biochemische Pharmakologie

Universität Konstanz

Förderkennzeichen: ZO3W 23001

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit
Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Dezember 2006

Zusammenfassung

Der In vitro Pyrogen Test zur Erfassung der pyrogenen Belastung von Atemluft beruht auf der Freisetzung des Fieber vermittelnden Zytokins Interleukin-1 β in menschlichem Blut bei Kontakt mit einem mit Luftpartikeln beaufschlagtem Filter.

Ziele des vorliegenden Projekts waren der Nachweis, dass verschiedenartige luftgetragene Toxine durch das Messsystem erfasst werden und die Charakterisierung der Reaktion des Systems auf diese Toxine, die Herstellung von Standard- und Referenzmaterialien und die Standardisierung und Optimierung des Messsystems für die Erfassung luftgetragener Toxine in der Atemluft.

Wir konnten zeigen, dass Lipopolysaccharide verschiedener Gram-negativer Bakterien trotz unterschiedlicher immunstimulatorischer Potenz sehr einheitliche Wirkspektren in Bezug auf die Zytokininduktion in menschlichem Blut haben. Ein anderes aber genauso einheitliches Zytokinmuster induzierten die Lipoteichonsäuren Gram-positiver Bakterien. Auch Schimmelpilzsporen verschiedener Spezies riefen in diesem System die Freisetzung von Zytokinen hervor.

Durch einen Vergleich der neu entwickelten Messmethode mit dem herkömmlichen Limulus Amoebocyten Lysat Test, welcher von den oben genannten luftgetragenen Toxinen nur die Lipopolysaccharide erfasst, konnte demonstriert werden, dass dieser dem In vitro Pyrogen Test auch durch seine Beschränkung auf die Erfassung von gelösten Molekülen stark nachsteht, da Lipopolysaccharide offenbar stark an die Sammelmateriale binden und nur ein Teil in Lösung gebracht werden kann.

Ein Vergleich der Immunreaktion von Lungenepithelzellen und Alveolarmakrophagen auf verschiedene luftgetragene Toxine ergab, dass die Reaktion des menschlichen Blutes am besten die der Alveolarmakrophagen widerspiegelt.

Der Vergleich des Blutes verschiedener Spender ergab, dass weder verschiedene bekannte Rezeptor-Polymorphismen noch das Geschlecht ihre Reaktionsfähigkeit auf die Immunstimuli bestimmen. Obwohl es Unterschiede in der interindividuellen Signalthöhe gibt, ist sowohl die Sensitivität auf die Stimuli wie auch die relative Reaktion auf verschiedene Stimuli hoch konserviert. Daher muss keine Vorauswahl an gesunden Blutspendern getroffen werden. Als Alternative zu frischem Blut kann kryokonserviertes Blut eingesetzt werden. Als Referenzmaterial wurde ein standardisierter, gemahlener Schweinestallstaub charakterisiert und eingesetzt.

Anhand von Feldversuchen und anhand eines Windkanals konnte die Beaufschlagung der Pall-Monitore unter standardisierten Bedingungen optimiert und

charakterisiert werden. Es wurde festgestellt, dass die Geometrie des gegenwärtig genutzten Monitors keine klassierenden Effekte auf Staubpartikel der relevanten Größen hat.

1. Charakterisierung der Zytokinfreisetzung von humanem Vollblut in Antwort auf verschiedene luftgetragene Toxine

Ziel des ersten Teils des Projekts war die Untersuchung des Beitrags verschiedener luftgetragener Toxine zur entzündlichen Reaktion des Blutes.

1.1 Lipopolysaccharide aus Gram-negativen Bakterien

Dazu wurde die relative Potenz verschiedener Lipopolysaccharide von Gram-negativen Bakterien bezüglich ihrer Zytokin-Induktion in humanem Vollblut untersucht. Die Konzentrationen an Lipopolysacchariden wurden so gewählt, dass alle in gleichem Maße die Freisetzung des pro-entzündlichen Zytokins $\text{TNF}\alpha$ in menschlichem Blut bewirkten. Die dazu benötigten Konzentrationen unterschieden sich zwar um einen Faktor 50, interessanterweise wurde aber bei dieser Einstellung auf die gleiche Potenz bezüglich $\text{TNF}\alpha$ auch die gleiche Menge verschiedener anderer Zytokine ausgeschüttet. Diese Beobachtung legt nahe, dass die Lipopolysaccharide der Gram-negativen Bakterien allgemein, bis auf mögliche Ausnahmen, das gleiche Wirkspektrum haben aber von unterschiedlicher biologischer Potenz sind (Abb. 1.1).

1.2 Lipoteichonsäuren aus Gram-positiven Bakterien

Im gleichen Experiment wurde auch Lipoteichonsäure, das Gegenstück in Gram-positiven Bakterien zum Lipopolysaccharid der Gram-negativen Bakterien, eingesetzt. Die Konzentration an Lipoteichonsäure wurde auch so gewählt, dass die gleiche Menge an $\text{TNF}\alpha$ freigesetzt wurde, wie durch die Lipopolysaccharide. Bei der Messung anderer Zytokine aus den gleichen Proben wurde deutlich, dass die Lipoteichonsäure ein anderes Zytokinmuster induziert als die Lipopolysaccharide. Insbesondere war die Lipoteichonsäure unter diesen Bedingungen im Stande eine höhere Freisetzung von Chemokinen, d.h. Signalstoffen, die weitere Immunzellen an den Infektionsherd anlocken, freizusetzen (Abb.1.1). Diese Ergebnisse trugen bereits zu zwei Veröffentlichungen bei:

Sonja von Aulock, Stephanie Traub, Katja Gueinzus, Ralf Schumann, Eva Lorenz, Corinna Hermann, and Thomas Hartung: Heterozygous Toll-Like Receptor 2 Polymorphism Does Not Affect Lipoteichoic Acid-Induced Chemokine and Inflammatory Responses. *Infection and Immunity*, 2004, 72:1828-1831.

Sonja von Aulock, Siegfried Morath, Sylvia Knapp, Kok P. M. van Kessel, Jos A. G. van Strijp, and Thomas Hartung: Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus for neutrophil recruitment. *Immunobiology* (2003) 4:413-422.

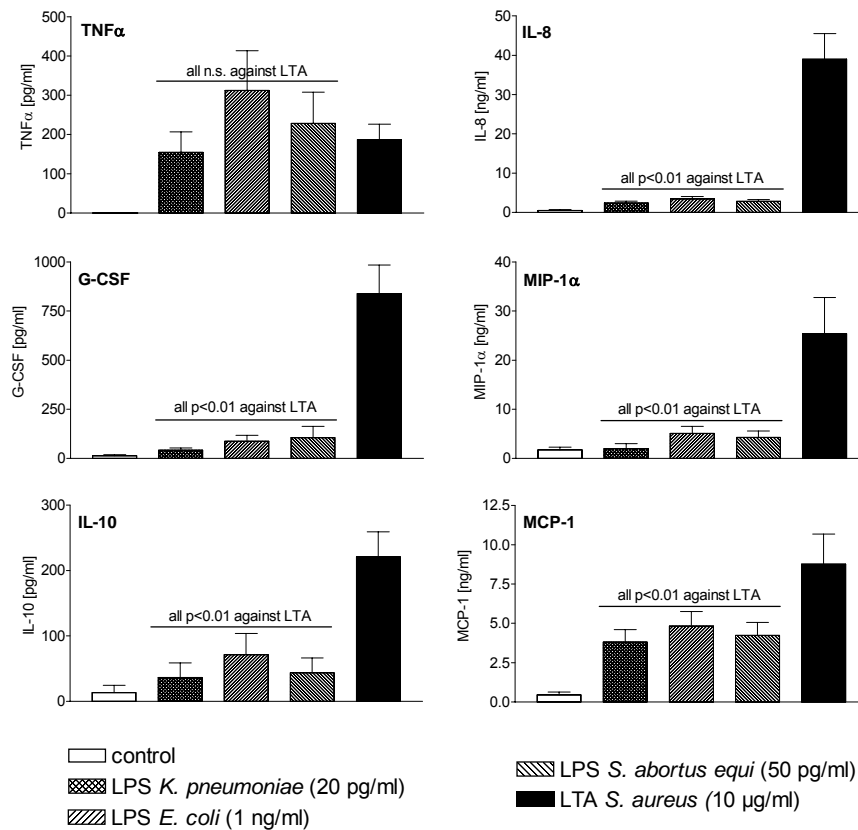


Abb. 1.1: LTA induziert eine höhere Freisetzung von Chemokinen und anti-inflammatorischen Zytokinen als 4 verschiedene Lipopolysaccharide in Konzentrationen welche die gleiche Menge TNF α freisetzen. Mediatoren wurden in Vollblutüberständen mittels ELISA gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von 7 gesunden Spendern in einem von drei ähnlichen Experimenten.

Dieses Muster bestätigte sich auch für Lipoteichonsäuren verschiedener Bakterien (Abb. 1.2). Ihnen gemein war auch, dass sie im Vergleich zu Lipopolysaccharid sehr schwache Induktoren des proentzündlichen IFN γ waren.

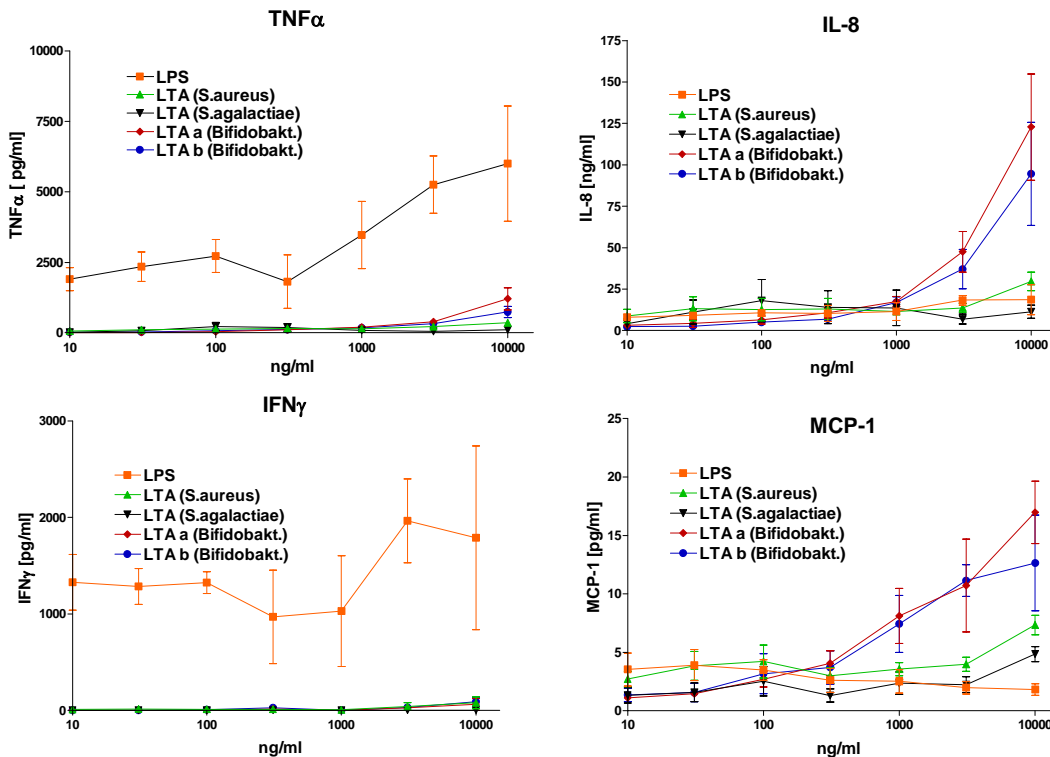


Abb. 1.2: Konzentrations-Wirkungskurven von verschiedenen LTA Präparationen verschiedener Bakterienstämme im Vergleich zu LPS (*S. abortus equi*). Mediatoren wurden in Vollblutüberständen mittels ELISA gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von 3 gesunden Spendern in einem von zwei ähnlichen Experimenten.

1.3 Schimmelpilze

Neben Bakterien und ihren Bestandteilen können auch Pilzsporen in der Luft verteilt werden. Diese haben eine Größenverteilung zwischen 0,5 und 10 μm und können somit auch eingeatmet werden und zum Teil bis in die Lungenbläschen vorstoßen. Pilzkulturen aus Umweltproben wurden uns vom Landesgesundheitsamt in Stuttgart zur Verfügung gestellt. Diese wurden weiterkultiviert und die gebildeten Sporen geerntet. Einige Pilze wurden auch auf verschiedenen Nährmedien kultiviert. Die Sporen wurden gezählt und mikroskopisch ausgemessen. Die Freisetzung verschiedener Zytokine im Vollblut wurde für eine Reihe von verschiedenen Sporenarten charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass die Immunstimulation durch die Sporen weniger von ihrer Anzahl und mehr durch ihre Oberfläche bestimmt wurde. Auch auf gleiche Oberflächen normiert induzierten die Pilzsporen jedoch Zytokinmuster, die sich von Lipopolysacchariden und Lipoteichonsäuren unterschieden. Auch innerhalb und zwischen den verschiedenen Spezies gab es

klare Unterschiede bezüglich des induzierten Zytokinmusters (beispielhaft in Abb. 1.3).

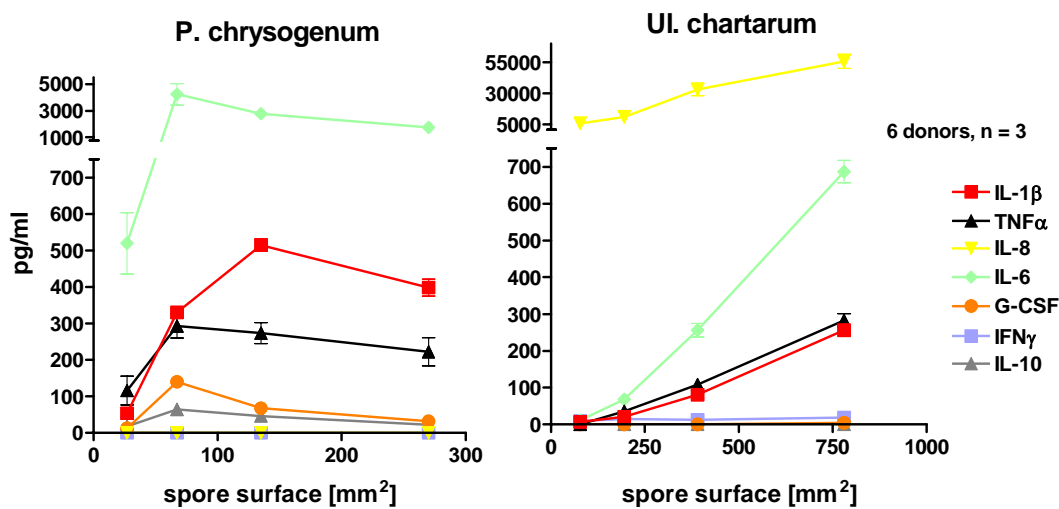


Abb. 1.3: Zytokinfreisetzung von humanem Vollblut bei Stimulation mit verschiedenen Schimmelpilzsporenspezies. Auffällig von G-CSF bei *Ul. chartarum* ist die mangelnde Induktion von IL-8 bei *P. chrysogenum* und die mangelnde Induktion

2. Vergleich des Nachweises von luftgetragendem Lipopolysaccharid mittels LAL und IPT

Konzentrations-Wirkungskurven gleicher Mengen von LPS-Präparationen von 23 verschiedenen Bakterienspezies wurden parallel sowohl auf die Induktion des Zytokins Interleukin-1β in menschlichem Vollblut wie auch auf ihre Aktivität im Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test verglichen. Der LAL Test beruht auf einer Gerinnungsreaktion von Immunzellen des Pfeilschwanzkrebse und wird z. B. in der Sicherheitsprüfung von Medikamenten angewendet. Er findet auch zunehmend Anwendung in der Bestimmung von biologischen Belastungen in der Luft. Der Vergleich der beiden Tests (Abb. 2.1) zeigte eindrücklich, dass LPS Präparationen aus verschiedenen Spezies im LAL-Test sehr ähnlich potent reagieren (Detektionsgrenzen liegen innerhalb zwei Zehnerpotenzen), in menschlichem Blut aber viel größere Potenzunterschiede aufweisen (Detektionsgrenzen gestreut über 5 Zehnerpotenzen). Da das menschliche Blut sicherlich besser die Entzündungsreaktion im menschlichen Körper widerspiegelt als die Gerinnungsreaktion der Amöbozyten des Pfeilschwanzkrebse, wird aus diesen

Untersuchungen klar, dass die Messung von LPS mit dem LAL-Test, z. B. in Luft- oder anderen Umweltproben, keine Aussage über die biologische Potenz und die potentiellen pathogenen Wirkungen des gemessenen LPS liefern kann.

Detektionsgrenzen verschiedener Lipopolysaccharide im LAL-Test und im menschlichen Vollblut Test

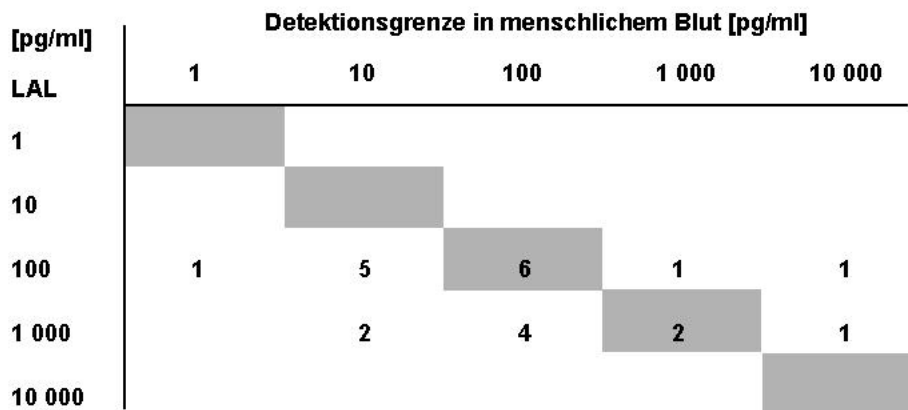


Abbildung 2.1: Detektionsgrenzen von 23 LPS Präparationen aus verschiedenen Gram-negativen Bakterienspezies im LAL-Test (Y-Achse) und im menschlichen Vollblut Test (X-Achse). Die grauen Kästchen deuten Übereinstimmung zwischen den Detektionsgrenzen beider Tests an.

Diese Erkenntnis könnte auch direkte Konsequenzen für den Einsatz des LAL-Tests in der Sicherheitsprüfung von Medikamenten haben. Er wird inzwischen weitläufig als Ersatzmethode für den Tierversuch verwendet. Aufbereitetes Wasser macht einen Anteil von ca. 80% der getesteten Proben aus. Der am häufigsten vorkommende Wasserkeim ist *Pseudomonas aeruginosa*. Dieser hat zwar im LAL Test ein durchschnittlich potentes LPS mit einem Detektionslimit bei 1000 pg/ml, unsere Experimente zeigen aber, dass dieses LPS im menschlichen System zu den schwächsten Entzündungsauslösern gehört mit einem Detektionslimit bei 10 000 pg/ml.

Zur Bewertung von Umweltproben aus der Luft sind momentan verschiedene Methoden im Einsatz, die alle nur einen Teilaspekt der biologischen Belastung der Luft erfassen. Mikrobiologische Methoden zum Beispiel erfassen nur Bakterien, die sich unter Standardbedingungen auf Agar kultivieren lassen. Laut einiger Untersuchungen sind dies nur ca. 5 % des Speziesspektrums. Die Messung von LPS mit dem LAL-Test birgt neben oben genannten Problemen auch weitere: da der LAL-Test nur in flüssiger Phase durchgeführt werden kann, muss das gesammelte

Material aus der Luft von einem Sammelfilter abgelöst werden. Wir haben die Effizienz dieser Ablösung überprüft (Abb. 2.2) und die Einschätzung der biologischen Belastung parallel beaufschlagter Luftproben im menschlichen Vollbluttest und im LAL Test verglichen. Der Vorteil, dass das menschliche Vollblut direkt mit dem Feststoff Filter durchgeführt werden kann, erlaubt erstmals eine Überprüfung der Effizienz, LPS und andere immunstimulatorischen Moleküle dem LAL Protokoll folgend von den beaufschlagten Filtern abzulösen. So konnten sowohl parallel beaufschlagte Filter direkt, als auch die gespülten Filter gemessen werden und zusätzlich die Bestimmung der biologischen Belastung in der Spüllösung im LAL Test und im menschlichen Vollbluttest verglichen werden.

Ort der Messung		Kälberstall			Schweine-stall
		5 L	10 L	30 L	1 L
Luftprobenvolumen					
Behandlung	Test	EEU / Probe			
Lavage von Filter	LAL	0.9	7.5	19	1.6
Lavage von Filter	IPT	2.1	4.5	6	1.4
Filter direkt	IPT	9	16	> 50	42
gewashener Filter direkt	IPT	3	1	> 50	31

Abbildung 2.2: Vergleich von LAL und IPT in Proben aus Tierställen. Luftproben wurden in einem Kälberstall und einem Schweine-stall gesammelt. Anschließend wurde je eine Probe laut LAL-Test Vorschrift extrahiert (Lavage) und im LAL-Test oder im menschlichen Vollbluttest (In vitro Pyrogen Test = IPT) vermessen. Je ein parallel beaufschlagter Filter wurde auch direkt im menschlichen Vollbluttest eingesetzt und der jeweils extrahierte Filter wurde auch im Vollbluttest vermessen. Die Ergebnisse sind in „endotoxin equivalent units“ = EEU bezogen auf das gleiche Standard-Endotoxin hochgerechnet auf die gesamte Probe angegeben.

Betrachtet man in Abb. 2.2 die Werte, die mit dem LAL-Test in der Lavage gemessen wurden und die, die mit dem Vollbluttest direkt mit dem Filter gemessen werden, wird klar, dass der LAL-Test die Belastung der Luft unterschätzt. Der Vollbluttest findet aber in der Lavage nicht bedeutend mehr Belastung als der LAL-Test. Die fehlende Aktivität bleibt hier offensichtlich auf dem Filtermaterial zurück (letzte Zeile): dieses ist im Vollbluttest noch hoch aktiv.

Diese Ergebnisse bilden Teil des Manuskripts:

Ilona Kindinger, Mardas Daneshian, Hans Baur, Thomas Gabrio, Andreas Hofmann, Stefan Fennrich, Sonja von Aulock and Thomas Hartung: A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. *J Immunol Meth* 2005; 298:143-53.

3. Vergleich der immunstimulatorischen Aktivität von Schimmelpilzsporen in Epithelzellen und Makrophagen

Neben den Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien stellen auch Schimmelpilzsporen einen beträchtlichen Anteil luftgetragener Mikroben dar. Durch ihre sehr kleinen Durchmesser, meist deutlich unter 10 µm, können diese beim Einatmen auch bis in die Alveolen getragen werden. Gesundheitsschädigende Wirkungen von Schimmelpilzen schließen Reizungen, Lungeninfektionen, allergische Erkrankungen, Alveolitis, „organic dust toxic syndrome“ (ODTS) und weitere chronische Lungenerkrankungen ein.

Im Kapitel 1.3 wurde beschrieben, dass auch Schimmelpilze im menschlichen Vollblut eine Zytokinausschüttung bewirken. In diesem Teil der Untersuchungen wurde die Zytokinausschüttung in Zelllinien alveolaren Ursprungs vergleichend untersucht. Diese sind die humane alveolare Epithelzelllinie A549 und die murine alveolare Makrophagenzelllinie MH-S.

A549 Zellen sind imstande, das Chemokin IL-8 auf entzündliche Reize hin auszuschütten. Dieses lockt neutrophile Granulozyten an den Ort der Infektion. Laut Literatur können diese Zellen auch Surfactant freisetzen, verfügen aber an ihrer Oberfläche nicht über detektierbare Mengen der Toll-like Rezeptoren TLR-2 und TLR-4, welche für die Erkennung von LTA bzw. LPS und anderen mikrobiellen Immunstimuli unerlässlich sind. MH-S Zellen verfügen dagegen über diese Rezeptoren und können bei Stimulation große Mengen an proentzündlichem TNF α aber auch an dem Chemokin MIP-2 freisetzen. Da keine humane Alveolarmakrophagen-Zelllinie verfügbar ist, musste hier auf eine murine Linie zurückgegriffen werden. Die zwei Zelllinien wurden hinsichtlich ihrer Stimulierbarkeit mit diversen Standardstimuli untersucht.

A549 Zellen wurden weder durch LPS, LTA noch durch Zymosan (einem Hefe-Extrakt) zur Zytokinfreisetzung angeregt. Diese Ergebnisse entsprachen anlässlich der fehlenden Expression von TLR-2 und TLR-4 unseren Erwartungen. Der zellgängige Phorbol-ester PMA hingegen induzierte die Freisetzung von IL-8 (Abb. 3.1). PMA aktiviert rezeptorunabhängig die Proteinkinase C.

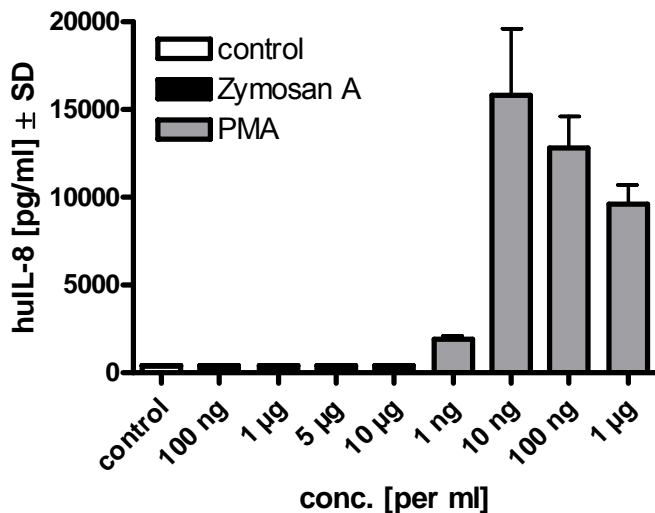


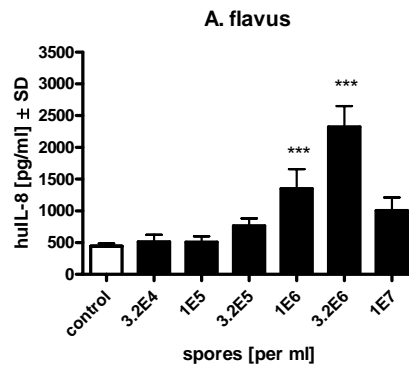
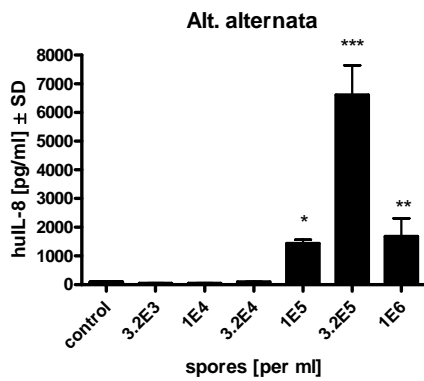
Abbildung 3.1: Konzentrationsabhängige Freisetzung von IL-8 durch Stimulation mit Zymosan oder PMA in A549 Zellen.

Wie in Abbildung 3.2A dargestellt, waren 9 von 13 Schimmelpilzsporen in der Lage, IL-8-Freisetzung in A549 Zellen konzentrationsabhängig zu induzieren. Dies weist darauf hin, dass die Epithelzellen der Lunge auch an der Abwehr gegen Schimmelpilzsporen beteiligt sind und diese erkennen können. Ferner deuten die Ergebnisse an, dass die Erkennung dieser Pilzspezies wahrscheinlich nicht von der Expression von TLR-2 oder TLR-4 auf der Zelloberfläche abhängt und dass das immunstimulatorische Prinzip der Pilze sich offenbar von LPS oder LTA unterscheidet.

Interessant war auch, dass die 4 anderen getesteten Schimmelpilzspezies einer Erkennung und Immunreaktion der A549 Zellen entgehen konnten (Abb. 3.2B). Dies könnte auf einer toxischen oder an einer immunmodulatorischen Qualität beruhen.

Auch bei den MH-S Zellen konnten 9 der Schimmelpilzspezies eine Zytokinfreisetzung sowohl von proentzündlichem TNF als auch von chemotaktischem MIP-2 hervorrufen (Abb. 3.3A). Die Spezies, die zu keiner Immunstimulation führten, waren bis auf den Austausch einer Spezies die gleichen (Abb. 3.3B): *Aspergillus niger* wurde von MH-S Zellen erkannt, *Aspergillus fumigatus* jedoch nicht.

A: Stimulierende Schimmelpilzsporen



Ähnliches Verhalten :
Aspergillus fumigatus
Aspergillus candidus
Aspergillus terreus
Curvularia geniculata
Penicillium chrysogenum
Mucor plumbeus
Cladosporium cladosporioides

B: Schimmelpilzsporen, die von A549 Zellen nicht erkannt werden

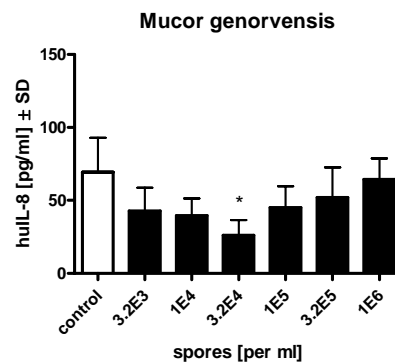
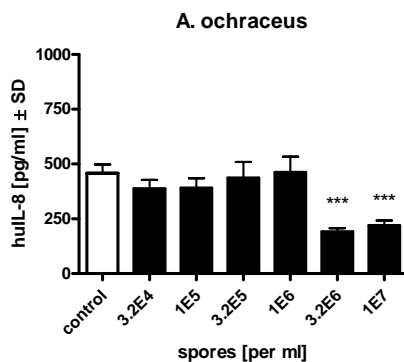
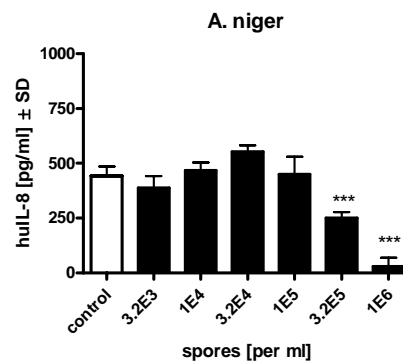
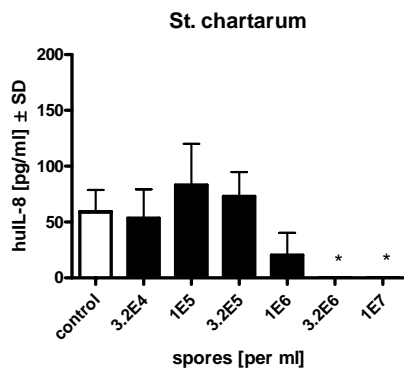
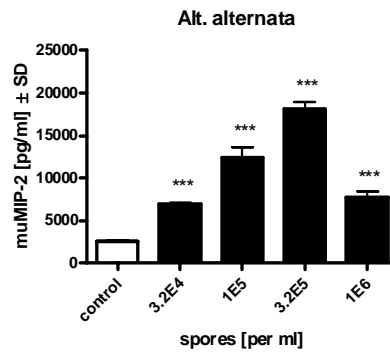
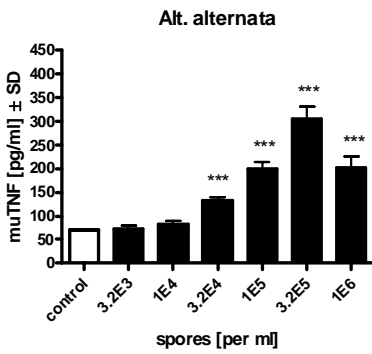


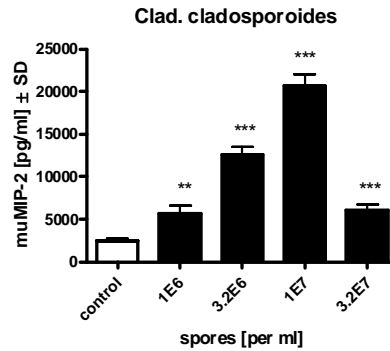
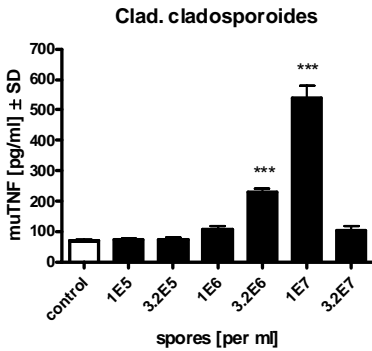
Abbildung 3.2: Vergleich der immunstimulatorischen Potenz verschiedener Schimmelpilzsporen auf A549 Zellen. IL-8 Freisetzung von A549 Zellen durch Stimulation mit Schimmelpilzsporen verschiedener Spezies.

A: Stimulierende Schimmelpilzsporen

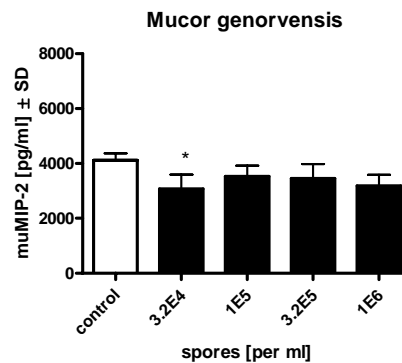
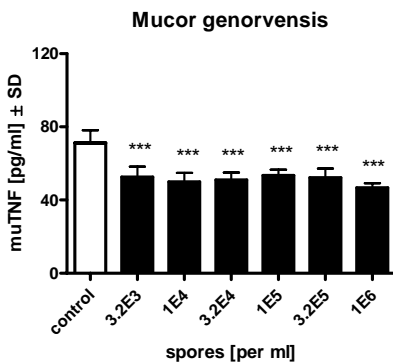


ähnliches Verhalten:

A. candidus
A. flavus
A. niger
Curv. geniculata
Mucor plumbeus
P. chrysogenum
St. chartarum



B: Schimmelpilzsporen, die von MH-S Zellen nicht erkannt werden



ähnliches Verhalten

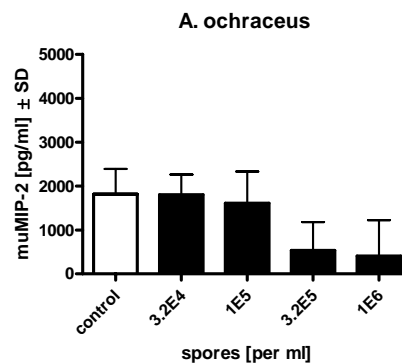
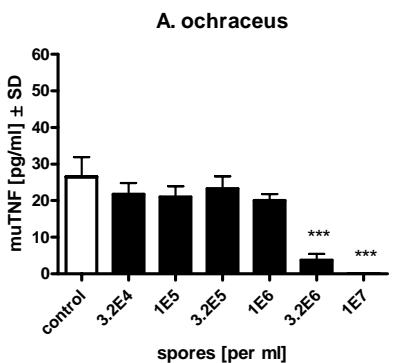


Abbildung 3.3: Vergleich der immunstimulatorischen Potenz verschiedener Schimmelpilzsporen auf MH-S Zellen. TNF und MIP-2 Freisetzung von MH-S Zellen durch Stimulation mit Schimmelpilzsporen verschiedener Spezies

4. Optimierung des In vitro Pyrogen Tests für die Messung luftgetragener Toxine

Der In vitro Pyrogen Test (IPT) wurde ursprünglich als Alternativmethode für die Sicherheitsprüfung von injizierbaren Arzneistoffen auf Kontamination mit Pyrogenen entwickelt und später an die Evaluation der biologischen Belastung von Luftproben adaptiert. Im Vergleich zu anderen Methoden simuliert er die menschliche Immunabwehr durch die Messung des Leitzytokins für Fieber, IL-1 β , und erfasst integral alle human-relevanten Pyrogene. Mit einem pyrogenfreien Monitor werden Partikel aus der Luft auf einem Filter abgeschieden und anschließend direkt im Monitorgehäuse mit menschlichem Blut bei Körpertemperatur inkubiert. Die IL-1 β Freisetzung wird mittels ELISA bestimmt.

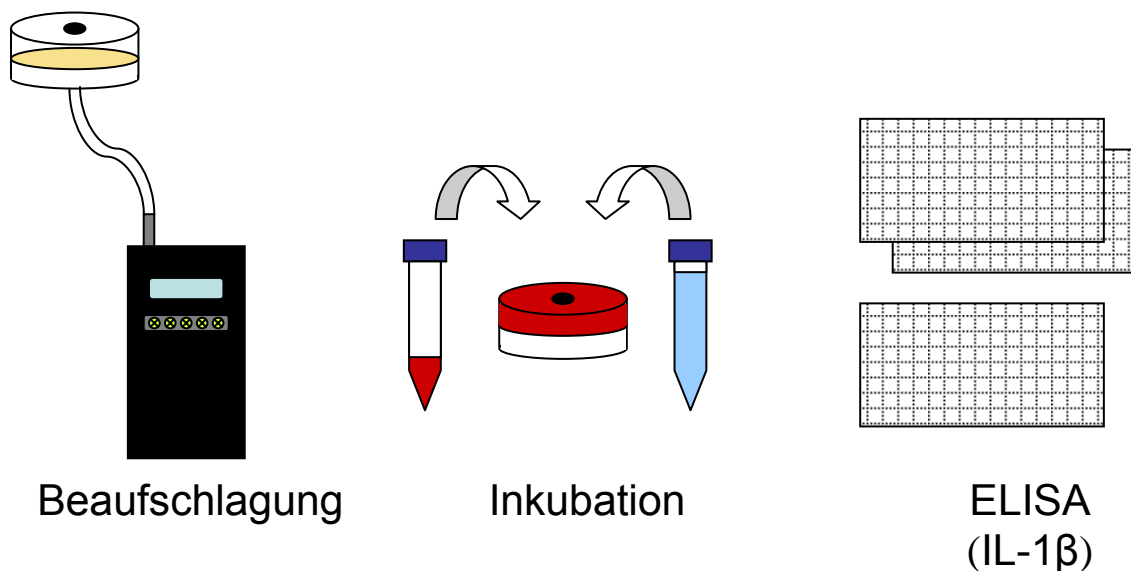


Abb. 4.1: Messprinzip des In vitro Pyrogen Tests für die Erfassung von luftgetragenen biologischen Kontaminationen.

Im Rahmen der Förderung wurde die messtechnische Realisierung der von uns entwickelten Methode zur Bestimmung der pyrogenen Belastung in der Luft publiziert.

Kindinger, I., Daneshian, M., Baur, H., Gabrio, T., Hofmann, A., Fennrich, S., von Aulock, S. and Hartung, T.: A new method to measure air-borne pyrogens based on human whole blood cytokine response. *J Immunol Meth* (2005), 298:143-53.

In diesem Manuskript werden beschrieben:

- die Auswahl eines geeigneten Filters zur Sammlung von Luftproben, der weder das Blut direkt aktiviert noch die Wiederfindung einer zugegebenen Kontamination beeinflusst.

- ein den Filter enthaltendes Monitoregehäuse, welches für die Sammlung und den sicheren Transport von Proben verwendet werden kann und dem direkt Blut zugegeben werden kann, in dessen Überstand nach einer Inkubationszeit das Zytokin IL-1 β gemessen wird.
- Feldmessungen, die belegen, dass der Test bei Belastung der Luft auch erhöhte Werte anzeigt.
- Vollblutstimulationen mit Schimmelpilzsporen, die belegen, dass auch diese IL-1 β Freisetzung hervorrufen und somit erfasst werden.
- Vergleiche zwischen der Reaktion von Blutspendern, die eine Hausstaub- oder Schimmelpilzallergie haben mit solchen, die keine Allergie aufweisen. Es gibt keinen Hinweis auf eine Übersensibilisierung von Allergikern bezüglich der Freisetzung von IL-1 β .
- Es wird gezeigt, dass sowohl frisches Blut als auch kryokonserviertes Blut geeignet sind für eine semiquantitative Bestimmung der Belastung der Luft.

In der weiteren Optimierung dieser Methode wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

4.1 Untersuchung der Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit verschiedener Blutspender – muss unter gesunden Blutspendern eine Vorauswahl getroffen werden?

Mikroorganismen, die in den Körper eindringen, werden von Bindeproteinen und Mustererkennungsrezeptoren und deren Korezeptoren erkannt, welche über eine Signaltransduktionskaskade die Bildung von Zytokinen, Signalbotenstoffen der Entzündungsreaktion, initiieren. Die Entdeckung von Polymorphismen in den Genen TLR4 und TLR2, die laut Transfektionsstudien deren Funktion beeinträchtigen, bot eine mögliche Erklärung für Unterschiede in der Anfälligkeit verschiedener Menschen für diverse Erkrankungen. In funktionellen Analysen mit dem Blut von 160 gesunden Freiwilligen wurden in einer großen Anzahl von Parametern keine Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit der verschiedenen Genotypen auf verschiedene Immunstimuli beobachtet, abgesehen von einer reduzierten Ausschüttung von IL-10 durch heterozygote Träger des TLR4 Polymorphismus Asp299Gly. Gleichmaßen wurden in diesen Parametern keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen für den Promotor-Polymorphismus CD14 C-159T beobachtet.

Sonja von Aulock, Jan Rupp, Katja Gueinzus, Matthias Maass and Corinna Hermann: Critical investigation of the CD14 promoter polymorphism - lack of a role for in vitro cytokine response and membrane CD14 expression. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2005; 12:1254-6.

Eine Stratifizierung der Blutspender nach Männern und Frauen zeigte, dass Frauen mehr Granulozyten im Blut aufweisen als Männer aber weniger Monozyten. Dies spiegelt sich in der Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten wieder: das Blut von Männern reagierte mit höheren Mengen von $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6 und IL-8. Diese Unterschiede wurden aber durch eine Normierung auf die Monozytenzahlen nivelliert (Abb. 4.2).

Die Ergebnisse sind in folgendem Manuskript beschrieben:

Sonja von Aulock, Susanne Deininger, Christian Draing, Katja Gueinzus, Oliver Dehus, and Corinna Hermann: Gender difference in cellular cytokine induction capacity upon stimulation with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid. *J Cytokine Interferon Res*, in press.

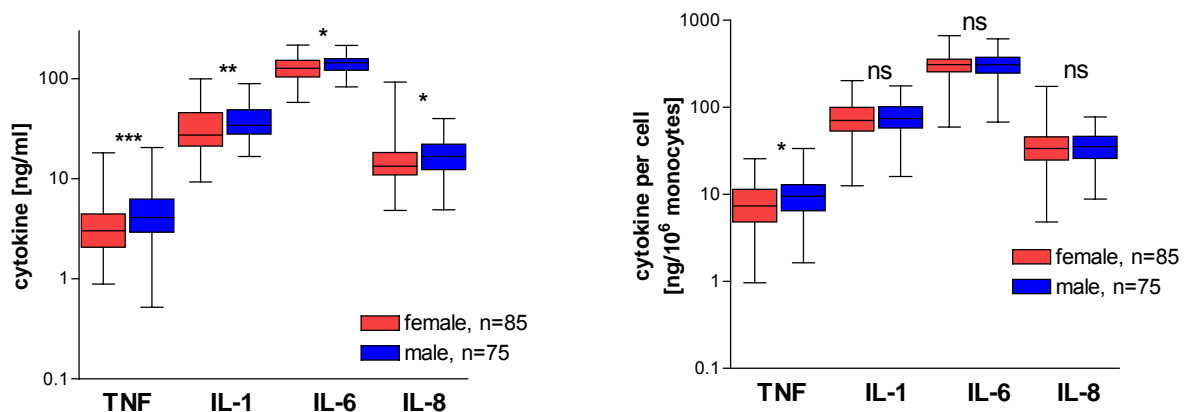


Abb. 4.2: Unterschiede in der Zytokinfreisetzung bei Männern und Frauen sind bedingt durch unterschiedliche Monozytenzahlen im Blut. Stimulation des Blutes von gesunden Freiwilligen (75 Männer, 85 Frauen) mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS. Die Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor, Interleukin-1, Interleukin-6 und Interleukin-8 wurden mit ELISA gemessen. A, absolute Zytokinfreisetzung; B, Zytokinfreisetzung pro Millionen Monozyten im Blut. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, nicht signifikant.

Die Reaktionsfähigkeit eines Blutspenders auf den gleichen Immunstimulus bleibt über die Dauer von einem Monat reproduzierbar (Abb. 4.3). Ferner ist die relative Reaktion des Blutes verschiedener Spender auf verschiedene Immunstimuli konsistent, d.h. ein starker Immunstimulus löst immer eine starke Reaktion aus, ein schwacher Stimulus immer eine schwache Reaktion (Abb. 4.4). Dabei ist jedoch die

Schwelle, ab der verschiedene Blutspender auf einen Stimulus mit Zytokinfreisetzung reagieren, konserviert (Abb. 4.5).

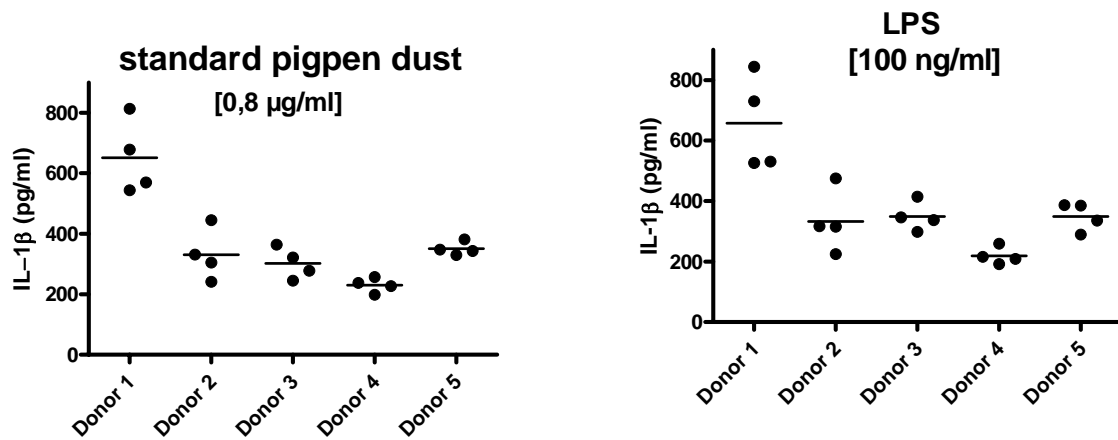


Abb. 4.3: Hohe Reproduzierbarkeit der Zytokinfreisetzung des Blutes eines Spenders an verschiedenen Tagen. Blut von 5 Spendern (Donor 1-5) wurde an vier verschiedenen Tagen über einen Monat verteilt mit A, Schweinestallstaub und B, 100 ng/ml LPS stimuliert. IL-1 β Freisetzung wurde mit ELISA gemessen.

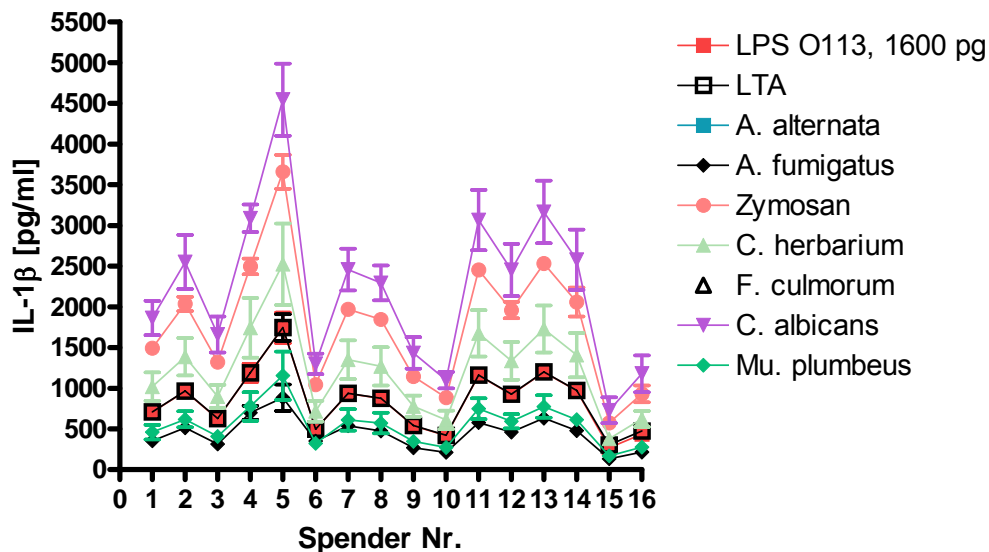


Abb. 4.4: Absolute aber nicht relative Unterschiede in der Reaktion des Blutes verschiedener Spender auf Stimulation mit verschiedenen Immunstimuli. Blut von 16 Spendern wurde stimuliert mit LPS, LTA und verschiedenen Schimmelpilzsporen und Hefen. IL-1 β Freisetzung wurde mittels ELISA gemessen. Werte sind Triplikate des gleichen Spenders \pm SD.

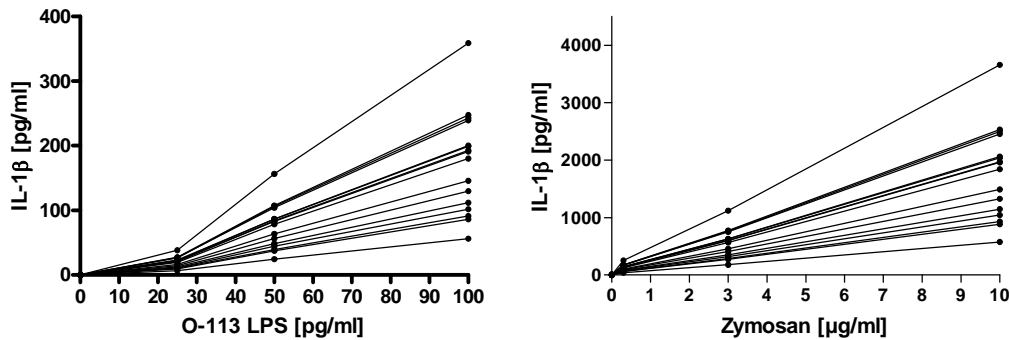


Abb. 4.5: Konservierte Sensitivität verschiedener Blutspender auf verschiedene Immunstimuli. Blut von 16 Spendern wurde stimuliert mit verschiedenen Konzentrationen an LPS oder Zymosan. IL-1 β Freisetzung wurde mittels ELISA gemessen.

Insgesamt scheint daher unter gesunden Spendern eine Vorauswahl für die Bestimmung der biologischen Belastung eine Luftprobe mit dem In vitro Pyrogen Test nicht notwendig zu sein.

Da aber vielen potentiellen Anwendern des Tests kein frisches menschliches Blut zur Verfügung steht, wurde auch für die Messungen von luftgetragenen Pyrogenen die Anwendung von kryokonserviertem Blut geprüft (Abb. 4.6).

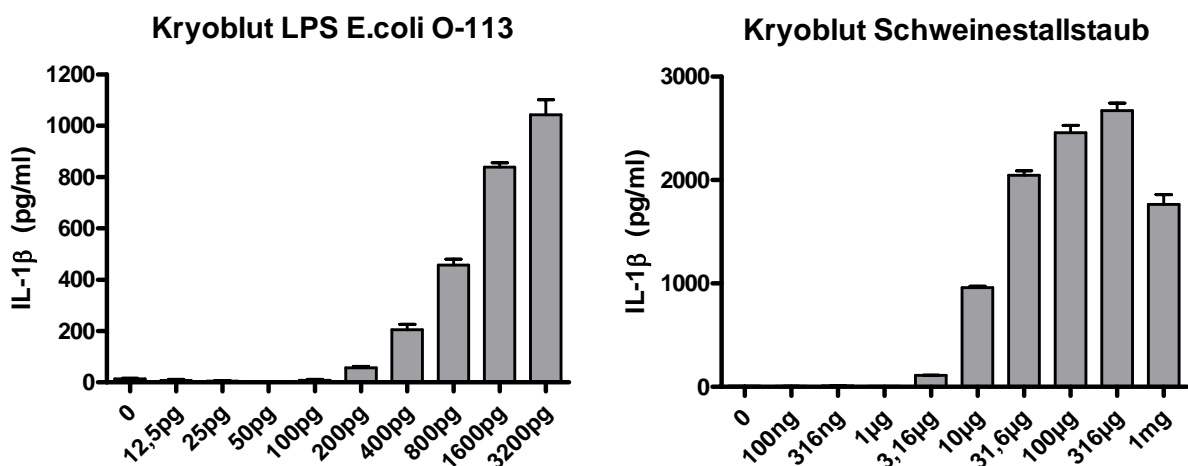


Abb. 4.6: Stimulation von kryokonserviertem Blut mit LPS oder Schweinestallstaub.

Konzentrations-Wirkungskurven von kryokonserviertem Blut aus dem Blut von 5 Spendern nach Stimulation mit LPS (12,5 pg/ml bis 3200 pg/ml) oder standardisiertem Schweinestallstaub (100 ng/ml bis 1 mg/ml). IL-1 β Freisetzung wurde mittels ELISA ermittelt.

Durch dieses Blut ist eine bessere Verfügbarkeit dieses zentralen Reagenzes in überprüfter Qualität gegeben. Das Blut wird in größeren Chargen aus gemischten

Blutspenden gewonnen und ist lange Zeit haltbar. Die Kinetik der Bildung von Zytokinen ist gegenüber frischem Blut durch den Zusatz von Gefrierschutzmittel bezüglich der Freisetzung von IL-1 β und IL-6 verzögert; die absoluten gebildeten Zytokinmengen sind höher als bei frischem Blut. TNF α wird von kryokonserviertem Blut jedoch nicht ausgeschüttet.

4.2 Entwicklung einer Referenzsubstanz – Schweinestallstaub

Zur Optimierung des Tests für die Anwendung bei Luftproben wurde ein neuer Vergleichsstandard entwickelt, der die heterogene Partikelzusammensetzung in Luft widerspiegelt. Dazu wurde sedimentierter Staub aus Schweineställen gesammelt. Der Staub wurde zunächst gesichtet und die immunstimulatorische Aktivität der verschiedenen Größenfraktionen wurde bestimmt. Da sich die verschiedenen Partikelgrößen nicht wesentlich in ihrer biologischen Aktivität unterschieden, wurden die Partikel auf einatembare Größe gemahlen (90% < 10 μ m). Dieses Material blieb bei Lagerung unter verschiedenen Bedingungen bis zu 4 Monaten stabil bezüglich seiner IL-1 β induzierenden Aktivität (Abb. 4.7)

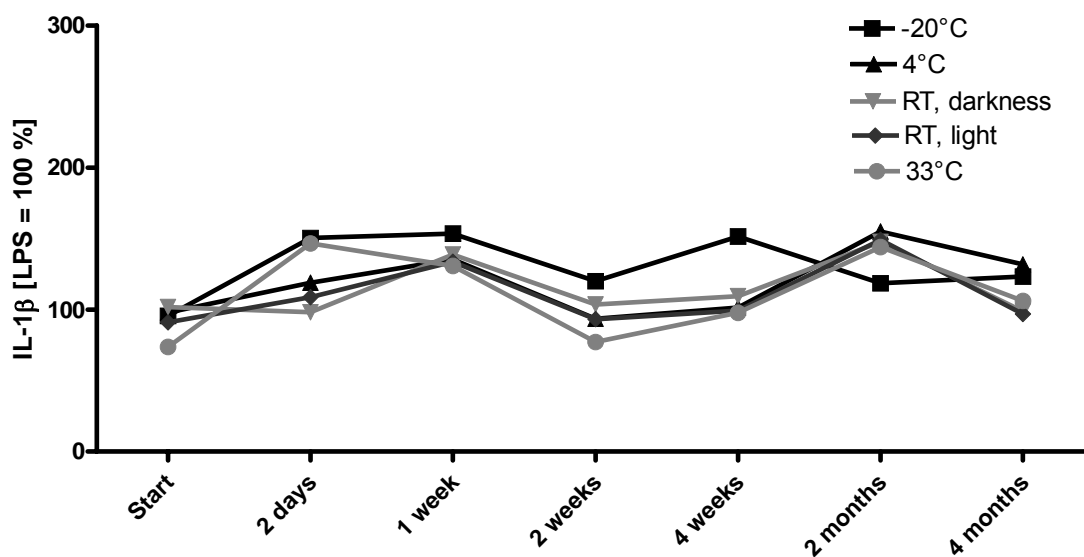


Abb. 4.7: Stabilität der IL-1 β induzierenden Eigenschaft von Schweinestallstaub unter verschiedenen Lagerungsbedingungen. Daten sind Mittelwerte von Doppelansätzen mit dem gleichen kryokonservierten Blut gepoolt von 5 Spendern.

5 Untersuchung, ob die Geometrie und das Material des Monitors unter strömungstechnischen Aspekten für eine repräsentative Beaufschlagung des Filters mit luftgetragenen Partikeln geeignet sind.

5.1 Eingrenzung der optimalen Luftsammelbedingungen durch Feldversuche

Die Beaufschlagung der Monitore wurde in Feldversuchen in Zusammenarbeit mit der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (Herr Ott) soweit möglich optimiert. Dies ist exemplarisch in Abb. 5.1 dargestellt.

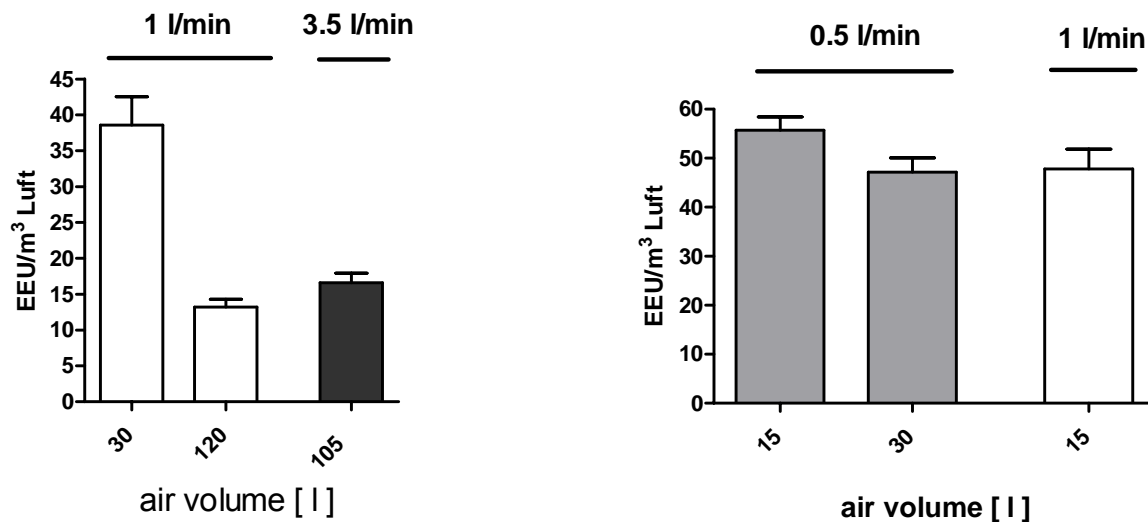


Abb. 5.1: Messung der Luftbelastung in einer Kleidersortieranlage. Monitore wurden mit den angegebenen Volumen an Luft unter den angegebenen Stromflüssen (l/min) beaufschlagt und anschließend mit Blut inkubiert. IL-1 β Freisetzung wurde mittels ELISA gemessen und mit einer LPS Standardkurve verglichen. Die Belastung der Luftprobe in Endotoxin-Äquivalenten Einheiten (EEU) pro m³ wurde kalkuliert.

5.2 Entwicklung eines Windkanals zur Optimierung und Charakterisierung der Beaufschlagung der Monitore

In Zusammenarbeit mit der FH Konstanz wurde ein Windkanal entwickelt, durch den die Beaufschlagung der Monitore unter standardisierten Bedingungen untersucht werden konnte (Abb. 5.2).

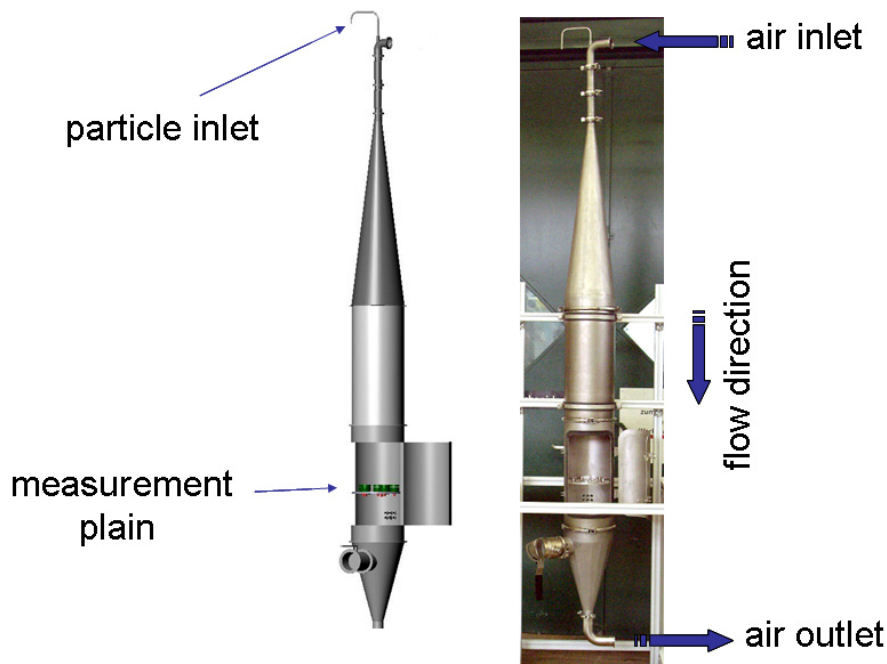


Abb. 5.2: Windkanal zur Standardisierung der Luftmessung

In den Windkanal können verschieden zusammengesetzte Stäube kontrolliert eingeleitet werden, die sich in der leicht turbulenten Strömung verteilen. Auf der Messebene erfolgt die Probenahme über eine Messsonde, die mit einem Partikelzähler verbunden ist. Mittels verschiedener Modifikationen des Monitors (Monitor mit direkter Ableitung in die Messsonde, Monitor aus Metall, usw.) kann der Einfluss dessen Geometrie und Material auf die Sammlung von Luftpartikeln evaluiert werden. Durch Veränderung der Absaugbedingungen (z.B. unter- oder überkritische Absaugung) kann eine mögliche Diskriminierung von Partikeln ausgeglichen werden.

5.2.1 Flussgeschwindigkeit und Flussprofil im Windkanal

Um die Partikel gleichmäßig im Windkanal zu verteilen muss ein turbulenter Fluss auf der Messebene erreicht werden. Die Reynoldszahl beschreibt, ob ein Fluss turbulent ist oder nicht. Ein laminarer Fluss findet bei $Re < 2300$ statt. Der turbulente Fluss beginnt bei $Re > 2300$. In den Kegeln wird eine berechnete Reynoldszahl von 40975 erreicht, was eine homogene Verteilung der Partikel gewährleisten sollte.

Die Haupttröhre des Windkanals wurde für einen turbulenten Fluss ($Re = 5545$) mit einer maximalen Geschwindigkeit von 0.5 m/s am zentralen Monitor konstruiert.

Diese Geschwindigkeit wird bei einem Flussvolumen von 54 m³/h erreicht.

Das theoretische Flussprofil über den Querschnitt der Messebene wurde mit der Nicuradse-Formel berechnet (Abb. 5.3A). Die Berechnung beschreibt das Profil, dass

sich bei einer unendlich langen Röhre entwickelt würde, daher war es wahrscheinlich, dass sie das gemessene Flussprofil vom errechneten unterscheiden würde. Das Flussprofil im Windkanal wurde mit drei verschiedenen Flussvolumen gemessen (40 m³/h, 50 m³/h and 60 m³/h) (Abb. 5.3B).

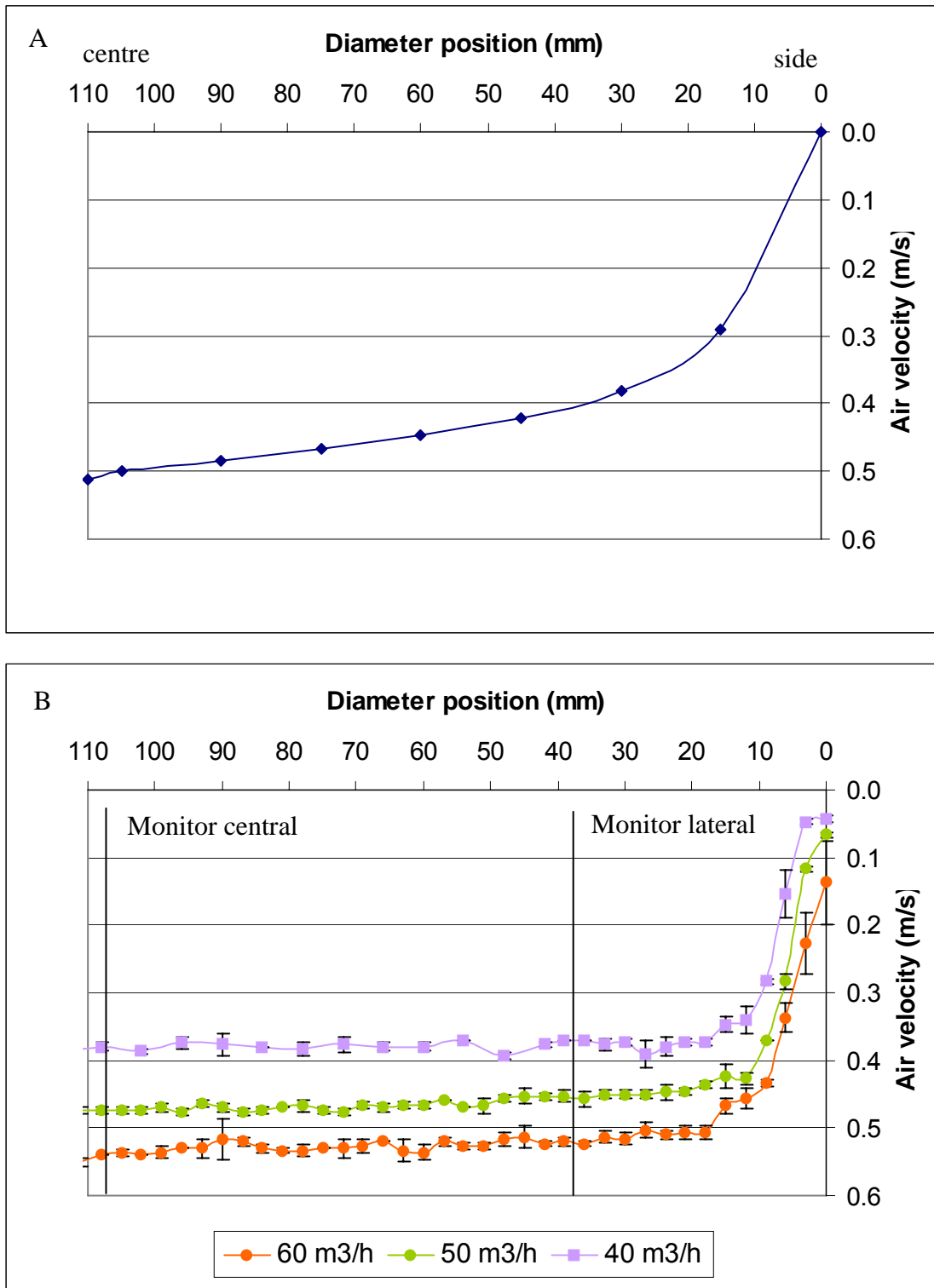


Abb. 5.3: Flussprofile im Querschnitt der Messebene des Windkanals

A, berechnetes Flussprofil bei 54 m³/h; B Flussprofil bei 40 m³/h, 50 m³/h und 60 m³/h. Die Positionen der Monitore in der Mitte des Tunnels und an der Seite sind angezeigt. n = 3

Die Form des gemessenen Flussprofils unterscheidet sich von der berechneten Form. Das gemessene Profil ist zwischen Position 0 und 20 mm steil und zwischen 20 mm und der Mittel des Kanals fast flach. Diese Form wird durch den turbulenten Fluss im Windkanal bedingt und ist vorteilhaft, da der Unterschied zwischen dem zentralen und den lateralen Monitoren gering ist. Der Unterschied zwischen der durchschnittlichen Luftgeschwindigkeit am zentralen und am lateralen Monitor stieg mit steigendem Flussvolumen an (Tabelle 5.1).

Tabelle 5.1: Unterschiede zwischen Monitorpositionen und durchschnittlicher Luftgeschwindigkeit

gemessenes Flussvolumen	Luftgeschwindigkeit an der zentralen Monitorposition	Luftgeschwindigkeit an der lateralen Monitorposition	Diskrepanz zwischen Monitorpositionen bei verschiedenen Luftgeschwindigkeiten
[m ³ /h]	[m/s]	[m/s]	[%]
40	0.38	0.37	0.7
50	0.47	0.45	4.8
60	0.54	0.51	5.0

5.2.2 Kalibration mit dem Rotameter

Die AUC des Flussprofils (Abb. 5.3) erlaubt die Berechnung der durchschnittlichen Luftgeschwindigkeit im Windkanal. Mit der durchschnittlichen Luftgeschwindigkeit und dem Durchmesser des Windkanals konnte der Luftstrom pro Stunde errechnet werden. Um das Rotameter zu kalibrieren wurde das errechnete Luftvolumen verwendet (Abb 5.4). Das folgende Diagramm zeigt das reale Luftflussvolumen im Windkanal in Korrelation mit dem Luftvolumen, das durch das Rotameter angezeigt wird.

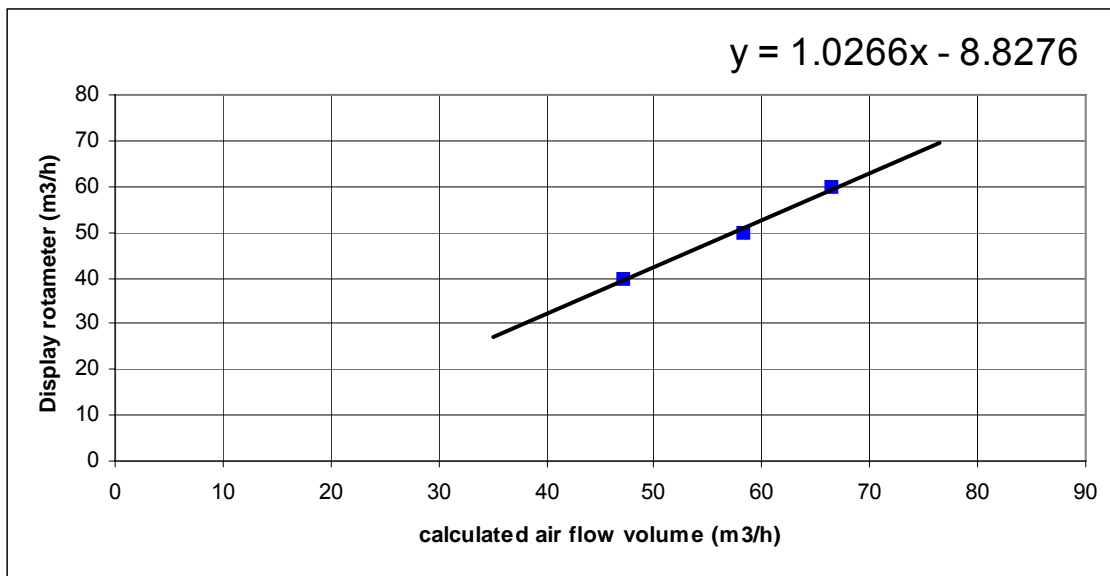


Abb. 5.4: Diskrepanz zwischen dem angezeigten und realen Luftflussvolumen

Anhand des errechneten Luftflussvolumens konnte der Fehler des Rotameters bestimmt werden. Die Formel zeigt die Gleichung der linearen Regression durch die drei Messpunkte.

Eine lineare Regressionskurve wurde durch die drei gemessenen Flussvolumina gelegt. Dies erlaubt eine einfache Konversion des Zielvolumens in das entsprechende Volumen, das auf dem Rotameter angezeigt wird.

Während der Messung mit der TESTO hot bulb Sonde wurde beobachtet, dass Luft, die durch das Beypasssystem in den Windkanal eintritt eine Turbulenz auf der Messebene auslöst. Das Beypasssystem wurde entworfen, um den Luftfluss durch den Windkanal zu regulieren. Aufgrund dieser Beobachtung wurde der Bypass versiegelt und ein externer Spannungsregulator wurde verwendet, um die Leistung des Staubsaugers direkt zu regulieren.

5.2.3 Partikeldispersion

Es wurde untersucht, ob die Dispersion der Partikel im Windkanal über die Zeit konstant und gleichmäßig ist. Der Partikeldispenser wurde mit Kalksteinpartikeln (0-8µm) beladen und 2000 sec laufen lassen. Der Luftfluss wurde auf 54 m³/h eingestellt. Die Partikel wurden durch eine Sonde mit einem WELAS Partikelzähler bei 5 l/min gemessen.

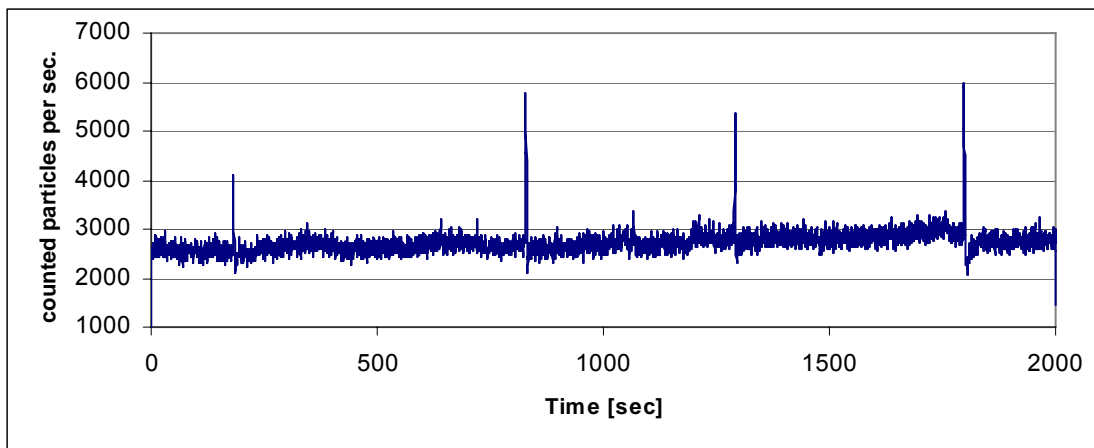


Abb. 5.5: Partikelanzahl pro Sekunde im Windkanal

Der Windkanal wurde auf 54 m³/h Luftfluss eingestellt. Kalksteinpartikel (0-8 µm) wurden dispergiert. Luft wurde 2000 sec lang mit 5 l/min über eine Sonde in einen WELAS Partikelzähler gezogen.

Nachdem der Windkanal und der Partikeldispenser liefen, erreichte das System innerhalb von 60 sec eine stabile Partikelrate von ca. 2750 Partikel/sec (nicht gezeigt). Ab 200 s traten Ausreißer in der Anzahl von Partikeln auf. Die höhere Anzahl von Partikeln wurde über ein bis drei Sekunden gemessen; danach kehrte die Partikelzahl wieder auf den ursprünglichen Wert zurück. Diese Ausschläge waren reproduzierbar und schienen durch Partikel, die in den Konen im oberen Teil des Windkanals akkumulieren und ab einer bestimmten Menge herunterfallen, hervorgerufen zu werden. Dieses Problem wurde durch den Ersatz des Verbindungsstücks zwischen dem Dispenser und dem Kanal mit einem kürzeren PTFE Schlauch und durch die Polierung des Kanals deutlich reduziert.

5.2.4 Absauggeschwindigkeit und Anströmung

Der Einfluss der Absauggeschwindigkeit auf die gemessene Konzentration und die Partikelgrößenverteilung wurde mit drei verschiedenen Anordnungen überprüft:

Pall-Monitor wird senkrecht von oben angeströmt

Pall-Monitor wird 90° gedreht, seitlich angeströmt

Pall-Monitor wird mit strömungsgünstigem Sondenkopf senkrecht angeströmt

Folgende Überlegungen waren für die Durchführung dieser Messanordnungen ausschlaggebend: Bei Feldmessungen muss mit unterschiedlichen Anströmungen (Wind, Bewegung des Sensors bei personengetragener Probenahme) der Sonden

gerechnet werden. Ferner kann mit dem strömungsgünstigen Sondenkopf, der auf den Monitor gesteckt wird, kann die Sammeleigenschaft des Pall-Monitors überprüft werden.

Der eingestellte Gesamt-Volumenstrom im Messkanal war 56,5 m³/h, Dispergierdruck am RBG waren 3 bar mit Dispergierdeckel A und die Messposition war jeweils mittig im Kanal. Die mittlere Geschwindigkeit im Kanal lag somit bei 0,42 m/s. Von 0,2 m/s bis 0,8 m/s Absauggeschwindigkeit wurden jeweils 10 Messungen vorgenommen, bei 2 m/s und 6,65 m/s jeweils 5 Messungen. Die Messdauer betrug 200 s pro Messung und von den Einzelergebnissen wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Abb. 5.6 zeigt die Partikelgrößenverteilung Q_0 der senkrechten Monitoranströmung bei den unterschiedlichen Absauggeschwindigkeiten. Zwischen 0,2 m/s und 0,8 m/s zeigt sich der typische, zu erwartende Verlauf. Bei unterkritischer Absaugung ist die PGV deutlich gröber und wird mit zunehmender Geschwindigkeit immer feiner. Dieser Befund entspricht der Vorstellung, dass große Partikel bei unterkritischer Absaugung überrepräsentiert sind. Dass danach ab 2 m/s die PGV wieder gröber wird, ist atypisch. Da sämtliche Messungen allerdings dieselbe Tendenz zeigen, kann es sich dabei nicht um einen zufälligen Messfehler handeln.

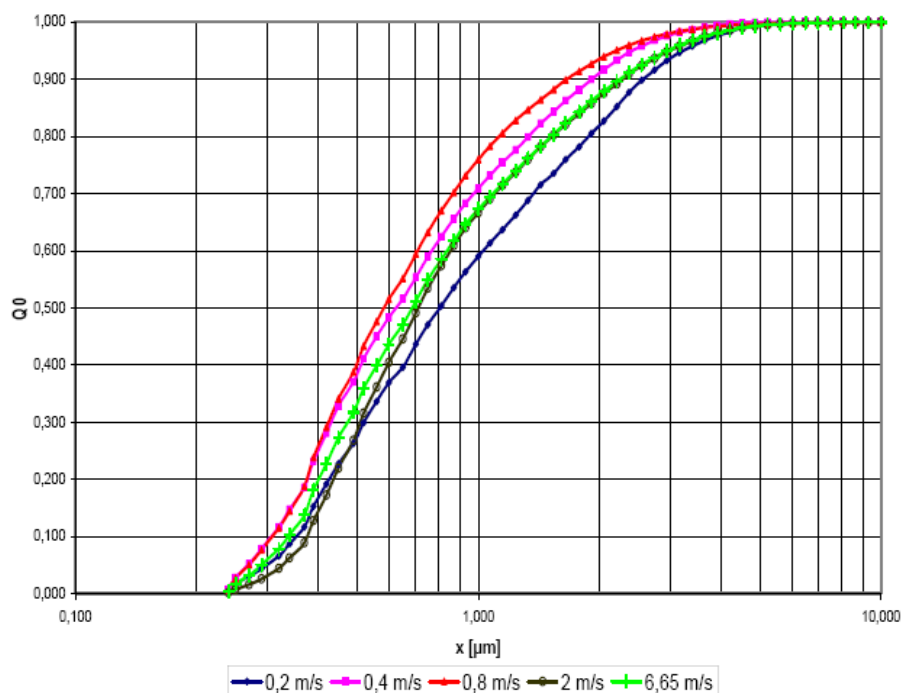


Abb. 5.6 Pall-Monitor bei verschiedenen Absauggeschwindigkeiten, ohne Aufsatz, senkrechte Anströmung, mittige Position.

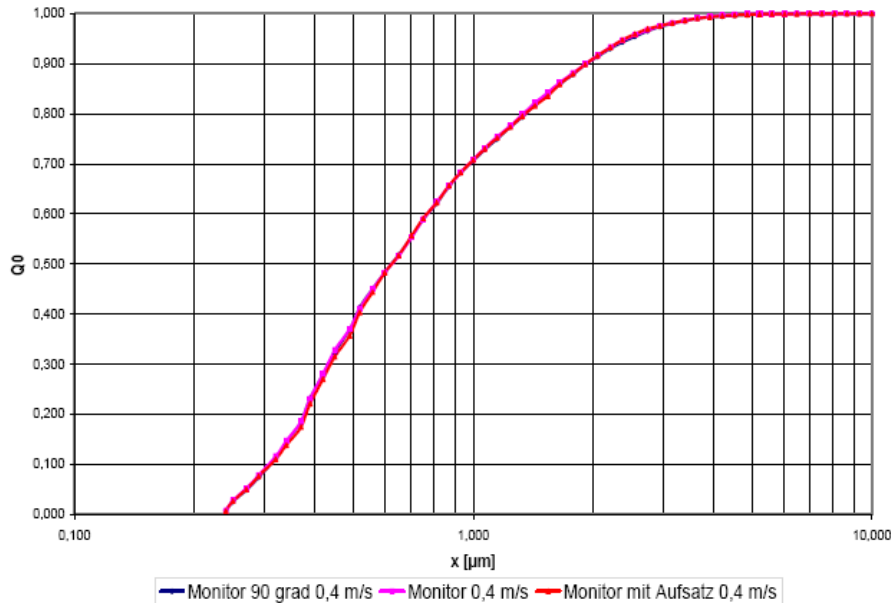


Abb. 5.7 Vergleich der Messanordnungen Pall-Monitor unter isokinetischer Absaugung mit 0,4 m/s und 0,42 m/s Anströmung.

Abb. 5.7 zeigt den Vergleich der verschiedenen Absaugbedingungen bei isokinetischer Probenahme, also Absaugung mit 0,4 m/s bei 0,42 m/s Anströmung. Es zeigen sich keinerlei Abweichungen in den PGVs bei den unterschiedlichen Anordnungen.

Das gleiche Verhalten zeigt sich auch bei den anderen Absauggeschwindigkeiten. Daraus kann man, zumindest für die PM₁₀ Fraktion ableiten, dass die Sondengeometrie und die Absaugrichtung keinerlei klassierende Effekte haben. Dagegen haben verschiedene Absauggeschwindigkeiten große Auswirkungen auf die Sammeleigenschaften.

Das gleiche Bild zeigt sich, wenn man die gemessenen Konzentrationen unter unterschiedlichen Bedingungen betrachtet. Abb. 5.8 stellt den Verlauf des Messfehlers bezüglich der berechneten und gemessenen Konzentration dar. Die dargestellten Werte sind die gemittelten Fehler über alle Einzelmessungen. Eine Abweichung von 50 % bedeutet, dass eine 50 % höhere Konzentration gemessen wurde, als zuvor nach Palas RBG eingestellt wurde.

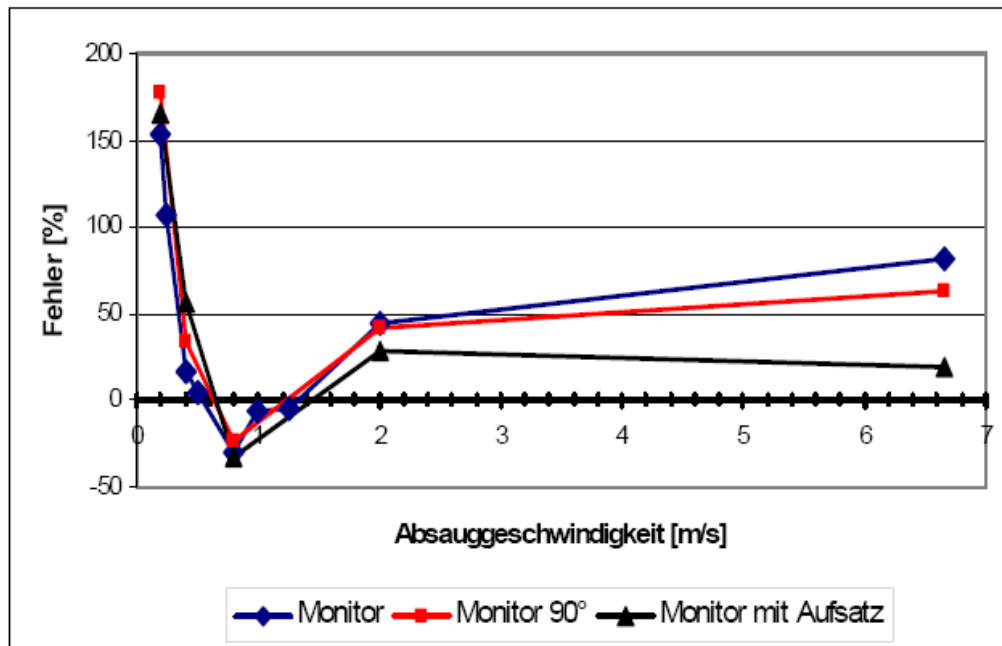


Abb. 5.8 Trend der Massenkonzentration in Abhängigkeit der Absauggeschwindigkeit für Pall-Monitor bei senkrechter und waagrechter (90°) Anordnung, sowie Pall-Monitor mit Aufsatz

Man sieht, dass sich die Fehler in der Massenkonzentration weitgehend unabhängig von der Sondengeometrie und Art der Anordnung verhalten. Erst bei der höchsten Absauggeschwindigkeit von 6,65 m/s zeigen sich deutlichere Unterschiede. Offenbar ergeben sich wieder deutliche Parallelen zu Abb. 5.6. Die Konzentrationen verhalten sich zwischen 0,2 m/s und 0,8 m/s genau, wie man es erwarten würde. Bei unterkritischer Absaugung wird eine zu hohe Konzentration gemessen, während bei überkritischer Absaugung eine etwas zu niedrige Konzentration gemessen wird. Interessant ist auch die Betrachtung der Schwankungsbreite der einzelnen Messergebnisse. In Abb. 5.9 ist stellvertretend für alle Messungen dargestellt, wie die Einzelmessungen streuen. Bei unterkritischer Absaugung schwanken die Massenkonzentrationen zwischen + 70 % und + 230 %. Zwischen 0,5 m/s und 2 m/s sind die Einzelergebnisse der Konzentrationen relativ stabil mit ca. +/- 10 %.

Damit relativieren sich die in Abb. 5.8 gezeigten Unterschiede der Anordnungen etwas, denn die Unterschiede sind in der gleichen Größenordnung der Messfehler. Es macht daher wenig Sinn, die unterschiedlichen Anordnungen hinsichtlich des Messfehlers zu bewerten. Der gleichartige Trend der Mittelwerte bei allen Kurven gibt jedoch Anlass zu der Vermutung, dass die Trends der Realität wirklich entsprechen.

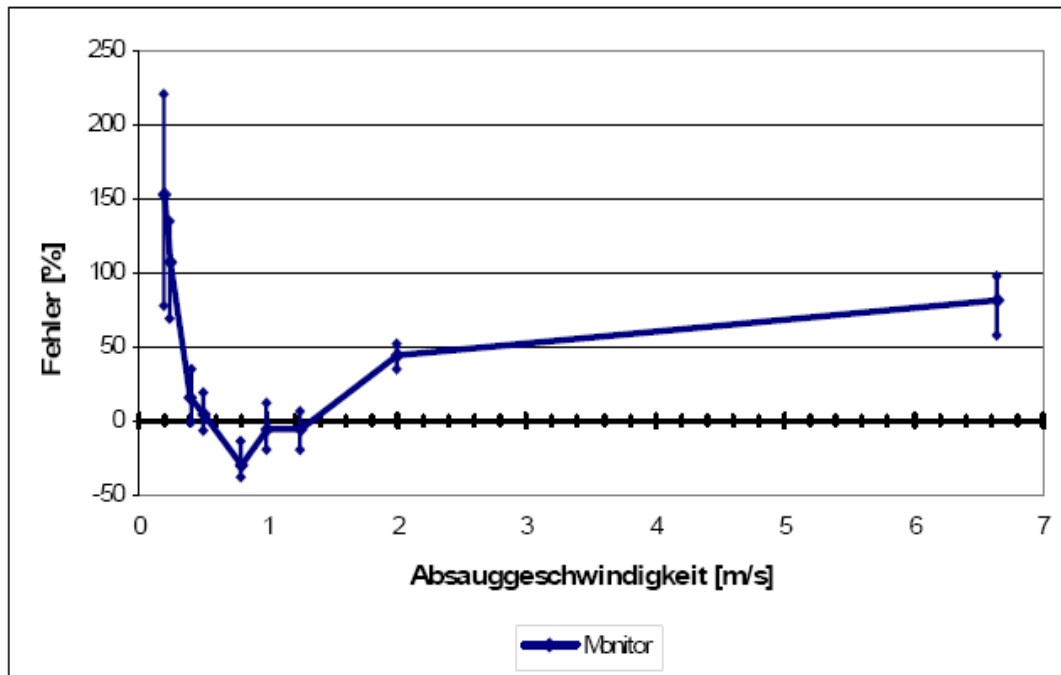


Abb. 5.9 Schwankungsbreite der Massenkonzentrationen

Resümee dieser Messungen:

- Grundsätzlich bestätigt sich der Literaturbefund, dass unterkritische Absaugung zu höherem Fehler führt, als überkritische.
- Der Kurvenverlauf ist ungewöhnlich, weil es zwei Optimalpunkte gibt. Der erste Optimalpunkt liegt in der Gegend isokinetisch bis leicht überkritisch bei Geschw. etwas über 0,4 m/s. Der zweite Optimalbereich liegt bei 1 - 1,4 m/s, danach steigt in zunehmendem Maße die mittlere Konzentration auf über 50 % Fehler an.
- Verblüffend ist der Bereich 0,6 bis 1,2 m/s, wo bei allen Anordnungen die Konzentration zu niedrig ist, im Mittel bei einem Fehler von – 25%.

Nach diesen Messungen hat sich der Verdacht nicht bestätigt, dass der Pall-Monitor allein aufgrund seiner eigenwilligen Form für die Staubprobenahme nicht geeignet sei. Man kann ihn ohne weiteres auch in der 90° Position verwenden. Der Pall-Monitor mit strömungsgünstigem Aufsatz hat offenbar erst bei höchsten, aber völlig unrealistischen Absauggeschwindigkeiten einen geringeren Konzentrationsfehler. Somit wäre eine Modifikation der äußeren Sonden geometrie des Pall-Monitors aus technischer Sicht nicht nötig, wenngleich er sicherlich die Akzeptanz der Probenahme verbessern würde.

6. Weitere Aktivitäten

Für die Entwicklung des Verfahrens zur Messung gesundheitsgefährdender Keime in der Luft wurde dem Mitarbeiter Dr. Stefan Fennrich und dem Kooperationspartner Hans Baur der Berufsgenossenschaft der Umweltpreis 2005 der Umweltstiftung der Sparkasse Pforzheim Calw verliehen.

Im November 2005 veranstaltete das Bundesamt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) in Berlin zusammen mit unserem Steinbeis Transfer Zentrum InPuT an der Universität Konstanz einen Workshop „Luftqualität und Vollbluttest“. Ergebnisse verschiedener Gruppen, die mit dem Vollbluttest arbeiten wurden vorgestellt und diskutiert.