



Neue Testtools für die Diagnostik einer exogen allergischen Alveolitis

IPA entwickelt Verfahren zum Nachweis einer beruflich bedingten Lungenerkrankung verursacht durch mikrobielle Kontaminationen in wassergemischten Kühlschmierstoffen

Sabine Kespohl, Monika Raulf

Kühlschmierstoffe werden in der Metall-verarbeitenden Industrie eingesetzt und können durch mikrobielles Wachstum kontaminiert sein. Bei exponierten Beschäftigten können nach einer Exposition respiratorische Beschwerden in Form einer exogen allergischen Alveolitis (EAA) entstehen. Um eine EAA im Rahmen eines Berufskrankheiten-Feststellungsverfahrens (BK-Nr. 4201) diagnostizieren zu können, ist der Nachweis von spezifischen Antikörpern ein wichtiges Kriterium. Hierfür stehen jedoch kaum kommerzielle Nachweisverfahren zu Verfügung. Das IPA hat auf Initiative der BG Holz und Metall entsprechende Testtools entwickelt. Diese stehen jetzt auch für die Diagnostik weiterer Verdachtsfälle zur Verfügung.

Vorkommen und Auslöser einer exogen allergischen Alveolitis (EAA)

Die exogen allergische Alveolitis ist insgesamt eine seltene interstitielle Lungenerkrankung. In Deutschland liegt die Inzidenz im Jahr bei zwei bis sechs Neuerkrankungen pro 1.000.000 Einwohner (Sennekamp 2004; Altmeyer 2019). Die häufigsten Auslöser einer EAA sind mit fast 50 % Schimmelpilze, gefolgt von Proteinen aus Vogelfedern und Tierhaaren (15,7%), Bakterien, Pflanzenmaterialien, Metallsalzen und chemischen Substanzen (Quirce et al. 2016). In Deutschland wird die EAA unter der Berufskrankheiten-Nummer 4201 „Exogene allergische Alveolitis“ in der Gruppe „Erkrankungen durch organische Stäube“ gelistet und war lange Zeit auch im Hinblick auf die jeweils betroffenen Berufsgruppen

als ‚Vogelhalterlunge‘, ‚Farmerlunge‘ oder ‚Metallarbeiterlunge‘ bekannt. Galten bis zum Ende des 20. Jahrhunderts Antigene tierischen Ursprungs, insbesondere Federn und Vogelkot, als Hauptauslöser dieser Krankheit, so zeigt eine aktuelle Studie aus Großbritannien bei 206 EAA erkrankten Patienten und Patientinnen, dass bei 50 von ihnen eine berufliche Exposition ursächlich für die Erkrankung war. Der häufigste Auslöser mit eindeutig beruflicher Zuordnung waren mikrobiell belastete KSS, auf die 36 der insgesamt 50 beruflichen EAA-Fälle zurückzuführen waren (Walters et al. 2019). Bei 37 weiteren Patienten und Patientinnen mit einer EAA war Vogelstaub der Auslöser. Nur bei vier dieser 37 Patienten mit vermuteter ‚Vogelhalterlunge‘ konnte eindeutig eine berufliche Exposition nachgewiesen werden. Für die

Kurz gefasst

- Wassergemischte Kühlschmierstoffe (KSS), die in der Metall-verarbeitenden Industrie zum Einsatz kommen, können mikrobiell kontaminiert sein.
- Beschäftigte, die gegen diese KSS exponiert sind, können eine interstitielle Lungenerkrankung, eine exogen allergische Alveolitis (EAA), entwickeln.
- Am IPA wurden auf Initiative der BG Holz und Metall Testtools entwickelt, mit denen im Rahmen von Berufskrankheiten-Feststellungsverfahren auslösende Antigene für eine EAA identifiziert werden können.

übrigen 33 EAA-Fälle war die Ursache keine berufliche Exposition sondern erfolgte im privaten Bereich über Haustiere oder andere Expositionen. Die Studie kommt daher zu dem Schluss, dass mikrobielle Antigene in wassergemischtem KSS auch in der arbeitsmedizinischen Vorsorge verstärkt berücksichtigt werden sollten.

Kühlschmierstoffe

Im Zeitraum von 2017 bis 2019 wurden in Deutschland jährlich zwischen 450.000 und 700.000 Tonnen KSS verarbeitet (Amtliche Mineralölstatistik MWV). Etwa 90 Prozent der in Deutschland genutzten Kühlschmiermittel sind wassermischbare Kühlschmierstoffe mit einem üblichen Emulsionsverhältnis von 5 bis 8 Prozent Öl. Diese Öl-Wasser-Emulsionen haben vergleichsweise geringere Schmierwirkungen, dafür aber eine gute Wärmeabfuhr beziehungsweise Kühlwirkung.

Aufgrund des hohen Wasseranteils von mehr als 90 Prozent ist eine mikrobielle Besiedlung, auch Verkeimung genannt, durch Bakterien und Pilze keine Seltenheit. Trotz Konservierung und detaillierten Reinigungsmaßnahmen konnten in verschiedenen Studien bei mehr als 60 Prozent der KSS-Proben mikrobielle Besiedlungen nachgewiesen werden (Dilger et al. 2005). Als typische Mikroorganismen in wassergemischtem KSS, die auch als Auslöser einer EAA identifiziert wurden, gehörten Bakterien wie: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Ochrobactrum anthropi*, *Actinobacter lwoffii*, *Mycobacterium immunogenum*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium gordonae*, aber auch Schimmelpilze wie *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus fumigatus* und *Aureobasidium*

pullulans. Pseudomonaden- und Mykobakterien-Antigene wurden besonders häufig als dominante KSS-Antigene identifiziert (Sennekamp 2004; Quirce et al. 2016; Kespohl et al. 2020). Obwohl einige prominente Auslöser einer KSS-induzierten EAA bekannt sind, stehen nur sehr wenige kommerzielle Testtools, die einen wichtigen Baustein in der Diagnostik einer EAA darstellen, zur Verfügung.

Herstellung KSS spezifischer Testtools

Für die Diagnosestellung einer EAA, die als Berufskrankheit unter der BK-Nr. 4201 gelistet ist, sind die Identifizierung des Krankheitsauslösers und der Nachweis von entsprechenden spezifischen IgG (sIgG)-Antikörpern im Serum der Versicherten wichtige Kriterien. Allerdings fehlt es an einem umfassenden und relevanten kommerziellen Angebot der Antigentools für den sIgG-Nachweis dieser EAA-Auslöser.

Ausgehend von einer Verdachtsanzeige der BK-Nr. 4201 durch wassergemischte KSS-Exposition am Arbeitsplatz und initiiert durch die BG Holz und Metall erfolgte die mehrstufige

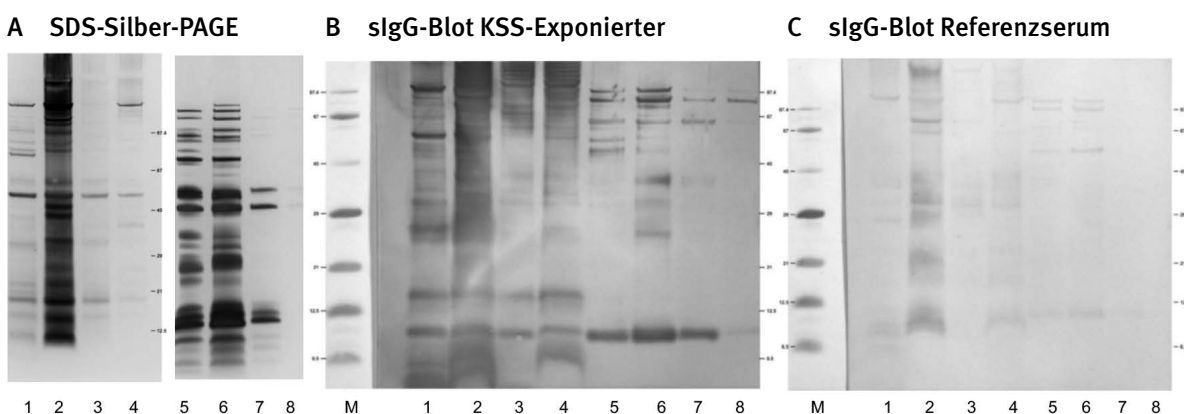


Abb. 1 A–C: Extrahierte Proteine aus vier KSS-Proben, A) Silberfärbung der SDS-PAGE, B) sIgG-Blot mit Serum des KSS-Exponierten, C) sIgG-Blot des Referenzserums. Spur 1 – 4 Proteine aus KSS-Pelletfraktion (KSS-Probe13 – KSS-Probe16), Spur 6 – 8 Proteine aus KSS-Überstandfraktion (KSS-Probe13 – KSS-Probe16).

Antigenaufarbeitung aus KSS-Arbeitsplatzproben des Versicherten. Die mikrobiologische Analyse der Arbeitsplatzproben, die vom Institut für Arbeitssicherheit der DGUV in Sankt Augustin (IFA) durchgeführt wurde, zeigte bakterielle Kontaminationen mit *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Pseudomonas spec.*, *Paenibacillus glucanolyticus* und *Corynebacterium amycolatum*. Sämtliche Antigene wurden nach standardisierten Verfahren extrahiert und sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert (Kespohl et al. 2020). Potentielle Antigene aus den KSS-Arbeitsplatzproben konnten nach Zentrifugation sowohl im Sediment der KSS-Proben als auch in den Überständen nachgewiesen werden (Abb. 1A). Die immunologische Untersuchung der KSS-Antigene erfolgte qualitativ mit spezifischen IgG-Antikörpern aus dem Serum des Versicherten im sIgG-Immunoblot (Abb. 1B). Als Referenzprobe diente ein humanes Serum einer gesunden, nicht KSS-exponierten Person (Abb. 1C). Die IgG-Antikörper im Serum des exponierten Versicherten markierten deutlich Proteine, während die IgG-Antikörper des Referenzserums nur sehr vereinzelt und auch nur schwach an Proteine banden. Diese Qualitätsanalyse wurde ebenfalls für die identifizierten, kultivierten und aufbereiteten Bakterienisolate aus den KSS-Arbeitsplatzproben durchgeführt. Auch hier war die sIgG-Antwort im Patientenserum deutlich stärker im Vergleich zum Referenzserum.

Die Quantifizierung der sIgG-Bindung auf verschiedene KSS-Antigene erfolgte im ImmunoCAP-System (detaillierte Information in (Kespohl et al. 2020)).

Spezifische IgG-Testung und Testbewertung

Die Diagnosekriterien der EAA umfassen eine entsprechende Antigen-Exposition, expositions- und/oder zeitabhängige Symptome, den Nachweis von antigenspezifischen IgG-Antikörpern im Serum, sowie verschiedene funktionale und histo-pathologische Befunde der Lunge (Eisenhawer und Raulf, 2020). Um den sIgG-Antikörpernachweis im Serum

INFO

Der Begriff exogen allergische Alveolitis beschreibt eine interstitielle Lungenerkrankung, die durch wiederholte Exposition gegenüber mikrobiellen/organischen Stäuben hervorgerufen wird. Der Krankheitsverlauf basiert auf einer komplexen Immunreaktion, an der sowohl IgG-vermittelte (Typ III) als auch zellvermittelte (Typ IV) allergische Reaktionen beteiligt sind.

- Symptome: grippeähnlich, Abgeschlagenheit, Husten, Luftnot, Gewichtsabnahme
- Diagnose: Kombination verschiedener Diagnosekriterien (sechs Kriterien müssen für eine manifeste Diagnose erfüllt sein) u. a. Expositionsnachweis und erhöhte Antigen-spezifische IgG-Konzentrationen im Serum des Patienten
- Krankheitsverlauf: akut mit grippeähnlichen Symptomen, subakut mit Husten und Luftnot, chronisch mit Husten und Luftnot über Monate, fibrotische Pathogenese der Lunge

bewerten zu können, ist es wichtig, bei sehr individuellen Antigenen mindestens ein Referenzserum, bei Standardantigenen mindestens 20 Referenzseren zu testen (Raulf et al. 2019). Mit den aus den KSS-Arbeitsplatzproben isolierten Bakterien wurde in dem vorliegenden Fall ein Referenzkollektiv von 20 Seren, gesunder nicht exponierter Personen getestet. Im Vergleich zum Referenzkollektiv zeigte sich eine 40-fach höhere sIgG-Konzentration auf *Pseudomonas alcaliphila* (615 mgA/l) im Serum des Versicherten. Auch gegen die beiden anderen Pseudomonaden waren die sIgG-Konzentrationen im Serum des Versicherten um das Sieben- bis Zehnfache höher als die sIgG-Konzentrationen in den Seren des Referenzkollektivs (Tabelle 1). Die sIgG-Konzentrationen gegen *Paenibacillus glucanolyticus* und *Corynebacterium*

	KSS- 13 IgG [mg _A /L]	KSS- 14 IgG [mg _A /L]	KSS-15 IgG [mg _A /L]	KSS- 16 IgG [mg _A /L]	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> IgG [mg _A /L]	<i>Pseudomonas oleovorans</i> IgG [mg _A /L]	<i>Pseudomonas spec.</i> IgG [mg _A /L]	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> IgG [mg _A /L]	<i>Corynebact. amycolatum</i> IgG [mg _A /L]
KSS-Exponierter	141,0	104,0	76,9	24,0	615,00	142,00	153,00	29,50	15,40
Referenz (n=20) 95 % Perzentile	5,45*	2,61*	5,73*	5,21*	15,37	20,16	12,24	13,03	8,58*

*Referenzserum (n=1)

Tab. 1: sIgG-Messung verschiedener KSS-Arbeitsplatzproben und KSS-Bakterienisolate

amycolatum waren etwa um das Zweifache erhöht. Bei dem Versicherten konnten also sowohl ein Antigen-Expositions-nachweis, als auch deutlich erhöhte sIgG-Konzentrationen auf verschiedene bakterielle Antigene aus den KSS vom Arbeitsplatz, besonders auf Pseudomonaden, gezeigt werden.

Die hier vorgestellten EAA-Antigene stehen für weitere Verdachtsfälle einer KSS-induzierten EAA zur Verfügung und werden fortlaufend durch weitere, relevante KSS-Antigen ergänzt. Die Bestimmung von antigenspezifischen IgG-Antikörpern kann über den Anforderungsbogen für spezifische IgE/IgG Bestimmung, auf der IPA-Homepage (www.ipa-dguv.de) beauftragt werden.

Fazit für die Praxis

Beim Verdacht auf eine berufsbedingte exogen allergische Alveolitis, verursacht durch mikrobiell kontaminierte KSS, werden spezifische IgG-Antikörpertests auf KSS-relevante Mikroorganismen empfohlen. Für die Prävention einer EAA sind im Verdachtsfall mikrobiologische Untersuchungen der KSS am Arbeitsplatz sinnvoll, um das ursächliche Antigen benennen zu können. Die vollständige Liste aller verfügbaren KSS-Antigene zum Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern kann über die Homepage des IPA angefordert werden. <http://www.ipa.ruhr-uni-bochum.de/l/237>

Die Autorinnen:
Dr. Sabine Kespohl
Prof. Dr. Monika Raulf
 IPA

Literatur

Amtliche Mineralölstatistik MWW.

Dilger S, Fluri A, Sonntag HG. Bacterial contamination of preserved and non-preserved metal working fluids. *Int J Hygiene & Environ Health* 2005; 208: 467–476

Kespohl S, Warfolomeow I, Schneider G, Maryska S, Meurer U, Raulf M (2020): Mikrobielle Kontamination in wassergemischten Kühlschmierstoffen als Auslöser einer beruflich erworbenen exogen allergischen Alveolitis – ein Verdachtsfall führte zur Entwicklung von diagnostischen Tools für den Nachweis von spezifischen IgG-Antikörpern. *Allergologie* 2020; 43: 26–34

Altmeyer P. Altmeyer Enzyklopädie. Exogen allergische Alveolitis. Hg. v. Prof. Dr. med. Peter Altmeyer. 2019 Online verfügbar unter www.enzyklopaedie-dermatologie.de

Quirce S, Vandenplas O, Campo P, Cruz MJ, Blay F, de Koschel D et al. Occupational hypersensitivity pneumonitis: an EAACI position paper. *Allergy* 2016; 71: 765–779

Raulf M, Joest M, Sander I, Hoffmeyer F, Nowak D, Ochmann U. Update of reference values for IgG antibodies against typical antigens of hypersensitivity pneumonitis. *Allergo J Int* 2019; 28: 192–203

Sennekamp HJ. Extrinsic allergic alveolitis. Hypersensitivity pneumonitis. Munich: Dustri-Verlag 2004

Walters GI, Mokhlis JM, Moore VC, Robertson AS, Burge GA, Bhomra PS, Burge PS. Characteristics of hypersensitivity pneumonitis diagnosed by interstitial and occupational lung disease multi-disciplinary team consensus. *Respir Med* 2019; 155: 19–25