Aus der Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin
(Prof. Dr. med. E. Hallier)
im Zentrum Arbeits-, Sozial-, Umweltmedizin und Dermatologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchung zum Risikoprofil hinsichtlich einer Sensibilisierung mit Rinderallergen unter besonderer Berücksichtigung der verschiedenen Rinderrassen

Inaugural–Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Carsten Junghans

aus

Freiberg/Sa.

Göttingen 2009

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	i.V. Prof. Dr. med. Hallier
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Fuchs
III. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 2010

Inhalt

Verzeichnis der Abkürzungen **III**

1. Einleitung **1**
1.1 Einführung in die Thematik „Allergie“ 1
1.2 Pathophysiologie und Klinik der IgE-vermittelten allergischen Reaktion 2
1.3 Diagnostik allergischer Erkrankungen 4
1.3.1 Klinische Diagnostik (In-vivo-Methoden) IgE-vermittelter Allergien 5
1.3.2 Immunologische Diagnostik (In-vitro-Methoden) IgE-vermittelter Allergien 5
1.4 Epidemiologie allergischer Erkrankungen 7
1.5 Die Rinderhaarallergie 9
1.6 Einteilung, Eigenschaften und Vorkommen der Rinderrassen in Deutschland 14
1.6.1 Einteilung der Rinderrassen 14
1.6.2 Eigenschaften der wichtigsten in Deutschland gehaltenen Rinderrassen 15
1.6.3 Quantitative Verteilung der Rinderrassen in Deutschland 16
1.7 Fragestellung und Ziel der durchgeführten Arbeit 17

2. Material und Methoden **18**
2.1 Gewinnung der Rinderhaare 19
2.2 Die kommerziellen Extrakte 19
2.3 Gewinnung des Patientenserums 20
2.3.1 Informationen zu den Landwirten 21
2.4 Durchführung der Laborarbeiten 21
2.4.1 Die Proteinextraktion (Allergenextraktion) 21
2.4.2 Die Proteinbestimmung 22
2.4.3 Die SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese 23
2.4.4 Die Coomassie- und Silberfärbung 26
2.4.5 Der Immunblot (Western Blot) 27
2.4.6 Die Immundetektion 28
2.5 Verwendetes Wasser: 29
2.6 Dokumentation der Immunblots 29
2.7 Verwendete Geräte und Materialien 30
2.7.1 Verwendete Chemikalien 30
2.7.2 Verwendete Substanzen und Kits 30
2.7.3 Verwendete Materialien 31
2.7.4 Verwendete Geräte 31

3. Ergebnisse 34
3.1 Charakterisierung der Seren und klinische Daten der Landwirte 34
3.2 Ergebnisse und Auswertung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 35
3.3 Ergebnisse der Immunblots 42
3.3.1 Darstellung und Auswertung der Immunblots 42
3.3.2 Vergleich der Ergebnisse der Immunreaktion der kommerziellen Extrakte mit den Ergebnissen der Immunreaktion der selbst hergestellten Extrakte 53
3.4 Vergleich von Proteinfärbung und Immunreaktion 56
3.5 Allergogramm 60

4. Diskussion 62
4.1.Patientenkollektiv 62
4.2 Verwendete Materialien und Methoden 64
4.2.1 Allergenquelle Rinderhaare, Allergenextrakte 64
4.2.2 Untersuchungsmethoden 65
4.3 Immunblot-Ergebnisse 67
4.4 Schlussfolgerungen 70
4.5 Ausblick 73

5. Zusammenfassung 74

6. Literaturverzeichnis 75

7. Anhang: Dokumentation 88
7.1 Dokumentation der Patienteninformation 88
7.2 Dokumentation der Einverständniserklärung 90
7.3 Dokumentation der Zustimmung der Ethik-Kommission 91
7.4 Publikationen im Rahmen der Dissertation 91

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BCA	Bicinchoninsäure
BKV	Berufskrankheitenverordnung
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
cm	Zentimeter
EAST	Enzym-Allergen-Sorbent-Test
et al.	et alii
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
kDa	kiloDalton
kU/l	kiloUnit per Liter
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
MW	Molekulargewichtsmarker
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAST	Radio-Allergen-Sorbent-Test
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TTBS	Tris-Tween-Buffered Saline
V	Volt

1. Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik „Allergie“

Der Begriff „Allergie“ erschien erstmals in der „Münchener Medizinischen Wochenschrift“ vom 24. Juli 1906, geprägt vom Wiener Kinderarzt Clemens Johann von Pirquet, der ihn für die spezifisch veränderte Reaktionsfähigkeit des Organismus vorschlug (Pirquet 1906).

Eine erste Familienanamnese eines atopischen Syndroms mit Asthma, Rhinokonjunktivitis und atopischem Ekzem findet sich im julisch-claudischen Kaiserhaus mit Augustus, Claudius und Britannicus (Ring 1985). Im Mittelalter kannte man das „Rosenfieber“ mit Heuschnupfen-Symptomatik und Richard III. von England soll gegen Erdbeeren allergisch gewesen sein (More 1931). Im Jahre 1819 beschrieb Bostock erstmals klinisch exakt den Heuschnupfen (Bostock 1819).

Einen besonderen Aufschwung hat die Allergologie durch die Entdeckung des Immunglobulins E durch Ishizaka 1966 und Johansson 1967 erfahren, das als Träger der Überempfindlichkeit vom Soforttyp erkannt wurde (Ishizaka K und Ishizaka T 1967, Johansson 1967, Johansson et al. 1968).

In der heutigen Zeit versteht man unter der Allergie eine spezifische Änderung der Immunitätslage, in deren Folge es zu einer übersteigerten Reaktion des Organismus auf körperfremde, eigentlich unschädliche Substanzen kommt, die aus der allgemeinen Umwelt stammen und somit als „Allergene“ fungieren (Stadler 1997).

Es handelt sich dabei um eine spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Immunsystems, die mit der Bildung spezifischer IgE-Antikörper einhergeht. Dabei kommt es nach einem klinisch stummen Erstkontakt zu einer Sensibilisierungsphase von mindestens fünf Tagen bis hin zu mehreren Jahren sowie dem Auftreten von Entzündungsreaktionen an den allergisierten Organsystemen (Bergmann 2001 a).

Einführend sollen in einer kurzen Übersicht die wichtigsten Begriffe zum Thema Allergie erläutert werden, um sie anschließend, Bezug nehmend auf die vorliegende Untersuchung, zu konkretisieren.

Einteilung der Allergien: Einteilungen von Allergien sind vor allem didaktischer Natur. Die im Lehrbuch getrennt beschriebenen Typen und Reaktionen laufen im lebenden Organismus parallel und unter gegenseitiger Beeinflussung ab. Unter

diesem Gesichtspunkt ist auch die Typisierung durch Coombs und Gell nach Pathomechanismen (Coombs und Gell 1963) sowie weitere Einteilungen wie z.B. nach Allergenen (z.B. Tierhaarallergie), nach Symptomen (z.B. Asthma), nach betroffenen Organen (z.B. Haut, Auge, Nase) oder nach Verlauf und Prognose (akute oder chronische Allergie) zu sehen (Ring 2004).

Die aktuelle Einteilung der Allergene erfolgt nach einer Allergen-Nomenklatur von Marsh aus dem Jahr 1988 (Marsh et al. 1988) und erfasst alle molekular charakterisierten IgE-induzierenden Allergene. Diese Einteilung wird ständig durch eine Organisation der WHO revidiert und vervollständigt (King 1999).

Viele IgE-auslösende Allergene sind Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 5000 und 70000 Dalton (D), manchmal auch Glykoproteine und einige sind bereits in ihrer molekularen Struktur aufgeklärt und auch als synthetische Allergene verfügbar. Trotzdem ist es oft noch nicht bekannt, was einen Stoff zum Allergen macht. Es wird angenommen, dass die Immunantwort von mehreren Faktoren abhängig ist:

1. Proteingröße
2. Antigendosis (niedrig, mittel, hoch)
3. Immunisierungsmodus (Art, Ort und Häufigkeit der Immunisierung)

(Aalberse 2000, Chapman et al. 1997, Scheiner und Kraft 1995).

Weiterhin müssen Antigene zwei Funktionen zur Auslösung einer Allergie erfüllen:

1. Während einer Sensibilisierungsphase (= Erstkontakt) muss die aufgenommene Substanz vom Immunsystem als fremd erkannt werden und zur Produktion von IgE-Antikörpern führen.
2. Bei erneutem Kontakt mit dem Allergen (= Zweitkontakt), Monate oder auch Jahre später, muss das Allergen Zugang zu IgE-präsentierenden Zellen erlangen, um die IgE-Antikörper auf der Zelloberfläche zu vernetzen. Dabei kommt es zur Freisetzung entzündlicher Mediatoren mit der sich anschließenden allergischen Symptomatik (Stadler 1997).

1.2 Pathophysiologie und Klinik der IgE-vermittelten allergischen Reaktion

Die in der vorliegenden Arbeit thematisierten allergischen Atemwegserkrankungen werden dem Typ I zugerechnet, der klassischen allergischen Sofortreaktion. Eine in der Bevölkerung relevante Allergenquelle sind z.B. Tierhaare.

Die Immunreaktion wird dabei über IgE-Antikörper vermittelt, die sich meistens gegen lösliche Allergene richten (König et al. 1981).

Das **Immunglobulin E (IgE)** wurde durch Ishizaka und Johansson entdeckt und im Jahr 1967 erstmals beschrieben (Ishizaka K und Ishizaka T 1967, Johansson 1967). Sein Molekulargewicht beträgt 190000 Dalton (Bennich und Johansson 1971).
Das IgE wird differenziert in das Gesamt-IgE im Serum/Plasma (Rothe 1992) oder in Sekreten (Bachert et al. 1990) und das allergenspezifische IgE, welches sich gegen ein bestimmtes Allergen richtet (Debelic und Schwenker 1986).

Das **Gesamt-IgE** ist im Serum gesunder Menschen in extrem niedrigen Mengen vorhanden. Unter physiologischen Umständen finden sich Konzentrationen von 0,1–0,7 ng/ml bis zu ca. 30 ng/ml. Bei allergischen Erkrankungen sind die IgE-Werte jedoch erhöht (Debelic 1979, Pürschel und Pahl 1986, Wüthrich et al. 1973). So nimmt z.B. das Risiko an Asthma zu erkranken mit der Erhöhung des IgE-Spiegels im Blut zu (Burrows et al. 1989).

Das **spezifische IgE** beschreibt diejenige Fraktion der gesamten IgE-Antikörper im Serum, deren Spezifität gegenüber bestimmten Allergenen mithilfe von In-vitro-Testverfahren bestimmt werden kann. Ein erfolgter Nachweis von spezifischem IgE bedeutet, dass eine signifikante Sensibilisierung gegenüber entsprechenden Allergenen vorliegt.

Die **IgE-vermittelte Reaktion** entsteht durch Brückenbildung zwischen dem Allergen und mindestens zwei IgE-Molekülen auf der Oberfläche von Mastzellen bzw. basophilen Granulozyten (Bennich und Johansson 1971, Galli 2000, Hammer 1979, Vercelli und Geha 1992). Die menschliche Mastzelle hat 104 bis 105 IgE-Rezeptoren (Kinet 1999, Metzger et al. 1984). Rezeptoren für IgE finden sich ebenso auch auf Langerhanszellen (Bieber et al. 1992) sowie auf Monozyten atopischer Patienten (Maurer D et al. 1994).
Nach erfolgter Brückenbildung wird die Freisetzungsreaktion bestimmter Mediatoren über verschiedene energie- und kalziumabhängige Schritte ausgelöst. In Folge der Mediatorausschüttung kommt es zu einer lokalen inflammatorischen Antwort. Dabei wird die lokale Durchblutung sowie die Gewebedurchlässigkeit erhöht, sodass

schnell mehr Abwehrmöglichkeiten an den Ort der Infektion gelangen. Das klinische Erscheinungsbild hängt dabei von drei Faktoren ab: der Anzahl der IgE-Antikörper, dem Eintrittsweg des Allergens und der Allergendosis. Sobald nach dem Erstkontakt genügend IgE-Antikörper auf den Mastzellen vorhanden sind, führt ein erneuter Kontakt mit demselben Antigen zu einer akuten Entladung der Mastzellgranula und damit zu einer Überempfindlichkeitsreaktion, der Allergie.

Zu den IgE-vermittelten allergischen Reaktionen zählen:

- Asthma bronchiale
- Allergische Rhinitis
- Typ-I-allergische Konjunktivitis
- Atopisches Ekzem (atopische Dermatitis),

wobei diese Krankheitsbilder oft in Kombination auftreten. Die häufigsten Auslöser für allergisches Asthma sind Milben, Tierhautschuppen und -haare, Federn, Pollen und Schimmelpilzsporen.

Klinisch kommt es im Bereich der Augen zu Sekretion, Pruritus, Fremdkörpergefühl und Lidödemen, im Bereich der Nase zu Fließschnupfen, Obstruktion, Niesreiz bis hin zur Rhinokonjunktivitis (Simons 1996). Die allergische Rhinitis stellt oft die Vorstufe des allergischen Asthmas dar (Bousquet et al. 2001, Simons 1999).

Im Bereich der Haut stellen sich Ekzeme, Urtikaria, Erytheme und Pruritus dar (Ring und Przybilla 1987, Müsken 2000).

Im Bereich der tiefen Atemwege kommt es zu einem Anschwellen der Bronchialschleimhaut, wobei ein zähes, weißes Sekret produziert wird, das nur schwer abzuhusten ist. Typisch ist das anfallsartige Verkrampfen der Atemwegsmuskulatur, die zu einer Verengung der Atemwege führt und mit akuter Luftnot einhergeht. Der Asthmatiker bekommt Schwierigkeiten, die Luft ein- und insbesondere auszuatmen, es kommt zu den charakteristischen trockenen, pfeifenden Rasselgeräuschen (Giemen und Brummen) und er hat Atemnot bis hin zur Erstickungsangst (Bergmann 2001 b, Kay et al. 1984, Nolte 1996).

1.3 Diagnostik allergischer Erkrankungen

Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die Möglichkeiten der Diagnostik bei allergischen Erkrankungen.

Die Allergie-Diagnostik umfasst mehrere Schritte (Stufendiagnostik), die aufeinander aufbauen und sich ergänzen:

- Anamnese
- Hauttestung (In-vivo-Diagnostik)
- In-vitro-Allergie-Diagnostik und
- Provokationstests (In-vivo-Diagnostik)

(Kemp und Lockey 1999).

Als wichtigster Bestandteil in der Diagnostik gilt die Anamnese. Wird sie sorgfältig durchgeführt, ergibt sie schon die halbe Diagnose und bietet so die Möglichkeit, die Testverfahren gezielt einzusetzen (Ring 2004).

1.3.1 Klinische Diagnostik (In-vivo-Methoden) IgE-vermittelter Allergien

Die klinische Diagnostik soll hier nur kurz aufgeführt werden, da sie für die vorliegende Arbeit von untergeordneter Bedeutung ist.
Man unterscheidet zwischen dem Hauttest und dem Provokationstest am Zielorgan.
Den Hauttest differenziert man in epikutane (Patch-Test) und kutane (Prick, Scratch, intrakutan) Testverfahren.
Eigentlich ist bereits der Hauttest ein „Provokationstest“, nämlich eine Provokation am Zielorgan Haut. Unter der eigentlichen Provokationstestung versteht man allerdings die Exposition eines betroffenen Organs mit dem fraglichen Allergen. In der Praxis werden folgende Testungen unterschieden: konjunktivaler Test, nasaler Test und bronchialer Test (Diebschlag 1996, Ring 2004).

1.3.2 Immunologische Diagnostik (In-vitro-Methoden) IgE-vermittelter Allergien

Die immunologischen Methoden dienen dem Nachweis spezifischer IgE-Antikörper gegen verdächtige Stoffe und zeichnen sich durch eine große Vielfalt aus. Man unterscheidet die humoralen von den zellulären immunologischen Methoden, wobei die zellulären Methoden die Reaktionen von Zellen, die humoralen Methoden die von Antikörpern oder Antigenen messen. Humorale Methoden sind Antigen-Antikörperreaktionen, die dem In-vitro-Nachweis von Antikörpern mit Hilfe bekannter Antigene oder dem Nachweis von Antigenen mit Hilfe bekannter Antikörper dienen. Die wichtigsten Methoden sind die Präzipitation, Agglutination, lytische Reaktionen

inklusive Komplementbindungsreaktionen (KBR), Neutralisationsreaktionen und spezielle Methoden wie die Immunblot-Technik (Diebschlag 1996, Keller 1994).
Zur Bestimmung von Gesamt- und spezifischen IgE werden Markierungsmethoden wie der Radio-Allergen-Sorbent-Test (RAST), eingeführt im Jahr 1967 (Wide et al. 1967), bzw. der Enzym-Allergen-Sorbent-Test (EAST) genutzt. Die Nachweisgrenze der Antigen- oder Antikörperkonzentration liegt für die Markierungsmethoden im Milli- bis Nanogrammbereich (Adkinson 1981, Cesca und Lundkivst 1972, Gleich und Jones 1975, Gronemeyer 1979).

Im Folgenden sollen der Immunblot und der Radio-Allergen-Sorbent-Test näher beschrieben werden, da auf diesen Techniken die immunologische Methodik zur Bestimmung des spezifischen IgE für die vorliegende Arbeit basierten.

Der **Immunblot** ist eine Methode, bei der Makromoleküle von einem Gel auf ein anderes Medium, z.B. eine Membran, überführt werden. Man unterscheidet dabei zwischen Southern- (DNS-Transfer), Northern- (RNS-Transfer) bzw. Western-Blot (Protein-Transfer).
Mit Hilfe der Western-Blot-Technik können kleine Mengen eines Proteins (potentielle Antigene) nachgewiesen werden. Dabei werden die Proteine und das zu identifizierende Antigen durch Polyacrylamid-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Durch Inkubation mit dem Patientenserum (Antikörper) und der Reaktion mit einem markierten Anti-Immunglobulin mit anschließender Entwicklung kann der Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar gemacht und somit nachgewiesen werden (Burnette 1981, Peltre et al. 1982). Er dient dazu, das individuelle spezifische IgE-Muster im Patientenserum durch Darstellung des Molekulargewichtes des Antigens zu bestimmen.
Mittels des Immunblots kann der IgE-Antikörper-Nachweis für einen Patienten erfolgen sowie die Einteilung, gegen welche Allergene seine IgE-Antikörper gerichtet sind (Wahl 1992).
Aus dem Bereich der Insektengiftallergie gibt es Hinweise, dass bei negativem RAST und negativem Hauttest der Immunblot trotzdem positiv und somit diagnostisch wegweisend sein kann (Ollert und Ring 1999).

Der **Radio-Allergen-Sorbent-Test (RAST)** ist die klassische Methode zum Nachweis spezifischer Antikörper, die im Laufe der Jahre durch den aktuelleren **Enzym-Allergen-Sorbent-Test (EAST)** abgelöst wurde, wobei der Begriff „RAST“ unabhängig von der Verfahrenstechnik als Nachweis für spezifisches IgE geläufig ist (Wide et al. 1967, Yman et al. 1975).

In dem CAP-RAST (Capacity-RAST) von Pharmacia, der die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode darstellt, werden zur Allergenbindung Polystyrolkugeln verwendet (Axen et al. 1988). Die Werte des bestimmten IgE-Antikörpertiters werden mit denen eines Referenzsystems verglichen und in sechs Klassen eingeteilt (Yman 1990). Gängig sind in den anderen Testsystemen auch Klassenunterteilungen von 1 bis 4.

CAP-Klasse	0	1	2	3	4	5	6
[kU/l]	<0.35	0,35–0,7	0,7–3,5	3,5–17,5	17,5–50	50–100,0	>10,0
Risiko einer allerg. Erkrg.	nicht vorhanden	niedrig	mittel	hoch	sehr hoch	sehr hoch	sehr hoch

Tabelle 1: Einteilung der CAP-RAST-Klassen

1.4 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

In fast allen Industriestaaten konnte in den letzten Jahrzehnten ein deutlicher Anstieg der Häufigkeit von Asthma und Allergien verzeichnet werden (Burr et al. 1989).

Die Unterschiede in der Häufigkeit zwischen den einzelnen Ländern der Welt und auch zwischen den verschiedenen Ländern Europas zeigen z.B. die Studien: „International Study of Asthma and Allergy in Childhood“ (ISAAC) und „The National Asthma Campaign Manchester Asthma and Allergy Study“ (Custovic et al. 2002) für Kinder sowie die SAPALDIA-Studie/Schweiz und „The European Community Respiratory Health Survey II“ von 2002 und die „European Community Respiratory Health Survey in Adults“ (Heinrich et al. 2002, Jaén et al. 2002, Wütherich et al. 2002) für Erwachsene.

Nach Angaben des Ärzteverbandes Deutscher Allergologen (ÄDA) klagt derzeit etwa jeder dritte Deutsche über Allergien: 15% der Bundesbürger leiden unter Heuschnupfen, 10% sind an Asthma erkrankt, bei 5% besteht eine Neurodermitis, 10 % haben eine Hausstaubmilbenallergie, 5 % leiden unter Nahrungsmittelallergien, 3 % haben eine Tierhaarallergie, 2 % leiden unter Insektengiftallergien, 9 % leiden an einer Kontaktallergie.

Eine umfangreiche Übersicht zur Epidemiologie der Allergien in Deutschland liefert der „Spezialbericht Allergien“ des statistischen Bundesamtes, nach der bei 1–4 % der Erwachsenen die Diagnose Bronchialasthma und bei 13–24 % die Diagnose Heuschnupfen gestellt wurde (Wahn und Wichelmann 2000).

Allergische Erkrankungen in der Landwirtschaft: Die Studie der European Community Respiratory Health Surveys (ECRHS) belegt, dass 10% der asthmatischen Erkrankungen in Europa berufsbedingt sind (Blanc et al. 1999). Die Landwirte tragen dabei das höchste Risiko (Kogevinas et al. 1999).
Landwirte sind berufsbedingt täglich und intensiv einer Vielzahl von Substanzen mit allergenem Potential ausgesetzt. Insbesondere bei der Tierhaltung besteht über die Futtermittel, aber auch durch die Tiere selbst, eine hohe Exposition mit potentiell sensibilisierenden Stoffen, die zu einer Erkrankung der Atemwege führen können (Feldner 2002, Gassner 1996, Rylander 1986, Rylander und Peterson 1994). Allergische Erkrankungen wie Rhinitis oder Asthma bronchiale werden bei Landwirten am häufigsten durch Milbenallergene ausgelöst. Seltener erfolgen Sensibilisierungen durch Tierallergene, hier aber am häufigsten durch das Rind (Kroidl und Schwichtenberg 1999).

Im europäischen Vergleich stehen in Skandinavien landwirtschaftliche Atemwegsallergien an der Spitze der Berufskrankheiten, wobei insbesondere Allergene von Vorratsmilben, Getreidestäuben und Rindern als auslösend gelten.
In Finnland werden alle Fälle berufsbedingter Erkrankungen einem Register gemeldet. Die Rinderallergiker führen dieses nationale Register an (Räsänen et al. 1994). Es wird geschätzt, dass 30 bis 40 % der neu registrierten Fälle von berufsbedingtem Asthma und Rhinitis durch tierische Epithelien, speziell durch das Rind, verursacht werden (Karjaleinen et al. 2000, Reijula und Patterson 1994). Andere Studien aus Nordeuropa zeigen eine Sensibilisierung von 5–14% der Landwirte für Rinderallergie (Rautalahti et al. 1987, Terho et al. 1985, van Hage-Hamsten et al. 1987).
Eine andere Studie berichtet über Sensibilisierungshäufigkeiten gegen Tierallergene bei dänischen Landwirten aufgrund positiver Hauttestungen und positivem RAST, wobei der Hauttest bei lediglich 3 % und der RAST bei 2 % der Landwirte positiv ausfiel (Iversen und Pedersen 1990).

Erste Erhebungen liegen auch für Deutschland vor, worin geschätzt wird, dass in Norddeutschland ein Zehntel aller berufsbedingten Atemwegserkrankungen in der Landwirtschaft durch Rinder ausgelöst wird. In Süddeutschland wird eine noch höhere Quote vermutet (Meldungen bei Verdacht auf Berufserkrankungen nach Ziffer 4301 BKV von 1990). Seit Anfang 1990 kamen in Gesamtdeutschland insgesamt 513 symptomatische Patienten (davon 54 % männlich), überwiegend Landwirte, mit Verdacht auf eine rinderallergische Atemwegserkrankung zur Anzeige. Bei 42 % dieser Patienten wurde diese Art der Erkrankung auch als Berufskrankheit anerkannt. Unter Berücksichtigung der vier Berufsgenossenschaften in Deutschland, die mehr als 25 der anerkannten Fälle aufwiesen, zeigte es sich, dass in Süddeutschland prozentual mehr Rinderallergiker verzeichnet wurden als in Norddeutschland (Janicke et al. 2004).

Die Möglichkeit der Entwicklung einer Allergie vom Soforttyp auf Tierepithelien, Schimmelpilzen und Lagermilben wird für die Landwirte mit einer Prävalenz von 4 % angegeben, 20–25 % entwickeln nach mehrjähriger Exposition eine bronchitische Symptomatik. Der Anteil der Personen mit einer Hyperreagibilität im Bereich der Nasenschleimhaut und/oder Bereitschaft zu asthmatischen Reaktionen liegt bei 5–6 % (Nowak 1994).

Obwohl Landwirte zu den Berufen mit dem höchsten Risiko für Asthma zählen, ist das Wissen bezüglich der Risikoprofile sowie der Diagnostik- und Präventivstrategien gering. Trotz dieser großen klinischen Bedeutung finden sich in der internationalen Literatur nur wenige Untersuchungen zum klinischen Verlauf einer Rinderhaarallergie.

1.5 Die Rinderhaarallergie

Die Bezeichnung „Tierhaar-Allergie“ ist eigentlich unpräzise, da die allergische Reaktion nicht nur auf die Haare selbst stattfindet, sondern auch auf Bestandteile aus Hautschuppen, Speichel, Kot oder Urin (Taylor und Hardiman 1993). Ein großer Teil der Tierallergene stammt also aus den Haut- oder Speicheldrüsen der Tiere und bleibt an den Tierhaaren, Hautschuppen oder Federn haften (Gordon 1997).

Die wichtigsten Allergene von Säugetieren stammen von Katzen, Hunden, Ratten, Mäusen, Pferden und Rindern. Man unterscheidet sie in Arbeitsplatzallergene (z.B. Rind) und Allergene aus dem allgemeinen Umfeld (z.B. Katze, Hund) (Webber et al. 2000).

Allergene der Rinderhaarallergie: Die Rinderallergene sind nachweisbar in apokrinen Schweißdrüsen, im Urin, im Speichel, in der Molke, in den Haaren und in Epithelien, im Fruchtwasser sowie in Fleisch und Rinderhautprodukten (Prahl 1981).

Als Auslöser der Rinderhaarallergie werden mehrere Allergen-Komponenten diskutiert. Das Majorallergen Bos d 2 scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Es ist ein gut charakterisiertes Protein, von dem bereits Konzentrationen von 20 bis 30 µg/g Hausstaub zu einer höhergradigen Rinderhaarsensibilisierung führen können. Das Bos-d-2-Allergen hat ein Molekulargewicht von 20000 Dalton (20 kDa) und wird zur Lipocalin-Familie gerechnet (Mäntyjärvi et al.1996). Weiterhin sind aber auch mehrere Varianten des Allergens Bos d 2 bekannt, die sich in ihrer 3D-Struktur sowie dem Molekulargewicht unterscheiden und somit auch in ihrer Allergenität (Rautiainen et al. 1998).

Lipocalin-Allergene haben ein Molekulargewicht zwischen 16 kDa und 20 kDa. Die Präsenz von spezifischem IgE gegen diese Allergene ist fast immer mit einem Asthma bronchiale verbunden (Chapman und Wood 2001).

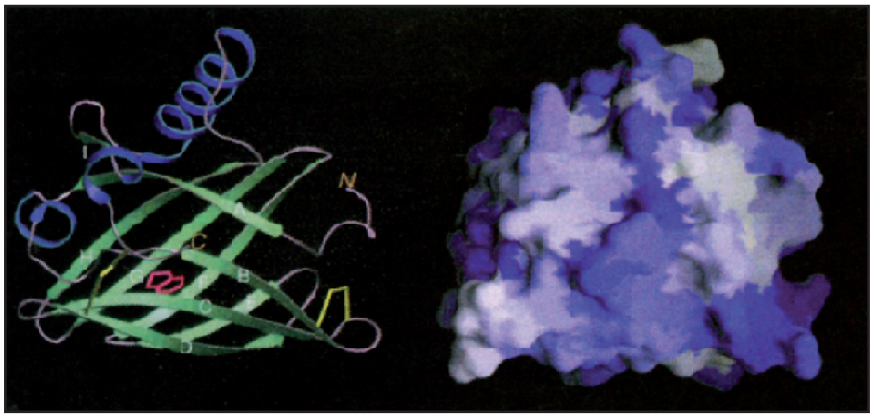

Abb. 1: Dreidimensionale Darstellung des Allergens Bos d 2 (Rouvinen et al.1999, S. 2340).

Neben dem bereits beschriebenen Allergen Bos d 2 wurden noch weitere Allergene von verschiedenen Arbeitsgruppen isoliert und charakterisiert. Die Hauptallergene lassen sich dabei der Bos-domesticus(domestic cattle)-Gruppe zuordnen. Die Einteilung erfolgt nach der neuen Allergen-Nomenklatur von Marsh, mit den Bezeichnungen Bos d 1 (alt: Ag1), Bos d 2 (Ag3) und Bos d 3 (Ag6) (Marsh et al. 1988, Larsen und Løwenstein 1996).

Die Allergene Bos d 1 und Bos d 2 scheinen besonders wichtig im Zusammenhang mit der Rinderhaarsensibilisierung zu sein und wurden auch als Majorallergene für den Menschen verifiziert (Hinze et al. 1996).
Als Majorallergene werden die Allergene bezeichnet, die mehr als 50 % der Allergiker sensibilisieren, also spezifisches IgE binden oder Hautreaktionen hervorrufen (Rieger 1997). Ein Majorallergen ist aber nicht automatisch bzw. synonym als Hauptallergenrisiko zu bezeichnen (Aalberse 2000).

Der direkte Rinderkontakt im Kuhstall ist allerdings nicht die einzige Exposition mit Rinderallergenen. Es zeigt sich eine positive Korrelation zwischen dem Sensibilisierungsgrad des Patienten und der Bos-d-2-Konzentration im Hausstaub. Als Schwellenwerte für eine Sensibilisierung sind für Atopiker Bos-d-2-Konzentrationen zwischen 1 und 21 µg/g Hausstaub vorgeschlagen, während die Diskriminatoren bei Nichtatopikern 24 bis 50 µg Bos d 2/g Hausstaub betragen. Das bedeutet, dass bei nichtatopischen Rinderhaarasthmatikern erst höhere Bos-d-2-Konzentrationen im Hausstaub zu einer relevanten Rinderallergensensibilisierung führen als bei Atopikern. Schwellenwertkonzentration von 20 bis 29 µg Bos d 2/g Hausstaub können schon zu einer höhergradigen Rinderhaarsensibilisierung führen. Diese Schwellenwertdosis ist vergleichbar mit Hausstaubkonzentrationen von Hund-, Katzen-, Hausstaubmilben- und Küchenschabenallergenen, die eine IgE-Sensibilisierung auslösen können (Hinze et al. 1996).

Klinik der Rinderhaarallergie: Hinze und Bergmann (1995) haben in einer Studie den Krankheitsverlauf von 67 allergischen Rinderhaarasthmatikern nachvollzogen. Fast alle dieser Patienten hatten seit frühester Kindheit regelmäßigen Kontakt zu Rindern, erste Symptome wurden aber erst nach einer Latenz von durchschnittlich 33 ± 13 Jahren bemerkt. Dabei waren die Symptome der allergischen Rhinokonjunktivitis und Husten am häufigsten vertreten. Weiterhin litten zwei Fünftel an Auswurf und erschwerter Atmung und ein Drittel hatte eine Kontakturtikaria und Belastungsdyspnoe. 6 ± 3 Jahre nach Symptombeginn kam es zu den stärksten Beeinträchtigungen wie Atemnotfällen bei Rinderkontakt und Komplikationen wie unspezifische bronchiale Hyperreaktivität und kardiorespiratorische Insuffizienz. Im Vergleich zu Nichtatopikern zeigen Atopiker einen höheren Grad der Sensibilisierung gegen Rinderepithelien hinsichtlich RAST,

Intrakutantest und Serum-IgE. Die nichtatopischen Rinderhaarasthmatiker leiden weniger häufig an einer gleichzeitig bestehenden allergischen Rhinokonjunktivitis und Kontakturtikaria als atopische Rinderhaarasthmatiker. Der Zeitraum zwischen Erstkontakt zu Rindern und Symptombeginn war bei Nichtatopikern um im Mittel sechs Jahre länger als bei atopischen Patienten. Weiterhin ist der Grad der Rinderhaarsensibilisierung im RAST und Intrakutantest bei Nichtatopikern weniger hoch (Hinze und Bergmann 1995).

In einer Zusammenfassung einer anderen Studie für die Exposition mit verschiedenen landwirtschaftlichen Nutztieren (Pferde, Rinder, Schweine, Hunde und Kaninchen) wird eine Latenzzeit von 8,1 Jahren für die allergische Rhinitis und 12,6 Jahren für das allergische Asthma beschrieben, wobei jedoch der Expositionsbeginn nicht erwähnt wurde (Wallenstein et al. 1977).

Soziale Folgen der Rinderhaarallergie: Allgemein sind nach bevölkerungsbezogenen Studien etwa 5–10 % der Asthmaerkrankungen auf berufliche Faktoren zurückzuführen (Kogevinas et al. 1999). Das Geschehen der Berufskrankheiten in Deutschland spiegelt sich in der wissenschaftlichen Literatur nur teilweise wider. Nutztiere wie das Rind zählen aber zu den auslösenden Ursachen, bei denen ein allergischer Mechanismus als gesichert gilt (Van Kampen et al. 2000).

So stehen die berufsbedingten Atemwegserkrankungen durch landwirtschaftstypische Allergene an der Spitze der Berufskrankheiten, was sich auch in den Statistiken der landwirtschaftlichen Sozialversicherungsträger in Deutschland widerspiegelt. Sie verursachen nicht nur die meisten Berufskrankheitsmeldungen, sondern auch die höchsten Anerkennungsraten, woraus erhebliche Folgekosten durch Rentenleistungen und Präventionsmaßnahmen resultieren.

Berufsbedingte chronisch obstruktive Atemwegserkrankungen sind nicht nur durch die Entstehung der direkten Kosten für das Sozialversicherungssystem von erheblicher ökonomischer und sozialmedizinischer Relevanz, sondern auch durch den infolge der Lungenfunktionsminderung resultierenden Produktionsausfall.

So hat für Landwirte das Auftreten berufsbedingter Atemwegserkrankungen neben den eigentlichen Beeinträchtigungen durch die klinischen Symptome auch weiterreichende Auswirkungen im sozioökonomischen Bereich, da die einzig wirkungsvolle Therapie in

der Abschaffung der Rinder besteht sowie der zusätzlichen Sanierung des gesamten Wohnbereiches, da die Rinderallergene über einen längeren Zeitraum im Hausstaub nicht abgebaut werden.

Somit ist für viele Betroffene die Erkrankung an Rinderhaarallergie immer noch existenzbedrohend, da viele dieser Betriebe als Familienbetrieb aufgebaut sind und häufig in strukturschwachen Regionen liegen. Eine Umschulung bietet sich wegen mangelnder Perspektiven nicht an oder ist aufgrund des Alters der betroffenen Landwirte nicht mehr möglich. Hier gilt es, eine Verbesserung der Situation zu erreichen. Für den Erkrankten ist es einerseits notwendig den Kuhstall zu meiden, andererseits sollte eine Allergenverschleppung durch andere Personen verhindert werden. Diese Maßnahmen können zu einer Senkung der Allergenmenge im Hausstaub unter die angegebenen Schwellenwerte führen (Hinze 1993).

Ist ein Arbeiten im Stall weiterhin zwingend notwendig, können Atemschutzmasken mit geeigneten Filtern (mindestens Filterklasse 2) und haarbedeckendem Kopfteil sowie bedeckende Arbeitskleidung den Allergenkontakt verhindern. Ein weiterer Punkt zur Allergenvermeidung ist die gute Belüftung aller Arbeitsbereiche im Stall sowie das Einrichten einer „Schmutzschleuse“, sodass Arbeits- und Wohnbereich strikt getrennt werden (Heutelbeck 2002).

Die Diagnostik nimmt hier somit einen hohen Stellenwert in der klinischen Praxis ein, um frühzeitig diese Erkrankung zu erkennen und Möglichkeiten der Therapie und geeigneten Arbeitsschutzmaßnahmen einzuleiten.

Zur Diagnostik stehen kommerzielle Rinderallergenextrakte zur Verfügung, die es ermöglichen sollen, an der Haut oder im Serum sensibilisierter Patienten eine Immunantwort zu indizieren und somit indirekt das Vorhandensein spezifischer IgE-Antikörper nachzuweisen. Zur Diagnostik können auch selbst hergestellte Extrakte aus den Haaren der jeweils eigenen Rinder der Patienten hinzugezogen werden.

Allerdings gibt es in der allergologischen Diagnostik eine Diskrepanz zwischen Allergietestergebnissen mit kommerziellen Tests und eigenen Rinderhaarextrakten. Vergleicht man die Ergebnisse unterschiedlicher diagnostischer Verfahren an der Haut und im Blut miteinander, so muss festgestellt werden, dass die verschiedenen Verfahren zum Nachweis einer Sensibilisierung unterschiedliche Ergebnisse bringen können. Landwirte mit eindeutigen rinderbezogenen Beschwerden reagieren oft

negativ oder nur schwach auf kommerzielle Allergietests. Häufig zeigen die Landwirte aber klare Ergebnisse in der Testung mit den eigenen Rinderhaaren.
Die Ursache liegt möglicherweise an zugrundeliegenden Rohstoffen bzw. an dem individuellen Sensibilisierungsmuster der betroffenen Rinderallergiker. Es wäre denkbar, dass die unterschiedlichen Rassen der gehaltenen Rinder auch unterschiedliche Sensibilisierungsmuster provozieren, die unterschiedlich gut durch die verschiedenen Diagnoseverfahren erfassbar sind. Es ist weiterhin zu vermuten, dass die Zusammensetzung der kommerziellen Rinderallergenextrakte für diese Ergebnisse verantwortlich ist und diese möglicherweise nicht das komplette, zur Sensibilisierung führende Proteinspektrum widerspiegeln.

1.6 Einteilung, Eigenschaften und Vorkommen der Rinderrassen in Deutschland

1.6.1 Einteilung der Rinderrassen

Von der Veterinärmedizinischen Hochschule Hannover wurde die folgende Einteilung der Rinderrassen vorgenommen, die sich an praktischen Gesichtspunkten, wie Milch-, Zucht- oder Mastrindhaltung, genetischen Faktoren sowie an regionalen Besonderheiten orientiert. So findet man die schwarzbunten Rinder häufiger im Norden Deutschlands, während Bunt- und Braunvieh vermehrt im Süden gehalten werden. Die Aufzählung enthält nur die wichtigsten bzw. die in die Studie involvierten Rassen. In Klammern steht die jeweilige internationale Bezeichnung. Die Einteilung soll Grundlage für die Gruppierung der Rinderrassen in der vorliegenden Arbeit sein:

1. **schwarz-weiß-strukturierte Rinder:**
   Deutsche Schwarzbunte (Holstein-Friesian), Schwarzbuntes Milchrind (German Black Pied Dairy/ehemalige DDR)
2. **schwarzhaarige Rinder:**
   Deutsche Angus (German Angus), Galloway (Galloway)
3. **rot-strukturierte Rinder:**
   Deutsches Fleckvieh (Simmental), Deutsche Rotbunte (German Red Pied), Hereford (Hereford)
4. **rothaarige Rinder:**
   Hessisches Rotvieh (Hessian Red)

5. **braunhaarige Rinder:**
   Original Allgäuer Braunvieh (Original German Brown), Deutsches Braunvieh (German Brown)
6. **grauhaarige Rinder**
7. **blauhaarige Rinder**
8. **hellhaarige (blonde) Rinder:**
   Jersey (Jersey), Limousin (Limousin), Blonde d`Aquitaine (Blonde d`Aquitaine)
9. **weißhaarige Rinder:**
   Charolais (Charolais)

1.6.2 Eigenschaften der wichtigsten in Deutschland gehaltenen Rinderrassen

Deutsches schwarzbuntes Vieh (Milchrasse)

Deutsches schwarzbuntes Vieh ist eine in Deutschland besonders zahlreich vertretene Rasse. In den alten Bundesländern macht sie über ein Drittel aller Rinder aus, in den neuen Bundesländern über vier Fünftel. Typisch für das deutsche schwarzbunte Vieh ist das breite, quadratische Becken und die geräumige Milchdrüse mit den markant ausgebildeten Eutervenen (Biedermann 1995).

Fleckvieh (Rasse mit kombinierter Nutzung)

In Deutschland macht diese Rasse über ein Drittel des gesamten Rinderbestandes aus, in den neuen Bundesländern fast ein Fünftel. Die wichtigsten Zuchtgebiete sind Baden-Württemberg und Bayern. Das Fell dieses Rindes ist gefleckt, weiß mit gelbem bis rotem Kopf. Bauch, Gliedmaßen und Schwanzende sind weiß. Das Flotzmaul (feuchter Teil der Nase) ist rosig, die Hörner sind wachsgelb. Es ist ein Rind mit einer sehr guten Milchleistung. Auch bei der Mast zeigt es gute Zunahme und gute Fleischqualität (Biedermann 1995).

Rotbuntes Vieh (Rasse mit kombinierter Nutzung)

Unter dieser Bezeichnung werden mehrere rotweiße Rinderrassen geführt, die in ihrer Gesamtheit ein Drittel des in Europa gehaltenen Niederungsviehs darstellen, also rund sechs Millionen Stück. Diese Rassengruppe ist auf Nordwest- und Nordosteuropa konzentriert, überwiegend auf die deutschen Bundesländer. In den alten Bundesländern

steht diese Gruppe zahlenmäßig an zweiter Stelle. Die Haltung zielt auf Milch- und Fleischnutzung (Biedermann 1995).

Braunvieh (Rasse mit kombinierter Nutzung)
Das Braunvieh zählt zu den mittelschweren Rassen. Es ist tiefrumpfig, verfügt über einen kräftigen Knochenbau und ist gut bemuskelt. Die Fellfärbung ist mittel- bis dunkelbraun bzw. graubraun. Das Flotzmaul und die Klauen sind dunkel pigmentiert. Das Flotzmaul ist hell umsäumt, die Innenbehaarung der Ohren ist hell. Ab dem 2. Weltkrieg wurde der „Wirtschaftstyp" gezüchtet, d.h. kleine Rinder mit geringem Futterverbrauch und relativ hoher Milch- und Fleischleistung. Der Restbestand von Original Braunvieh im Allgäu stellt heute mehr oder weniger diese Zuchtrichtung dar. Ab den 70er Jahren erfolgte die Einkreuzung mit Brown-Swiss-Tieren aus Amerika (Biedermann 1995).

1.6.3 Quantitative Verteilung der Rinderrassen in Deutschland

Für das Jahr 1993 sah die Verteilung der wichtigsten Rassen nach Angaben der Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V. (GEH) wie folgt aus: Schwarzbunte: 41,6 %; Fleckvieh: 30,9%; Rotbunte: 13,5 %; Braunvieh: 4,4 %; Fleisch- und Mastrind: 7,8 % (Biedermann 1995).
Eine Rassenerhebung wurde in der Bundesrepublik letztmalig im Jahr 1951 durchgeführt. Um die Verteilung der Rassen auf den Gesamtrinderbestand auch in den Folgejahren zu erfahren, wurden regelmäßig Schätzrechnungen in Form einer Mischkalkulation anhand von Daten aus den Statistiken der Milchleistungsprüfung und der künstlichen Besamung angestellt. In den Jahren 1991 und 1992 konnte zusätzlich auch die Verteilung der Rassen für Gesamt-Deutschland ermittelt werden. Im Jahr 1984 trat die Milchquotenregelung in Kraft, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Entwicklung der Rassenlandschaft ausübte. Schwarzbunte und Fleckvieh bildeten während der gesamten Entwicklung die dominierenden Rassenblöcke in Deutschland, wobei das Fleckvieh den Schwarzbunten seit einigen Jahren den Rang abgelaufen hat. Betrachtet man die Verteilung in Gesamt-Deutschland, so wandelt sich das Bild zugunsten der schwarzbunten Rasse. Der Anteil der Rotbunten erhöhte sich nahezu kontinuierlich, während jener des Braunviehs nach 1985 auf das Niveau der 50er Jahre sank (Biedermann 1995).

1.7 Fragestellung und Ziel der durchgeführten Arbeit

Die Durchführung der vorliegenden Untersuchung bestand darin, mittels Gelelektrophorese kommerziell erhältliche Rinderallergenextrakte verschiedener Anbieter mit eigenen Rinderallergenextrakten verschiedener Rassen in ihrem Proteinmuster zu vergleichen.

Im Immunblot mit Serum von Landwirten mit klaren rinderbezogenen Sofortreaktionen, bzw. klinischen Symptomen wie der Erkrankung der oberen Atemwege (z.B. Rhinitis) und asthmatische sowie dermatologische Erkrankungen sollte nachgewiesen werden, dass in den kommerziellen Extrakten nicht alle für eine Sensibilisierung relevanten Proteine repräsentiert sind.

Hypothese: Es gibt rassespezifische Sensibilisierungen, die sich in diskrepanten Ergebnissen beim Vergleich der kommerziellen mit den eigenen Rinderextrakten zeigen und somit die beobachtete Diskrepanz zwischen den Allergietestergebnissen mit kommerziellen und eigenen Rinderextrakten in der klinischen Diagnostik erklären. Bislang finden sich in der Literatur noch keine dezidierten Untersuchungen zu rassespezifischen Unterschieden.

2. Material und Methoden

Einführend in den experimentellen Teil der Arbeit gibt eine schematische Anordnung der angewandten Methoden und Verfahren, eine Übersicht über den Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte sowie der in Voruntersuchungen zu klärenden Fragen.

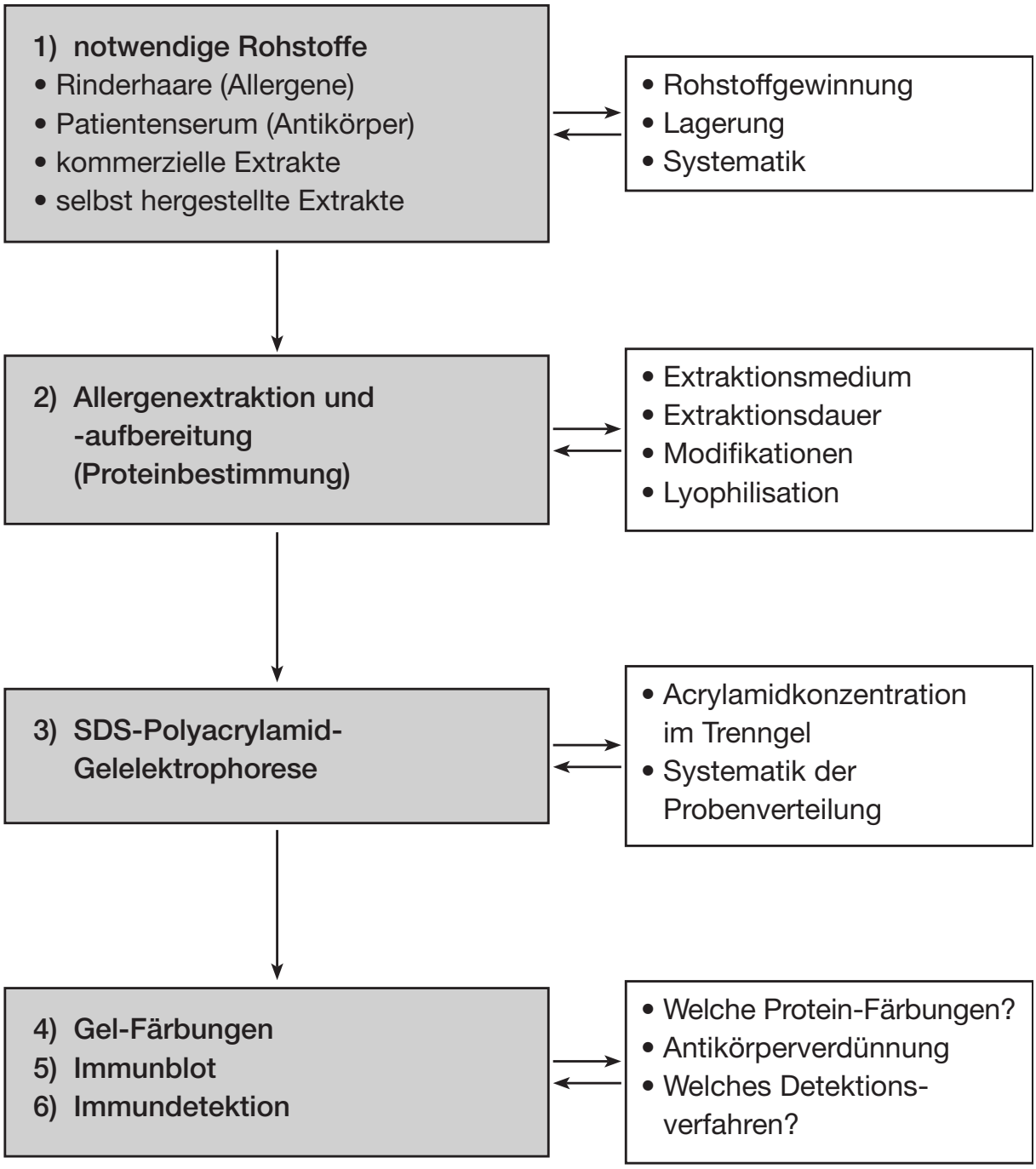

Abb. 2: Übersicht Methoden und Ablauf der Arbeit.

2.1 Gewinnung der Rinderhaare

Die verwendeten Rinderhaare für die Untersuchungen stammen von den eigenen Tieren der allergischen Landwirte. Wenn die Rinderhaltung aufgegeben worden war, was bei etwa einem Drittel der Fälle gegeben war, wurden die Haare von reinrassigen Rindern aus Zuchthöfen verwendet.

Die Rinderhaare wurden von den Landwirten mit einer Handschere oder mit einer elektrischen Haarschneidemaschine von der Bauch- oder Rückenregion des Rindes entfernt und anschließend trocken in sauberen und verschließbaren Kunststofftüten gelagert. Das Entfernen erfolgte so nah wie möglich an der Haut, nicht aber an Kopf oder Schwanz, um eine optimale Ausbeute an Allergenen zu erzielen.

Die Lagerung erfolgte kühl, trocken und gut verschlossen.

Nach der Extraktion der Proteine aus Staubproben erfolgte die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes des Extraktes.

Die Lagerung des Staubprobenpools erfolgte lichtgeschützt und gleichmäßig portioniert bei Raumtemperatur (20 °C ± 2), im Kühlschrank (4 °C ± 1) bzw. in der Gefriertruhe (-20 °C ± 1) für 2, 14, 28 und 250 Tage.

Die Haare folgender Rinderrassen wurden untersucht, da diese von den erkrankten Landwirten angegeben wurden:

- **Schwarzbunte**
- **Fleckvieh**
- **Braunvieh**
- **Rotbunte**
- **Charolais**
- **Limousin**
- **Jersey**
- **Blonde d´Aquitaine**

2.2 Die kommerziellen Extrakte

Die verwendeten kommerziell erhältlichen Extrakte (Rinderhaar-Allergene zur spezifischen Diagnostik) wurden von den Firmen **ALK SCHERAX** (Hamburg), **Allergopharma Joachim Ganzer KG** (Reinbek), **Bencard Allergie GmbH** (München) und **Hal Allergy GmbH** (Düsseldorf) als zusatzstofffreies Lyophilisat zur Verfügung gestellt.

Genaue Angaben über die Herstellung und Bearbeitung der Rohstoffe wurden von keinem der Hersteller gemacht. Die Lyophilisate wurden im Labor nach Herstellerangaben auf eine Zielkonzentration von mindestens 2 mg/ml rekonstituiert, was anschließend durch die Bestimmung des Proteingehaltes bestätigt wurde.

Folgende Informationen zu den kommerziellen Allergen-Extrakten lagen durch Herstellerangaben vor, wobei die Reihenfolge nicht mehr alphabetisch erfolgt, sondern auf Wunsch der Anbieter anonymisiert ist.

I) Verwendet werden Haare und Schuppen folgender Rinderrassen: Schwarzbunte, Charolais, Jersey und Red Danish-Milchkühe. Nach Herstellerangaben wurden aus diesen Rohmaterialien in Voruntersuchungen 17 Allergene isoliert, von denen vier Proteine als Majorallergene bekannt sind, darunter befinden sich die Allergene Bos d 1, Bos d 2 und Bos d 3.

II) Der Extrakt wurde aus Epithelien holländischer Kühe gewonnen, die ein Gesundheitsattest von einem Veterinärmediziner haben. Nähere Angaben über die Spezifikation der Rinderrasse fehlen.

III) Verwendet wurden Rinderepithelien von einer in Nordschweden gehaltenen Rinderrasse: „Swedish hornless cattle“. Die Tiere wurden im Freiland gehalten.

IV) Es gab keine Angaben zu den verwendetet Rinderrassen. Auf Grund der BSE-Problematik sei man Ende 1994 bei der Extraktherstellung von englischen Kühen auf Rinderherden in Südirland ausgewichen. Nach Herstellerangaben besteht keine Spezifikation hinsichtlich Geschlecht und Alter der Tiere. Die Extraktion erfolgte in einem leicht alkalischen Puffer und der Extrakt wurde ultrafiltriert, um niedermolekulare Bestandteile zu entfernen.

2.3 Gewinnung des Patientenserums

Nach der Blutabnahme (ca. 50 ml) erfolgte das sofortige Zentrifugieren vor Ort in der 15,3 ml Monovette® (Sarstedt) und der transportablen Zentrifuge Rotofix II (Hettich). Zentrifugiert wurde 15 Minuten, danach war eine klare Trennung des Serums von den restlichen Blutbestandteilen erreicht, wobei sich das Serum im oberen Bereich absetzte. Das Serum wurde abpipettiert und in gekennzeichneten Schraubröhrchen in einer Kühlbox eingefroren. Danach erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

Ein weiteres Aufrauen und wieder Einfrieren der Seren erfolgte lediglich für die Inkubation der geblotteten Membranen. Die Bestimmung des Gesamt-IgE-Gehaltes und des spezifischen IgE erfolgte in der dermatologischen Klinik der Universität Göttingen mittels des CAP-RAST (Capacity-RAST) von Pharmacia.

2.3.1 Informationen zu den Landwirten

Die Landwirte wurden über die jeweiligen Berufsgenossenschaften angeschrieben und um ihre Teilnahme gebeten. Erst bei Zustimmung gegenüber den Berufsgenossenschaften erfolgte eine Kontaktaufnahme durch die Abteilung Arbeitsmedizin der Universität Göttingen. Im Vorfeld der Untersuchungen wurden die Landwirte über Ziel und Zweck der Untersuchungen aufgeklärt und über eine Einverständniserklärung (siehe Anhang Dokumentation) die Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie eingeholt.

Die 42 mitwirkenden Landwirte kommen aus dem norddeutschen (Niedersachsen) sowie dem süddeutschen (Bayern und Baden-Württemberg) Raum. Es handelt sich um 16 weibliche und 26 männliche Landwirte im Alter zwischen 25 und 74 Jahren mit klinischen Symptomen der Rinderhaarallergie. Über einen Fragebogen (siehe Anlage) wurden anamnestische Informationen zum Beginn, Verlauf und Symptomatik der Erkrankung sowie über den aktuellen Stand bezüglich der Aufgabe oder Weiterführung der Rinderhaltung und einem möglichen Kontakt zu Rindern erfasst. Die Seren wurden mittels CAP-RAST (Pharmacia) auf ihren spezifischen IgE-Gehalt bezüglich der Rinderepithelien getestet. Weiterhin erfolgte die Bestimmung des Gesamt-IgE-Gehaltes und eine Einteilung in Atopiker und Nichtatopiker.

2.4 Durchführung der Laborarbeiten

2.4.1 Die Proteinextraktion (Allergenextraktion)

Die angewandte Extraktionsmethodik folgte der von Prahl beschriebenen Methode (Prahl et al. 1978). Die mechanisch gereinigten Rinderhaare wurden vor der Extraktion auf sichtbare Kontamination mit Schimmelpilzen, Milben oder allgemeinen Verunreinigungen überprüft und anschließend portioniert. Hierfür wurden 2 g der Rinderhaare in 50 ml Sarstedt-Schraubröhrchen gegeben. Als Extraktionslösung diente eine 0,125 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung. Die Haare waren vollständig mit dieser Lösung bedeckt, dabei wurde ein Gewichts-Volumen-Verhältnis von etwa 1:10 eingehalten. Die Extraktionszeit betrug 24 Stunden, wobei die Röhrchen mit den Proben während der ersten 12 Stunden ungekühlt auf der Wippe standen und die folgenden 12 Stunden unbewegt im Kühlschrank bei einer Temperatur von 6 °C

aufbewahrt wurden. Diese Vorgehensweise wurde für alle Extrakte eingehalten. Nach Ablauf der Extraktionszeit wurde der Extrakt in 13 ml Schraubröhrchen überführt, wobei die gequollenen Rinderhaare gepresst wurden und in der Beckmann-Zentrifuge bei 2450 U/min und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und portioniert. 100 µl dienten der Proteinbestimmung, 4 ml wurden lyophilisiert. Ein Rest von 8 bis 10 ml wurde als Reserve bei -20 °C eingefroren. Die Proteinbestimmung diente als Ausgangswert für die Rekonstitution der lyophilisierten Proben, die ebenfalls mit einer 0,125 M Ammoniumhydrogencarbonatlösung durchgeführt wurde. Nach erfolgter Rekonstitution wurden die Extrakte eingefroren.

2.4.2 Die Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Extrakte nach erfolgter Proteinextraktion und Lyophilisation wurde mit Hilfe des Biuret-Assays mit Bicinchoninsäure (BCA) bestimmt und in mg Protein/ml Extraktionslösung angegeben. Verwendet wurde das BCA-Protein Kit der Firma Pierce (Rockford/Illinois, USA).

Die aufgetauten Proben wurden mit vollentionisiertem Wasser verdünnt und anschließend auf dem Vibro Fix VF 20 gut gemischt. Je nach der zu erwartenden Proteinmenge wurden zwei Verdünnungsreihen angesetzt. Die Extraktionslösung wurde 1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt, die rekonstituierten Proben nach der Lyophilisation 1:10, 1:20 und 1:100 verdünnt. Die Proteinbestimmung erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten (Typ Maxi Sorp F96 Surface) der Firma Nalge Nunc International (DK). Für die Standard- und Untersuchungslösung wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden jeweils mit 15 µl so beschickt, dass die Positionen 1 und 2 als Leerwert mit vollentionisiertem Wasser („Blank“-Ansatz) gefüllt waren. Die Positionen 3 bis 12 waren die Proteinstandards, mit der nach Anleitung angesetzten Verdünnungsreihe von 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 und 0,5 mg/ml aus Rinderserumalbumin-Lösung und die Positionen 13 bis maximal 96 enthielten verdünnte Probelösungen.

In jede Kavität wurden anschließend 300 µl der Arbeitslösung pipettiert, die aus 50 Teilen BCA-Lösung A, gemischt mit einem Teil BCA-Lösung B aus dem Kit der Firma Pierce bestand. Die Mikrotiterplatte wurde dann mit Klebestreifen zugeklebt und für 30 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Nach der Inkubation mussten die Proben noch 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen, bevor die Extinktions-

bestimmung in einem Plattenphotometer (Typ Spectra II, SLT Labinstruments) bei 540 nm erfolgte. Die Platte wurde vorher für 3 Sekunden auf dem Plattentisch geschüttelt. Die Messung und Berechnung erfolgte mittels eines angeschlossenen PCs und der Software Easy WIN Kinetics von Tecan (für Microsoft Windows). Hier erfolgte die Verarbeitung der Extinktionen der Proteinstandards zu einer Eichgerade mit zugehöriger linearer Geradengleichung. Durch das Einsetzen der Extinktionswerte der zu bestimmenden Proben in die so entwickelte Geradengleichung und Multiplikation mit der jeweiligen Verdünnung wurde der Proteingehalt berechnet. Extinktionen, die außerhalb des geeichten Proteingehaltes lagen, wurden nicht in die Berechnung einbezogen. Abschließend wurden die Proteinwerte aller Verdünnungen einer Probe gemittelt.

2.4.3 Die SDS-Polyacryamid-Gelelektrophorese

Belegung der Gele: Die kommerziellen Anbieter sind codiert und werden mit den römischen Zahlen I, II, III und IV bezeichnet.
Die Abkürzung der Rinderrassen lautet wie folgt (n = Gesamtanzahl):

Schwarzbuntes Rind: SB (n = 23),
Fleckvieh: Fleck (n = 15),
Braunvieh: Braun (n = 14),
Rotbuntes Rind: Rot (n = 7),
Charolais Rind: C (n = 5),
Blonde d`Aquitaine: BA (n = 2),
Limousin Rind: L (n = 1),
Jersey Rind: J (n = 1).

In Klammern ist die verwendete Anzahl der Rassen in den Immunblots aufgeführt. Bei der Belegung der Gele für die Färbungen und Immunblots wurden jeweils die Rinderrassen verwendet, mit denen die Landwirte durch Rinderhaltung in Kontakt kamen bzw. noch kommen. Bei einigen Landwirten waren das bis zu vier verschiedene Rassen. Bei den ersten Immunblots erfolgte die Auswertung bezüglich der Molekulargewichte indirekt durch den Vergleich mit den SDS-Gelen. Durch das Blotten des Molekulargewichtmarkers konnte dieser Vergleich dann direkt erfolgen.

Die **Auswertung** der SDS-Polyacrylamid-Gele und der Immunblots erfolgte deskriptiv, d.h. die Beurteilung der Stärken der Banden erfolgte im direkten Vergleich zu den anderen Banden im Gel. Die Coomassie- und Silberfärbung sowie die immunologischen Reaktionen wurden unter Berücksichtigung der Intensität der Färbung beurteilt und bewertet. Dabei wurden auch schwache, sich aber sichtbar abgrenzende Färbungen berücksichtigt.

Da für einige Molekulargewichte eine exakte Zuordnung zu einem Molekulargewichtsmarker nicht möglich war, wurden diese einem Molekulargewichtsbereich zugeordnet, wie zum Beispiel 24/25 kDa oder 38 bis 40 (38/40) kDa. Die Bezeichnungen <14 und $<<14$ kDa bedeuten, dass diese Molekulargewichte unterhalb bzw. deutlich unterhalb von 14 kDa liegen, der niedrigsten Molekulargewichtsbestimmung des Markers (MW) „SDS low range“.

Vorbereitend für die Elektrophorese wurden die Proben und der Marker aufgetaut und anschließend durch Verdünnen mit Probenpuffer auf die jeweilige Endkonzentration eingestellt. Hierbei wurde für die Gele der Silberfärbung eine Konzentration von 0,1 mg/ml und für die Gele der Coomassiefärbung sowie die Gele des Immunblots eine Konzentration von 1 mg/ml bzw. 3 mg/ml verwendet. Als Proteingewichtsmarker wurde der „MW low range“ (Bio Rad) verwendet. Um eine Kontrolle des Immublots zu ermöglichen, wurde der „MW SDS 7B“ (Sigma) eingesetzt, dessen Proteine blau gefärbt sind.

Der „MW low range“ wurde für die Gele der Silberfärbung 1:40 und für die Coomassiefärbung 1:10 mit Probenpuffer (Zusammensetzung: 5 ml Ladegelpuffer, 2 ml 10%iges SDS, 0,4 ml Bromphenol-Blaulösung (0,5%ig), 2,1 ml Glycerin) verdünnt. Zu dem Ansatz des „SDS 7B“ wurden (nach Herstellerangaben) 60 µl Probenpuffer gegeben. Abschließend wurde diesen Ansätzen 10 µl 2-Mercaptoethanol zugegeben und dann wurden die Proben 3 Minuten aufgekocht. Parallel zur Probenaufbereitung wurden die Trenn- und Ladegele gegossen. Die Polymerisationszeit betrug je eine Stunde. Die Gele hatten eine Stärke von einem Millimeter und die Maße von 7,3 $\times$10,2 cm. Die Acrylamidkonzentration betrug 15 %, da dadurch gewährleistet war, dass auch Proteinbestandteile mit einem niedrigen Molekulargewicht (bis 15 kDa) eine vollständige Trennung erfuhren.

Nach erfolgter Polymerisation wurden die Laufkammern mit je 800 ml Laufpuffer (Zusammensetzung Laufpufferkonzentrat: 30,3 g Tris, 144 g Glycin, 100 ml 10%iges SDS 100 ml, 1000 ml Wasser (H_2O)/Zusammensetzung Laufpuffer: 80 ml Laufpufferkonzentrat, 720 ml Wasser (H_2O)) gefüllt und die Probentaschen nach dem vorher festgelegten Probenplan mit jeweils 20 µl Probe beschickt. Die anschließende Trennung erfolgte im „Mini 2D Electophoresis Cell Tanksystem“ (Bio Rad). Stromstärke und Spannung wurden mit Hilfe des „Power Pac 300“ (Bio Rad) geregelt und auf folgende standardisierte Werte eingestellt:

Lauf bis zur Grenze Ladegel/Trenngel:	50 mA und 100 V,
ab dem Erreichen der Grenze Ladegel/Trenngel:	85 mA und 150 V.

Das Ende der Elektrophorese wurde durch den Stand der Lauf- bzw. Pufferfront definiert, sichtbar durch den Farbstoff Bromphenol Blau, der dem Probenpuffer zugesetzt wurde und mit Pufferfront lief.
Nach Ablauf der Elektrophorese wurden die Gele aus den Kammern genommen, markiert und entsprechend der Aufgabenstellung durch Coomassie- oder Silberfärbung visualisiert bzw. erfolgte der Transfer mittels Blot auf eine PVDF-Membran für die anschließende Immundetektion.

Für den 15 %igen Trenngelansatz wurden folgende Bestandteile zusammenpipettiert: 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid (40 %), 1,9 ml Trenngelpuffer (3 M Tris HCl, pH = 8,8) und 7,05 ml Wasser sowie 7,5 µl TEMED und – nach einer dreiminütigen Entgasung – 150 µl 10%ige SDS-Lösung. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe einer Spatelspitze Ammoniumpersulfat gestartet.

Für den Ladegelansatz wurden folgende Bestandteile zusammenpipettiert:
1 ml Acrylamid/Bisacrylamid (40 %), 2,5 ml Trenngelpuffer, 5,9 ml Wasser (H_2O) und 7,5 µl TEMED. Dieser Ansatz musste 3 Minuten entgasen, danach wurde er mit 200 µl 10%igem SDS und einer Spatelspitze Ammoniumpersulfat versetzt. Der Ladegel-Ansatz muss vor Gebrauch immer frisch angesetzt werden. Beim Umgang mit Acrylamid und Bisacrylamid waren die Sicherheitsvorschriften strikt einzuhalten, da es sich um starke Nervengifte handelt.

2.4.4 Die Coomassie- und Silberfärbung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Färbemethoden für die SDS-Polyarcrylamid-Gele verwendet.
Um die Aussagekraft der Ergebnisse der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu erhöhen, wurden beide Gel-Färbungen durchgeführt und anschließend im Vergleich ausgewertet.

Coomassiefärbung: Bei der Coomassiefärbung werden die Proteine nach erfolgter Trennung direkt im Gel gefärbt. Gleichzeitig mit der Färbung erfolgt die Fixierung durch die Methanol-Essigsäure-Wasser-Mischung (50:10:40 Volumenteile), in der 0,2 % Coomassie-Brilliant-Blau gelöst sind.
Das für die Coomassiefärbung vorgesehene Gel kommt zusammen mit der angesetzten Coomassiefärbelösung (Volumen von ca. 50 ml) in eine Petrischale (Ø 13 cm). Die Färbung erfolgte auf dem Wipptisch in einem Zeitraum von 30 Minuten. Danach wird die Färbelösung verworfen und das Gel mittels Entfärbelösung (25 Teile Methanol, 7,5 Teile Essigsäure, 67,5 Teile Wasser) so lange entfärbt, bis der Gel-Hintergrund klar ist und nur noch die aufgetrennten Proteine gefärbt sind. Das Gel kann in einer Lagerungslösung von 7,5 % Essigsäure aufbewahrt werden.

Silberfärbung: Bei der Silberfärbung werden die Proteine erst mit 10%iger Trichloressigsäure im Gel fixiert und anschließend in eine Silbernitratlösung eingelegt.
Die Durchführung der Silberfärbung erfolgte nach der Vorschrift der Hersteller mit dem „Silver Quest Kit“ von Invitrogen. Das für die Silberfärbung vorgesehene Gel wurde im ersten Schritt kurz (maximal 30 Sekunden) in ultrareinem Wasser gespült und dann für mindestens 20 Minuten in Fixiererlösung fixiert. Anschließend erfolgte:

- Der erste Waschgang mit 30%igem Ethanol (10 Minuten),
- die Behandlung mit Sensibilisierungslösung (Sensitizer) (10 Minuten),
- der zweite Waschgang mit 30%igem Ethanol (10 Minuten),
- das Spülen mit ultrareinem Wasser (10 Minuten),
- die Behandlung mit der Silberfärbelösung (15 Minuten),
- das kurze Spülen mit ultrareinem Wasser (maximal 20 Sekunden),
- das Entwickeln mit der Entwicklerlösung.

Wenn das gewünschte Ergebnis der Entwicklung erreicht war, wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopp-Lösung beendet, dabei war ein Farbumschlag der Lösung von rosa zu klar zu beobachten. Nach Ablauf von 10 Minuten wurde die Lösung verworfen und das entwickelte Gel mehrmals in ultrareinem Wasser gespült. Die Lagerung erfolgte ebenfalls in ultrareinem Wasser.

2.4.5 Der Immunblot (Western Blot)

Verwendet wurde die Technik des halbtrockenen Sandwich-Blots auf PVDF-Membranen. Als Elektroblot-Apparatur wurde die Halbtrockenzelle Fast Blot B 37 (Biometra) verwendet. Auf die Anode kamen zwei in Transferpuffer getränkte Lagen Blotting-Filterpapier (Schleicher & Schuell) und darauf die PVDF-Membranen. Die für das Blotten vorgesehenen Gele wurden blasenfrei auf diesen Membranen platziert. Abschließend wurde alles mit zwei weiteren Lagen Blotting-Filterpapier bedeckt und die Kathode aufgesetzt (Blotsandwich). Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 160 mA und 10 V. Die Transferzeit betrug 2 Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Blotter geöffnet, das Filterpapier sowie die Gele verworfen, die PVDF-Membranen in Petrischalen überführt und für 10 Minuten in je 50 ml Tris-Buffered Saline-Lösung (TBS) gewaschen. Die Transferkontrolle erfolgte durch den „MW SDS 7B“, der sich während der Elektrophorese aufgetrennt hatte und nun gut auf der Membran zu sehen sein sollte. Nach dem Waschen wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für weitere Proteinbindungen blockiert, indem sie in je 50 ml Roti-Blocklösung (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben wurden. Die Lagerung erfolgte über Nacht im Kühlschrank bei 6 °C.

- **Transferpufferkonzentrat:**
  - Tris 30,3 g/Glycin 112,7 g/Wasser (H_2O) 1000 ml
    Tris und Glycin in ca. 700 ml Wasser auflösen und anschließend auf 1 Liter auffüllen. Das Konzentrat kann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

- **Transferpuffer-Ansatz:**
  - Transferpufferkonzentrat 20 ml/Methanol 40 ml/Wasser (H_2O) 140 ml
    Der Transferpuffer-Ansatz muss vor Gebrauch immer frisch angesetzt werden.

- **TBS-Waschpuffer:**
  - NaCl 29,22 g/Tris 2,42 g/Wasser (H_2O) 1000 ml/Salzsäure (37%ig) bis auf pH-Wert = 7,5

    Natriumchlorid und Tris werden in 500 ml H_2O gelöst, anschließend wird der pH-Wert eingestellt. Dann wird die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt und der pH-Wert kontrolliert. Der Waschpuffer kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.4.6 Die Immundetektion

Die mittels Elektrophorese aufgetrennten und auf eine PVDF-Membran transferierten Proteine wurden durch einen mit alkalischer Phosphatase markierten sekundären Antikörper indirekt detektiert. Als Erst-Antikörper diente das jeweilige Patientenserum in entsprechender Verdünnung, an den der sekundäre Antikörper sich binden konnte. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in Roti-Blocklösung:

Die einzelnen Arbeitsschritte bestanden dabei im Zuschneiden der Membran (Begrenzung: MW SDS 7 b) und der Überführung in eine Petrischale von Ø 9 cm, dem Waschgang von 10 Minuten in je 15 ml Tris-Tween-Buffered Saline (TTBS). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (erste Membran 1:5 verdünnt, zweite Membran 1:20 verdünnt) und einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Der folgende zweite Waschgang wurde 5 × 4 Minuten in je 15 ml TTBS durchgeführt, dann erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Monoclonal anti-human IgE Antikörper/Clone GE-1, Sigma-Aldrich (Steinheim)), (Verdünnung 1:1000), für ebenfalls 60 Minuten und abschließend wurde wieder ein Waschgang von 5 × 4 Minuten in je 15 ml TTBS durchgeführt.

- **TTBS-Waschpuffer:**
  - TBS-Waschpuffer 250 ml/Tween-20 250 µl

    Das Tween-20 wird der TBS-Waschlösung zugegeben und durch Schütteln gut vermischt. (Bei Tween-20 ist zu beachten, dass eine zu hohe Konzentration transferierte Proteine von der PVDF-Membran lösen kann.) Der TTBS-Waschpuffer muss vor Gebrauch immer frisch angesetzt werden.

Die Detektion erfolgt mit BCIP/NBT Färbelösung (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium) direkt auf der PVDF-Membran. Die BCIP/NBT-

Färbelösung wurde immer kurz vor Gebrauch frisch angesetzt. Die benötigten 10 ml pro Membran wurden in Petrischalen, Ø 9 cm, gegeben. Anschließend wurde die Membran nach dem letzten Waschgang von TTBS-Überschuss befreit und in diese Schalen überführt und somit die Entwicklungsreaktion gestartet. Der individuell festgelegte Abbruch der Entwicklung erfolgte durch Verwerfen der Entwickler-Lösung und mehrmaliges Spülen mit Wasser. Abschließend wurde die Membran auf Filterpapier getrocknet und zur Dokumentation eingescannt. Die Aufbewahrung erfolgte in Klarsichtfolien.

Es wurde die chromogene Direktfärbung verwendet, da sie sich nach Herstellerangaben für Färbungen auf PVDF-Membranen unter Verwendung eines alkalisch-Phosphatase-konjugierten Antikörpers sehr gut eignet. Eigene Vorversuche bestätigten diese Aussage. Vorteilhaft ist die einfache Durchführung und die Kontrollierbarkeit über den gesamten Entwicklungsverlauf hinweg. Die so entwickelten Membranen lassen sich exakt auswerten und durch Scannen archivieren.

2.5 Verwendetes Wasser:

a) vollentionisiert:
- zum Spülen der Gele und gefärbten Blots
- zum Ansetzen der Pufferlösungen
- zur Lagerung der silbergefärbten Gele
- zum Ansetzen der Block- und Waschlösungen
- zum Verdünnen bei der Proteinbestimmung

b) Milli-Q:
- zum Ansetzen der Gel-Färbelösungen

2.6 Dokumentation der Immunblots

Zur Dokumentation der getrockneten Immunblots wurde der Scanner EPSON PERFECTION 2450 PHOTO verwendet. Bildbearbeitung und Speicherung erfolgten mittels Adobe Photoshop Elements 1.0.1 unter Windows XP.

2.7 Verwendete Geräte und Materialien

2.7.1 Verwendete Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (40 % W/V Solution, 29-1 Mixture)	Q-BIOgene
2-Mercaptoethanol	amresco, Ohio (USA)
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Bromphenol Blau	Fluka, Buchs (Schweiz)
Coomassie Brilliant Blue G 250	SERVA, Heidelberg
Dimethylformamid (99,5 %)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Essigsäure (99 %)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Ethanol (99 %)	Merck, Darmstadt
Glycerol (85 %)	Bombastus-Werke, Freiberg
Glycin (> 99 % p.a.)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol (99 %)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich
Salzsäure rauchend (37 %)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka, Buchs (Schweiz)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	amresco, Ohio (USA)

2.7.2 Verwendete Substanzen und Kits

Antikörper (sekundär) 0,5 ml (Monoclonal Anti-Human IgE/Clone GE-1/Alkaline Phosphatase Conjugate/ Purified Mouse Immunoglobin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BC Assay Protein Quantitation Kit	Pierce, Rockford/Illinois (USA)
BCIP/NBT Development Solution (AP Color Development Reagent BCIP, AP Color Development Reagent NBT)	Bio Rad (USA)

Molekulargewichtsmarker	
· MW SDS 7 b (Transferkontrolle)	Sigma-Aldrich
· MW low range (Gewichtsvergleich)	Bio Rad (USA)
Roti®-Block (10 × Konzentrat)	Carl-Roth GmbH, Karlsruhe
Silver Quest Kit	Invitrogen

2.7.3 Verwendete Materialien

Blotting Papier GB 003 (460 × 570 mm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Faltenfilter 595 1/2, Ø 185 mm	Schleicher & Schuell, Dassel
Immun-Blot™ PVDF-Membran for	
Protein Blotting (0,2 µm):	Bio Rad (München
· Rolle: 26 cm × 3,3 m	
· Zugeschnitten: 7 × 8,4 cm	
Parafilm „M“	American National Can™ (USA)

2.7.4 Verwendete Geräte

Autoklav 23	MELAG
Beckmann Zentrifuge GS-15R	Beckmann
Blotvorrichtung: Fast Blot B 37	Biometra, Göttingen
Cryovials Röhrchen (2,5 ml)	Greiner
Digitalwaage 3706	Sartorius GmbH, Göttingen
Digitalwaage MC1 (Analytic AC 210 S)	Sartorius GmbH, Göttingen
Eppendorf Cups (Save lock tubes)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipettenspitzen:	
· Combitips (12,5 ml, 25 ml, 50 ml)	
· epT.I.P.S. Standard	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipette Multipipette plus (1–5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Pipetten Reference	
(2–20 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl),	Eppendorf, Hamburg
Erlenmayerkolben (100 ml)	Schott, Mainz
Finnpipette	Thermo Labsystems, Egelsbach
Flaschen (100 ml, 500 ml, 1000 ml)	Biochrome KG, Berlin

Gefriertruhe: HFU 86 (-80 °C)	Heraeus, Hanau
Gefriertruhe: öko-Energiesparer (-20 °C)	Privileg
Gelelektrophoresebestandteile:	Bio Rad (München)
· Modell Mini 2D Electophoresis Cell	
· Mini-Protean™ II Teflon™ Combs (1 mm)	
· Spacer Plates (1 mm)	
· Glasplatten (7,3 × 10,2 cm, 8,3 × 10,2 cm)	
Inkubator: Typ U 10 (bis 220 °C)	Memmert, Schwabach
Lyophilisator: LYOVAG GT 2	Steris
Messbecher (20 bis 1000 ml)	Schott, Mainz
Messkolben (100 ml, 500 ml, 1000 ml)	Schott, Mainz
Messzylinder (1000 ml)	VitLab, Seeheim-Jugenheim
Messzylinder (50 ml, 100 ml)	Schott, Mainz
Messzylinder (500 ml)	Scherf
Mikrotiterplatte: Nunc-Immuno™ Plate (Maxi Sorp™ F96 Surface)	Nalge Nunc International (DK)
Mini-Inkubation Tray	Bio Rad (München)
Petrischalen (Ø 9 cm, Ø 20 cm)	Greiner
ph-Meter: pH 538	WTH, Weilheim
Plattenphotometer: SLT Spectra II	SLT Labinstruments, Crailsheim
Rocking Platform (Wippe)	Biometra, Göttingen
Rotofix II (transportable Zentrifuge)	Hettich, Tuttlingen
Rühr- und Heizplatte: MR 3002	Heidolph, Kehlheim
Rühr- und Heizplatte: RETbasic	IKA-Labortechnik, Staufen
Rüttler: Vibro Fix VF 20	IKA-Labortechnik
Sarstedt Röhrchen (13 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette® (15,3 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Software für die Proteinbestimmung:	
Easy WIN Kinetics	Tecan (für Microsoft Windows)
Transferpipette (1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Transformatoren:	
· Power Pac 300	Bio Rad (München)
· Power Supply	Camag
Ultraschall: Sonorex RK 100 H	Bandelinelektronik
Varoclav®	H+P Labortechnik, Oberschlhm.
Wasseraufbereitung:	
· ELIX 3, Milli-Q plus	Millipore (USA)
· Entsalzer Behropur® B5	Behr, Düsseldorf

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Seren und klinische Daten der Landwirte

In der Tabelle 2 werden die verwendeten Seren bezüglich der Ergebnisse der Untersuchungen auf den Gesamt-IgE-Gehalt und die jeweilige CAP-RAST-Klasse charakterisiert.

RAST-Klasse (CAP-RAST)	0	1	2	3	4	5	6
Landwirte Anzahl	13	6	12	6	3	1	1
[Anteil in %]	31	14	29	14	7	2,5	2,5
Gesamt-IgE > 100	8	2	8	5	1	1	1
Gesamt-IgE < 100	5	3	4	1	2	–	–

Tab. 2: Charakterisierung der Seren, stratifiziert nach dem Gesamt-IgE.

Der niedrigste Gesamt-IgE-Wert beträgt 19 kU/l (RAST 1). Die höchsten Werte betragen 2883 kU/l (RAST 3), 1621 kU/l (RAST 6) und 1136 (RAST 0). 45 % (n = 19) der Seren haben eine RAST-Klasse (CAP-RAST) von 0 oder 1. Dieser Wert entspricht einer negativen bzw. einer fraglich-positiven Allergie-Diagnose.

Klinische Symptomatik der Landwirte:

Bei den 42 Landwirten dieser Studie handelt es sich um 16 weibliche und 26 männliche Patienten im Alter zwischen 25 und 74 Jahren mit klinischen Symptomen der Rinderhaarallergie. In dem erstellten Anamnesebogen wurden dabei Erkrankungen der oberen Atemwege (z.B. Rhinitis), das Asthma bronchiale und dermatologischen Erkrankungen (z.B. Ekzeme und Urtikaria) erhoben und ausgewertet. Die Ausprägung der jeweiligen Symptome spielt für die vorliegende Auswertung eine untergeordnete Rolle. Es soll aber gezeigt werden, dass die Einteilung der Seren in RAST-Klassen und das Auftreten klinischer Symptome einer Allergie nicht zwingend miteinander korrelieren muss. Insgesamt wurden bei den 42 Landwirten 29-mal obere Atemwegserkrankungen, 37-mal asthmatische Symptome und 19-mal dermatologische Erkrankungen diagnostiziert.

In der Tabelle 3 werden die Ergebnisse zusammengefasst. Als eine weitere Information wird noch dargestellt, bei wie vielen der Landwirte zum Zeitpunkt der Befragung noch Kontakt zu Rindern bestand. Da neben der RAST-Klasse die Atopie in der Allergie-Diagnostik eine Rolle spielt, steht auch diese Einteilung in der Tabelle. Ab einem Gesamt-IgE-Gehalt von 100 kU/l spricht man von einem Atopiker.

CAP-RAST (Pharmacia)	n	Atopiker	Obere Atemwegs-erkrankungen	Asthma bronchiale	Dermatologische Erkrankungen	noch Kontakt zu Rindern
0	13	8	9	11	5	8
1	6	3	5	4	4	2
2	12	8	8	11	4	8
3	6	3	4	6	4	5
4	3	1	2	3	1	2
5	1	1	-	1	-	-
6	1	1	1	1	1	1

Tab. 3: Zusammenfassung der klinischen Daten der involvierten Landwirte.

Bei der vergleichenden Auswertung der klinischen Symptome mit den Laborwerten der Seren hat sich gezeigt, dass auch die Landwirte mit einer RAST-Klasse 0 oder 1 eindeutige klinische Symptome einer Rinderhaarallergie aufweisen. In ca. 70 % der Seren (einschließlich RAST 1) stimmen die klinischen Symptome der Rinderhaarallergie mit den ermittelten Werten für die spezifischen IgE-Antikörper überein. Auch wenn die Fallzahl für die Seren der RAST-Klassen 3 bis 6 gering ausfällt, zeigt es sich, dass die typischen Symptome wie Rhinitis und Asthma bronchiale bei der Mehrzahl der Landwirte zu beobachten sind. Bei der aussagekräftigeren Anzahl der Landwirte mit einer RAST-Klasse 0, 1 oder 2 trifft das auf über 50 % der Fälle zu.

3.2 Ergebnisse und Auswertung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der vorliegenden Studie wurden Rinderallergenextrakte von acht verschiedenen Rinderrassen im SDS-PAGE untersucht. Diese Extrakte wurden alle selbst hergestellt. Die einzelnen Rassen wurden den jeweiligen Landwirten nach bestehendem oder ehemaligem Rinderkontakt zugeordnet. Dabei wurden bei noch bestehender Zucht die Haare der eigenen Rinder der jeweiligen Landwirte verwendet. Bei Aufgabe der gesamten Zucht oder einzelner Rassen wurden die Haare reinrassiger Rinder der jeweiligen Rasse von den im Material- und Methodenteil beschriebenen Zuchthöfen

verwendet und den Landwirten zugeordnet. Den acht Rinderrassen standen zum Vergleich die vier kommerziellen Extrakte gegenüber.

Die folgenden vier Abbildungen 3a bis 4b stehen beispielhaft für die gesamten Ergebnisse der Gelelektrophorese und zeigen für die jeweils dargestellten Rinderrassen den direkten Vergleich zwischen der Coomassiefärbung und der Silberfärbung.

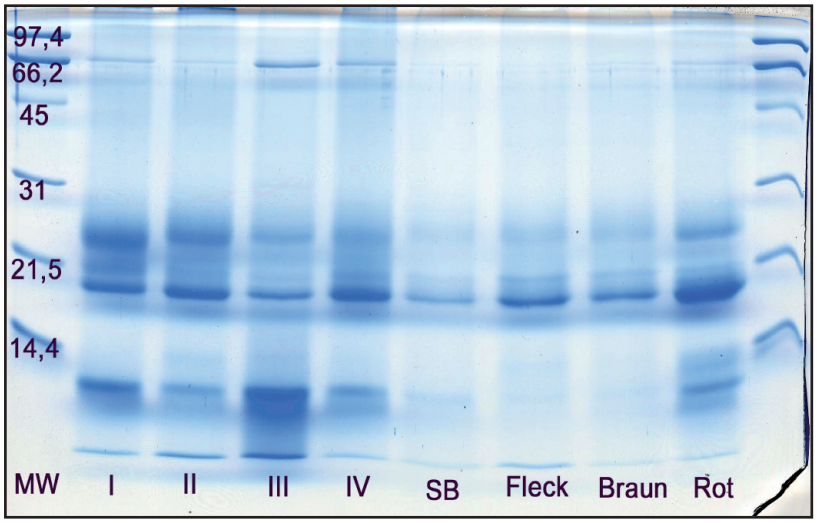

Abb. 3a: SDS-PAGE von Rinderhaarextrakten nach Coomassiefärbung.

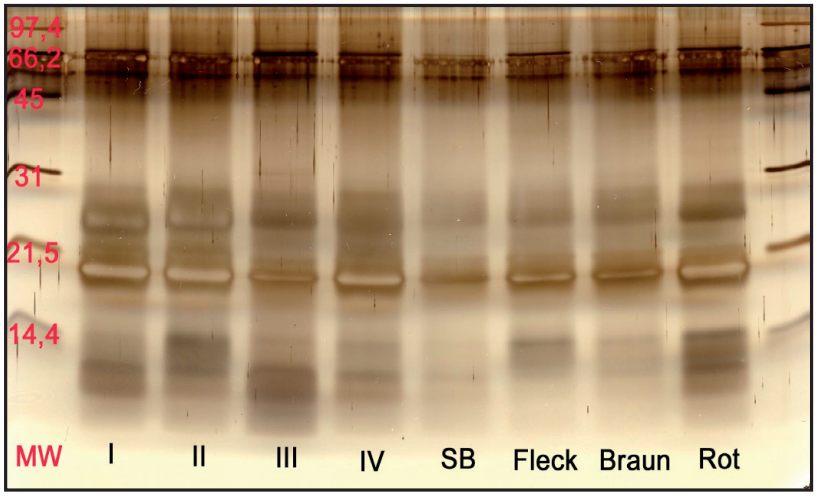

Abb. 3b: SDS-PAGE von Rinderhaarextrakten nach Silberfärbung.

Zu Abb. 3 a/b: Auf jeder Bahn wurden 20 µg Protein (Coomassiefärbung) bzw. 2 µg Protein (Silberfärbung) aufgetragen. Die Proben I bis IV sind kommerziell erhältliche Extrakte. Die anderen Extrakte wurden aus Rinderhaaren der verschiedenen Rassen hergestellt, wobei „SB“ Schwarzbunt, „Fleck“ Fleckvieh, „Braun“ Braunvieh und „Rot“ Rotbunt bedeutet. Links und rechts wurde der mit „MW“ bezeichnete Molekulargewichtsmarker mit jeweils 10 µl aufgetragen.

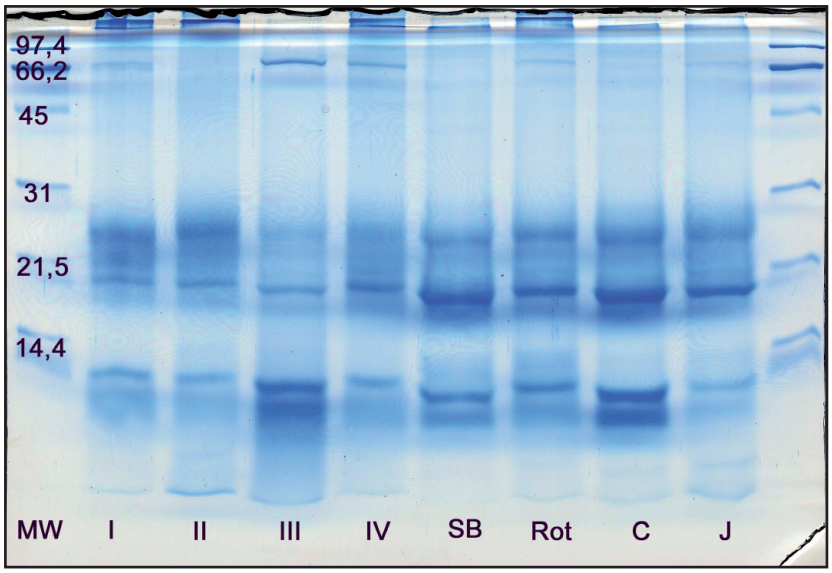

Abb. 4a: SDS-PAGE von Rinderhaarextrakten nach Coomassiefärbung.

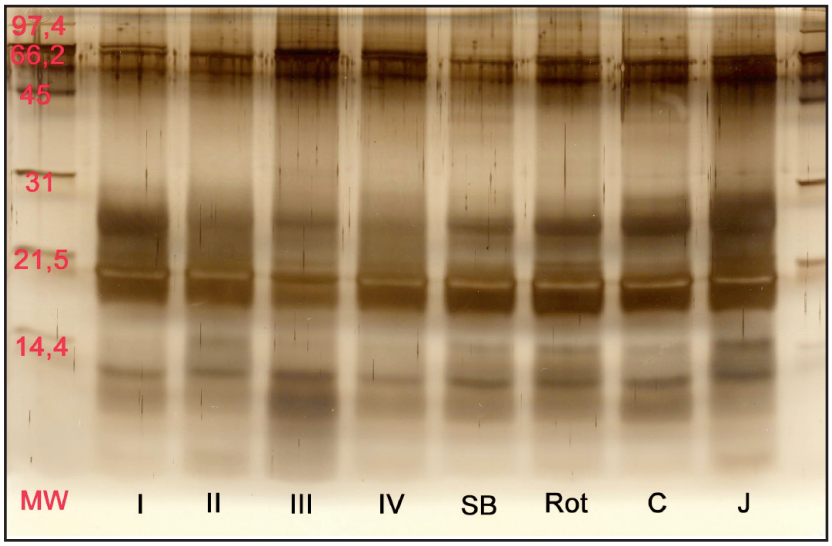

Abb. 4b: SDS-PAGE von Rinderhaarextrakten nach Silberfärbung.

Zu Abb. 4a/b: Auf jeder Bahn wurden 20 µg Protein (Coomassiefärbung) bzw. 2 µg Protein (Silberfärbung) aufgetragen. Die Proben I bis IV sind kommerziell erhältliche Extrakte. Die anderen Extrakte wurden aus Rinderhaaren der verschiedenen Rassen hergestellt, wobei „SB“ Schwarzbunt, „C“ Charolais und „J“ Jersey bedeutet. Links und rechts wurde der mit „MW“ bezeichnete Molekulargewichtsmarker mit jeweils 10 µl aufgetragen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Rassen erfolgte die Auswertung der Gele durch einen Vergleich der beiden angewandten Färbungen. Wichtig für die Beurteilung dieses Ergebnisses ist, dass die beiden Gel-Färbungen Coomassie- und Silberfärbung dabei gemeinsam in die Beurteilung eingehen, die Auswertung also im Sinne einer Doppelbestimmung erfolgt. In diesem Vergleich konnten keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl und Verteilung der Banden in den einzelnen Molekulargewichtsbereichen aufgezeigt werden, wobei die Intensität der Banden nicht berücksichtigt wurde.

Die Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die in den SDS-Polyacrylamid-Gelen nachgewiesenen Färbereaktionen in den jeweiligen Molekulargewichtsbereichen.
Es wird hier lediglich dargestellt, ob eine Reaktion stattgefunden hat oder nicht. Ausgewertet und verglichen werden jeweils nur die Extrakte mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Das Ergebnis dieser Auswertung ist eine Zusammenfassung der Reaktionen innerhalb der jeweiligen kommerziellen Extrakte sowie innerhalb einer Rasse der selbst hergestellten Extrakte.

Molekular-gewicht [kDa]	I n=42	II n=42	III n=42	IV n=42	Schwarzbunt n=23	Rotbunt n=7	Braunvieh n=14	Fleckvieh n=15	Charolais n=5	Blonde d´Aquitaine n=2	Limousin n=1	Jersey n=1
<<14	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
<14	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+
14	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18		+	+	+		+		+	+	+	+	
20	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
24/25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30									+	+	+	
32			+									+
35												
38/40												
40/42					+				+	+		
44												
55	+	+	+	+	+	+		+		+		
60												
67	+	+	++	+		+			+	+	+	+
>67 <97,4												
97,4												
>97,4												

Tab. 4: Darstellung der Ergebnisse der SDS-Gelelektrophorese. Zusammenfassung der beiden Färbungen mit Coomassie- und Silberfärbung. Eine nachgewiesene Färbung wird hierbei mit + und eine intensive Färbung mit ++ bewertet. Die Extrakte I bis IV sind die kommerziell erhältlichen Extrakte.

Es konnten für die **kommerziellen Extrakte** keine relevanten Unterschiede innerhalb eines Extraktes dargestellt werden, jedoch zeigten sich Differenzen zwischen den einzelnen Extrakten I bis IV. So konnten für alle vier kommerziellen Extrakte intensiv gefärbte Banden im Molekulargewichtsbereichen von <14 kDa und <<14 kDa sowie bei 20 kDa (Bos d 2) dargestellt werden. Dagegen erfolgte kein Nachweis gefärbter Banden in den Molekulargewichtsbereichen von 35 bis 40 kDa und >67 kDa. Die intensivste Färbung für alle kommerziellen Extrakte zeigt sich bei <14, 20 und 24/25 kDa, während der Nachweis bei 14, 18, 32 und 67 kDa mit einer sehr schwachen Färbung ausfällt. Bei 14 kDa ist die Färbung bei den Extrakten I und II etwas stärker als bei den Extrakten III und IV, während der Nachweis bei 18 kDa für Extrakt I immer fehlt. Bei 32 und 67 kDa erfolgt eine Färbung lediglich für den Extrakt III.

Auch für die **selbst hergestellten Extrakte** gilt, dass keine relevanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Rinderrassen auftreten, aber zum Teil deutliche Differenzen zwischen den unterschiedlichen Rassen dargestellt werden konnten.
So kommt es zum Nachweis intensiv gefärbter Banden für alle Extrakte bei 20 kDa (Allergen Bos d 2), während es keinen Nachweis gefärbter Banden für alle Extrakte im Molekulargewichtsbereich von 35 bis 40 kDa und bei >67 kDa gibt.
Die deutlichsten Banden mit der intensivsten Färbung zeigen sich für alle Extrakte im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 28 kDa. Für die meisten Extrakte konnten Banden mit deutlicher Intensität zwischen <14 und 18 kDa dargestellt werden und vereinzelte Banden bei <<14 kDa und zwischen 30 und 67 kDa.
Für alle Extrakte erfolgt ein Nachweis im Molekulargewichtsbereich von <14, 14, 20, 24/25, 28 und 67 (schwach) kDa, mit den stärksten Färbereaktionen für alle Extrakte bei 20 und 24/25 kDa. Ab 30 kDa konnten für alle Extrakte lediglich schwache Färbungen gezeigt werden bzw. keine Färbereaktionen nachgewiesen werden und ab 97 kDa waren für keine Rinderrasse Färbungen nachweisbar.
Deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Rassen zeigen sich z.B. im Molekulargewichtsbereich von <<14 und <14 kDa. Hier konnten starke Färbereaktionen lediglich für die Rassen Rotbunte, Charolais, Jersey, Limousin und Blonde d´Aquitaine dargestellt werden. Die größten Unterschiede zwischen den Rinderrassen konnten bei den höheren Molekulargewichtsbereichen zwischen 30 und 67 kDa nachgewiesen werden.

Die Abbildung 5 ist eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse aus der Tabelle 4. Um die Darstellung dieser Ergebnisse zu vereinfachen, wurden jeweils die vier kommerziellen Extrakte zu einer Gruppe und alle selbst hergestellten Extrakte zu einer Gruppe zusammengefasst. Es erfolgt somit ein direkter Vergleich zwischen der Gruppe aller kommerziellen und der Gruppe aller selbst hergestellten Extrakte.

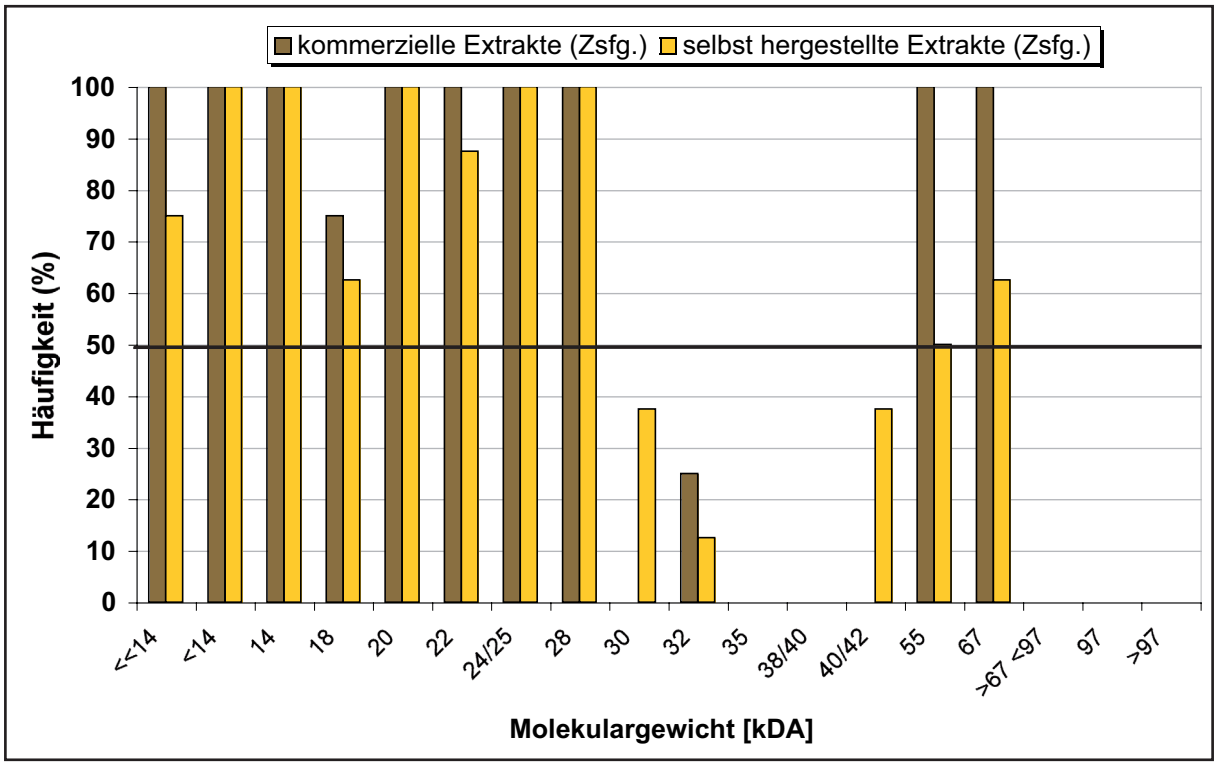

Abb. 5: Quantitativer Vergleich der Färbereaktionen im SDS-Polyacrylamid-Gel. Es wird die zusammengefasste Gruppe der kommerziellen Extrakte mit der zusammengefassten Gruppe der selbst hergestellten Extrakte verglichen.

In den Molekulargewichtsbereichen von <14, 14, 20, 24/25 und 28 kDa zeigen alle kommerziellen und selbst hergestellten Extrakte zu 100% Färbereaktionen. Sie sind somit identisch. Bei <<14, 18, 22, 32, 55 und 67 kDa liegen die nachgewiesenen Färbereaktionen der Gruppe der kommerziellen Extrakte über denen der selbst hergestellten Extrakte. Bei 30 und 40/42 kDa erfolgt ein Nachweis (unter 50 %) lediglich für die Gruppe der selbst hergestellten Extrakte. Es gibt jedoch keinen Nachweis für die kommerziellen Extrakte.

3.3 Ergebnisse der Immunblots

Die Spezifität der Immunblotexperimente wurde durch Negativkontrollen mit Seren von Personen nachgewiesen, die nicht unter Allergien litten und bei denen es im Vorfeld zu keiner Immunisierung durch Rinderhaarallergene kommen konnte. Die dafür getesteten und anschließend eingesetzten Seren ergaben einen Gesamt-IgE-Gehalt von unter 10 kU/l und eine RAST-Klasse 0.

Um bei der Beurteilung der Ergebnisse eine Fehlinterpretation durch mögliche Kreuzreaktionen zwischen den geblotteten Proteinen und dem sekundären Antikörper auszuschließen, wurde bei einer Versuchsdurchführung die Inkubation mit dem primären Antikörper weggelassen. So erfolgten nach den Waschgängen nur die Inkubation mit dem sekundären Antikörper sowie die anschließende Entwicklung. Im Ergebnis dessen konnte eine Kreuzreaktion ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen wurden dokumentiert.

3.3.1 Darstellung und Auswertung der Immunblots

Die Abbildungen 6 bis 12 stehen beispielhaft für die durchgeführten Immunblot-experimente. Die Abbildungen sind dabei nach den RAST-Klassen der verwendeten Patientenseren geordnet, wobei jede der vorkommenden RAST-Klassen 0 bis 6 vertreten ist. Bei der Auswahl der Bilder spielt die Häufigkeit und somit die Bedeutung der in dieser Studie vorkommenden Rinderrassen eine Rolle, sodass die Rassen Schwarzbunte, Rotbunte, Braunvieh, Fleckvieh und Charolais vertreten sind, die auch in der folgenden Auswertung der Ergebnisse von Bedeutung sind.

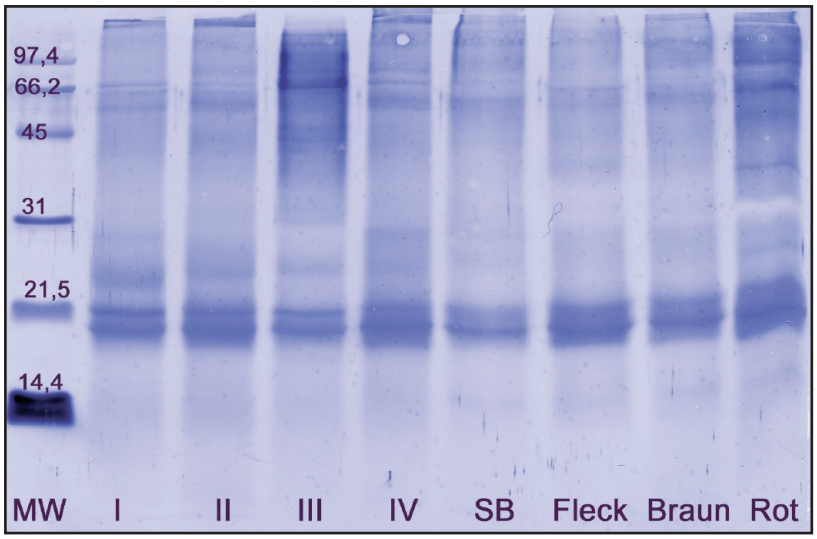

Abb. 6: Immunblot mit einem Serum der RAST-Klasse 0. Aufgetragen wurden vier kommerziell erhältliche Extrakte (I–IV) und vier selbst hergestellte Extrakte („SB“ = Schwarzbunt, „Fleck“ = Fleckvieh, „Braun“ = Braunvieh und „Rot“ = Rotbunt). Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

Die Abbildung 6 steht beispielhaft für die Darstellung der intensiven Färbung der immunologischen Reaktionen des Serums für alle Extrakte bei 20 und 22 kDa, im Gegensatz zu der weniger intensiven Färbung in den Molekulargewichtsbereichen darüber und darunter. Während jedoch unterhalb von 20 kDa kaum eine immunologische Reaktion auszumachen ist, ist der Bereich oberhalb von 22 kDa bei allen Extrakten – wenn auch nicht so intensiv – von vielen Reaktionen mit dem Serum gekennzeichnet. Das Serum zeigt bei 45 kDa für den kommerziellen Extrakt III eine höhere Anzahl intensiverer immunologischer Reaktionen als bei den anderen kommerziellen drei Extrakten. Ebenso stellt sich die Reaktion des eingesetzten Serums bei dem Extrakt der Rasse Rotbunt dar, der im Vergleich zu den anderen selbst hergestellten Extrakten deutliche Reaktionen oberhalb von 22 kDa aufweist.

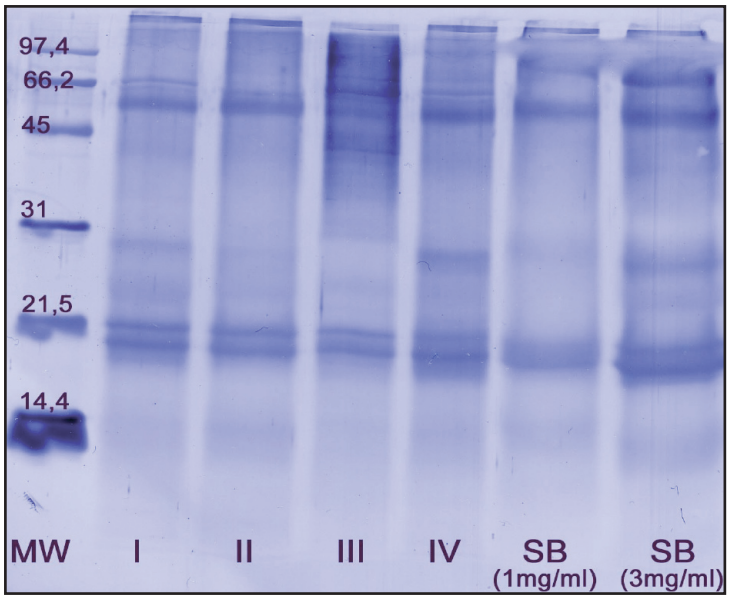

Abb. 7: Immunblot mit einem Serum der RAST-Klasse 1. Aufgetragen wurden vier kommerziell erhältliche Extrakte (I–IV) und zwei Konzentrationen eines selbst hergestellten Extraktes von Schwarzbunten Rindern. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen. Lediglich bei SB (3 mg/ml) wurden 60 µg Protein verwendet.

Auch die Abbildung 7 zeigt intensive Färbungen der immunologischen Reaktionen des Serums für alle Extrakte bei 20 und 22 kDa, im Gegensatz zu der weniger intensiven Färbung in den Molekulargewichtsbereichen darüber und darunter. Auch hier ist unterhalb von 20 kDa kaum eine immunologische Reaktion auszumachen, während oberhalb von 22 kDa jedoch bei allen Extrakten viele Reaktionen mit dem Serum, wenn auch nicht so intensiv, dargestellt sind. Das Serum zeigt auch bei 45 kDa für den kommerziellen Extrakt III eine höhere Anzahl intensiverer immunologischer Reaktionen als bei den anderen kommerziellen drei Extrakten. Zusätzlich werden für die Rasse Schwarzbunte die unterschiedlichen Reaktionen von 1 mg/ml und 3 mg/ml dargestellt.

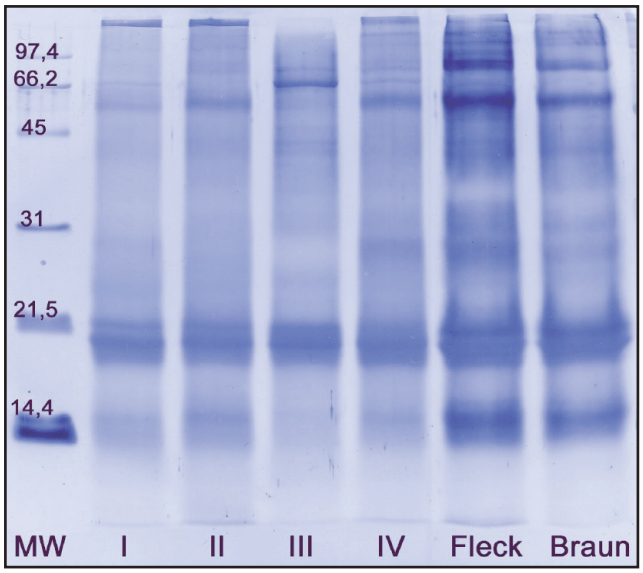

Abb. 8: Immunblot mit einem Serum der RAST-Klasse 2. Aufgetragen wurden vier kommerziell erhältliche Extrakte (I–IV) und zwei selbst hergestellte Extrakte („Fleck“ = Fleckvieh und „Braun“ = Braunvieh). Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

Auch in der Abbildung 8 zeigt der Molekulargewichtsbereich von 20 und 22 kDa für alle Extrakte eine intensive Färbung. Die selbst hergestellten Extrakte der Rassen Fleck- und Braunvieh dominieren dabei jedoch deutlich. Ebenso zeigen sich aber auch intensivere immunologische Reaktionen des Serums unterhalb von 20 kDa für die selbst hergestellten Extrakte sowie im höheren Molekulargewichtsbereich oberhalb von 45 kDa. Die Reaktion des Serums zeigt für die kommerziellen Extrakte I, II und IV unter 20 kDa intensiver gefärbte Banden auf als Extrakt III. Es wird auch verdeutlicht, dass die immunologischen Reaktionen des Serums bei den selbst hergestellten Extrakten im Molekulargewichtsbereich von 14, 20 und 22 kDa intensiver ausfallen als bei den kommerziellen Extrakten.

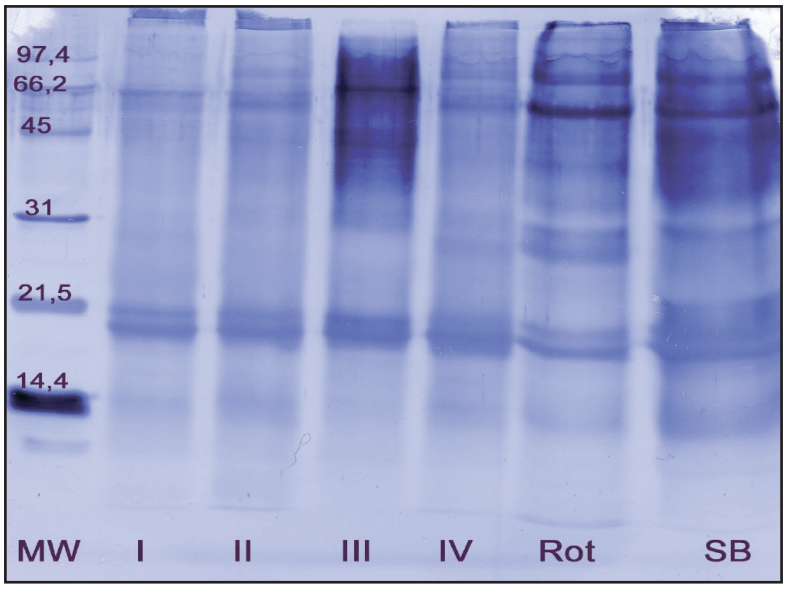

Abb. 9: Immunblot mit einem Serum der RAST-Klasse 3. Aufgetragen wurden vier kommerziell erhältliche Extrakte (I–IV) und zwei selbst hergestellte Extrakte („SB“ = Schwarzbunt und „Rot“ = Rotbunt). Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

In der Abbildung 9 wird deutlich eine große Anzahl immunologischer Reaktionen des Serums für die selbst hergestellten Extrakte im oberen Molekulargewichtsbereich über 31 kDa dargestellt. Weiterhin zeigt sich ein großer Unterschied in der immunologischen Reaktivität des Serums zwischen dem Extrakt III und den anderen kommerziellen Extrakten in diesem Molekulargewichtsbereich. Bei dem Extrakt der Rasse Rotbunt ist die Intensität der dargestellten Färbungen unterhalb von 20 kDa schwächer als bei der Rasse der Schwarzbunten. Oberhalb von 22 kDa bis 45 kDa lassen sich für das Serum hier aber mehr immunologische Reaktionen darstellen. Insgesamt zeigen die selbst hergestellten Extrakte mehr und auch intensivere Färbungen in allen Molekulargewichtsbereichen als die kommerziellen Extrakte.

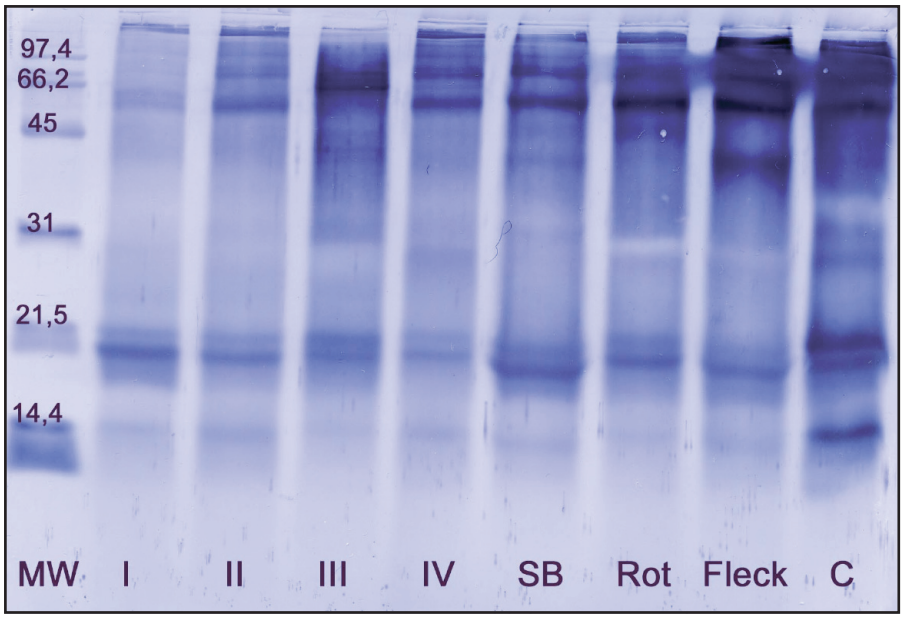

Abb. 10: Immunblot mit einem Serum der RAST-Klasse 4. Aufgetragen wurden vier kommerziell erhältliche Extrakte (I–IV) und vier selbst hergestellte Extrakte („SB“ = Schwarzbunt, „Rot“ = Rotbunt, „Fleck“ = Fleckvieh und „C“ = Charolais. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen.

In der Abbildung 10 werden immunologische Reaktionen des Serums für alle Extrakte bei 14, 20, 22 kDa und oberhalb von 45 kDa dargestellt, wobei die Intensität der Färbung der Banden sehr unterschiedlich ausfällt. Deutlich zeigt sich die sehr intensive Färbung der Banden bei allen Extrakten im Molekulargewichtsbereich oberhalb von 45 kDa, hier besonders bei 55 und 67 kDa. Das Serum zeigt auch bei 14 kDa Reaktionen bei allen Extrakten. Der Extrakt der Rasse Charolais weist aber eine intensiver gefärbte Bande auf, ähnlich der Intensität im Molekulargewichtsbereich von 20 und 22 kDa. Hier kommt es zwar für alle Extrakte zu Nachweisen von Reaktionen mit dem Serum, allerdings in der Intensität nicht so gleichmäßig wie bei anderen Immunblots dargestellt.

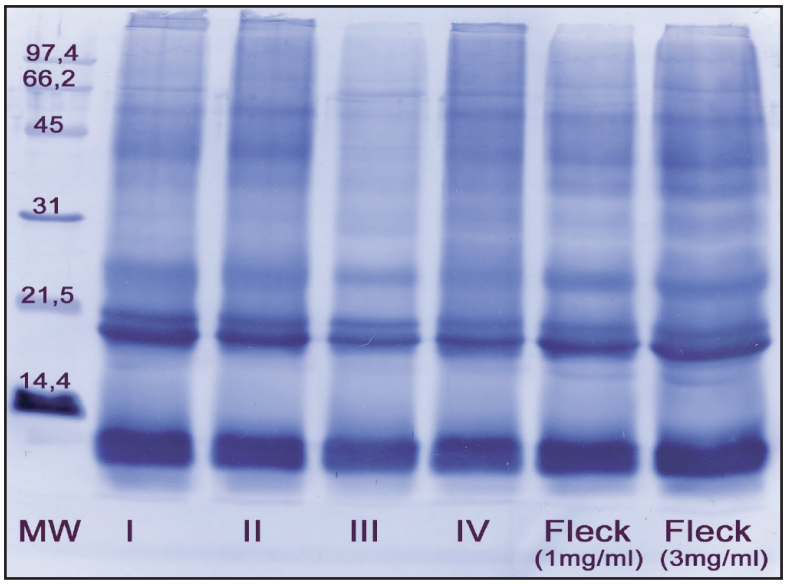

Abb. 11: Immunblot mit einem Serum der RAST-Klasse 5. Aufgetragen wurden vier kommerziell erhältliche Extrakte (I–IV) und zwei Konzentrationen eines selbst hergestellten Extraktes von Fleckvieh. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen, außer bei Fleck (3 mg/ml), hier wurden 60 µg Protein verwendet.

Der Immunblot der Abbildung 11 verdeutlicht eine besonders intensive immunologische Reaktion des Serums für alle Extrakte unter 14 kDa, genauso wie im Molekulargewichtsbereich von 20 bis 30 kDa und viele deutlich nachgewiesene Reaktionen von geringerer, aber immer noch intensiver Intensität darüber. Besonders auffällig ist die sehr hohe Dichte an dargestellten Reaktionen und die deutliche Ähnlichkeit der Extrakte. Konkrete Unterschiede sind im Vergleich zu anderen Immunblots kaum auszumachen. Der Extrakt der Rasse Fleckvieh wurde hier mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

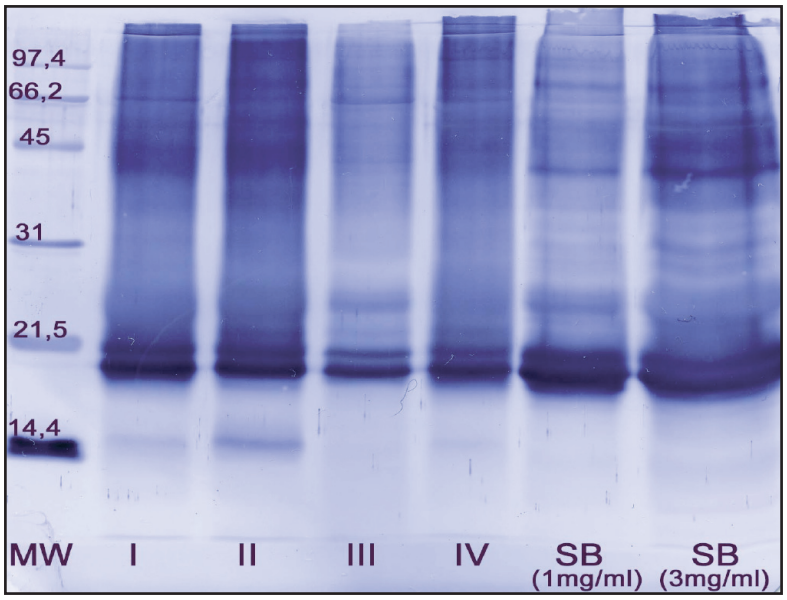

Abb. 12: Immunblot mit einem Serum der RAST-Klasse 6. Aufgetragen wurden vier kommerziell erhältliche Extrakte (I–IV) und zwei Konzentrationen eines selbst hergestellten Extraktes von Schwarzbunten Rindern. Es wurden jeweils 20 µg Protein aufgetragen, außer bei SB (3 mg/ml), hier wurden 60 µg Protein verwendet.

Der Immunblot der Abbildung 12 zeigt die Reaktionen des Serums mit der höchsten RAST-Klasse. Es werden Reaktionen des Serums mit den Extrakten I und II bei 14 kDa beobachtet und intensive Reaktionen für alle Extrakte bei 20 und 22 kDa sowie für den Extrakt III und die beiden selbst hergestellten Extrakte bei 24/25 kDa. Die selbst hergestellten Extrakte zeigen weiterhin eine große Anzahl von immunologischen Reaktionen im Molekulargewichtsbereich über 22 kDa, die auch sehr klar und deutlich dargestellt werden. Im unteren Molekulargewichtsbereich können für alle Extrakte kaum bzw. nur sehr schwache Reaktionen des Serums gezeigt werden.

Auswertung der Immunblots

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse in der Tabelle 5 zusammengefasst. Es wurden alle nachgewiesenen Reaktionen mit in die Auswertung einbezogen, unabhängig von ihrer Intensität, da es bei der vorliegenden Arbeit vergleichend zwischen kommerziellen und selbst hergestellten Extrakten vorrangig um den Nachweis einer erfolgten immunologischen Reaktion im Immunblot und somit um einen möglichen Vergleich mit dem im SDS-PAGE dargestellten Angebot geht. Die Tabelle 5 vergleicht die vier kommerziellen Extrakte mit den für diese Auswertung zahlenmäßig relevanten

selbst hergestellten Extrakten der Rassen Schwarzbunt, Rotbunt, Braunvieh und Fleckvieh. Das Reduzieren auf diese vier Rassen erfolgt lediglich für den direkten Vergleich der immunologischen Reaktion. Im weiteren Verlauf der Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit werden wieder alle Rassen einbezogen, da nicht die Fallzahl im Vordergrund stehen soll, sondern ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese, bei der auch alle in die Studie einbezogenen Rassen dargestellt werden.

Molekular-gewicht [kDa]	I n=42 [%]	II n=42 [%]	III n=42 [%]	IV n=42 [%]	Schwarzbunt n=23 [%]	Rotbunt n=7 [%]	Braunvieh n=14 [%]	Fleckvieh n=15 [%]
<<14								
<14	4,8	11,9	4,8	4,8	8,6		14,3	13,4
14	57,1	78,6	9,5	54,8	73,9	71,4	92,8	66,7
18	4,8	2,4		4,8	13		21,4	6,7
20	100	100	100	100	100	100	100	100
22	100	100	100	100	100	100	100	100
24/25					4,3			20
28	4,8	4,8	7,2	4,8	8,7		14,4	6,7
30	35,7	4,8	4,8	61,9	60,9	14,3	64,3	40
32	2,4	2,4	26,2	7,1	47,8	14,3	42,8	33,3
35	7,1		4,8	2,4				6,7
38/40					8,7		7,2	6,7
40/42	9,5	4,8	28,6	7,2	34,7		42,9	33,3
44	7,1	4,8	7,2	2,4	8,6	28,6		13,3
55	40,5	54,8	14,4	59,5	61	71,4	71,4	79,9
60								6,7
67	21,4	4,8	85,7	14,3	17,4	14,3		13,4
>67 <97	2,4	19	4,8	23,8	60,8	76,7	57,1	53,3
97		2,4	2,4	2,4		14,3	7,1	
>97					4,3			

Tab. 5: Zusammengefasste Darstellung der Ergebnisse der Immunblots unter Berücksichtigung der jeweiligen Molekulargewichtsbereiche und der einzelnen Rassen. Die Extrakte I–IV sind kommerzielle Extrakte. Da die Fallzahlen für die Rassen Charolais (5), Blonde d`Aquitaine (2), Limousin (1) und Jersey (1) für die Darstellung dieser Auswertung zu niedrig sind, werden sie hier und in der folgenden Abb.14 nicht einbezogen. Die Angaben erfolgen in Prozent und geben an, in wie viel Prozent der durchgeführten Immunblots bezogen auf die Fallzahl der jeweiligen Rinderrasse eine Immunreaktion zu verzeichnen war. Die Zahlen sind somit Mittelwerte.

Die Abbildungen 13 und 14 bilden die Ergebnisse der Tabelle 5 ab. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die vier kommerziellen Extrakte getrennt von den vier relevanten selbst hergestellten Extrakten dargestellt.

Kommerzielle Extrakte:

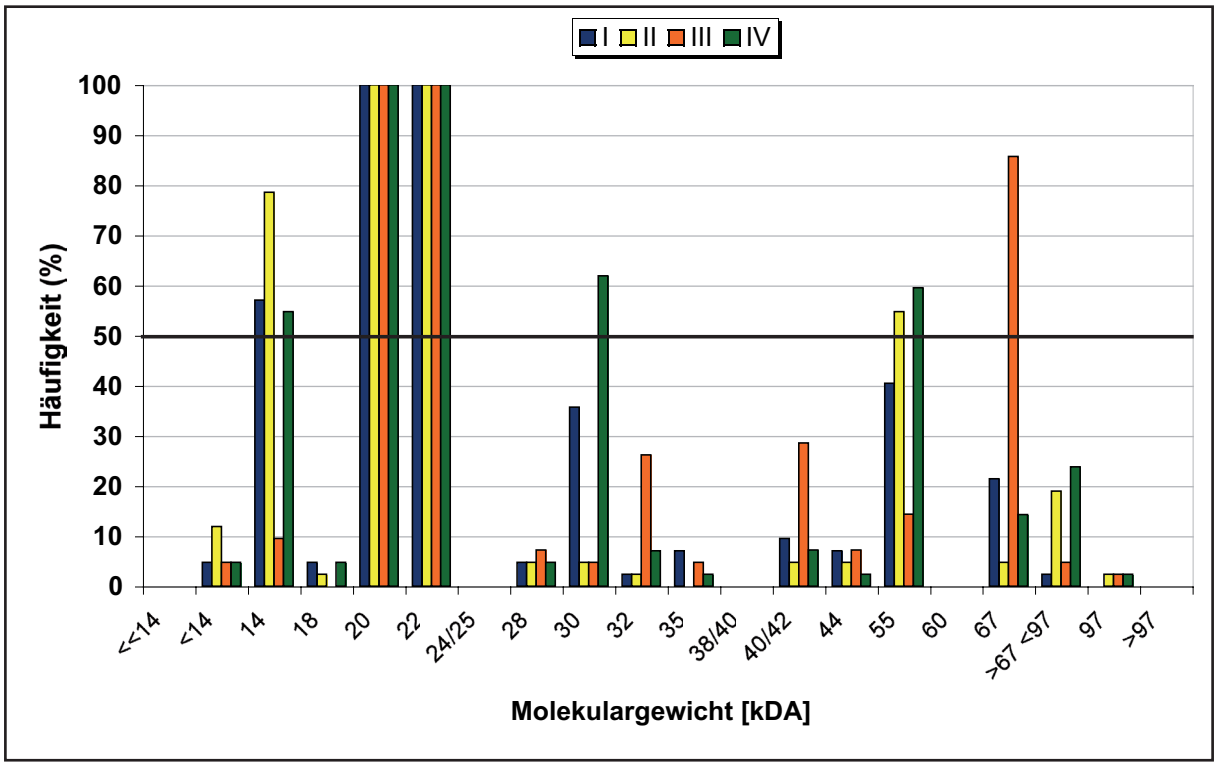

Abb. 13: Darstellung der Ergebnisse der immunologischen Nachweise für die kommerziellen Extrakte I, II, III und IV.

Es gibt keine nachweisbaren Reaktionen für alle eingesetzten Seren der Landwirte im Molekulargewichtsbereich von <<14, 24/25, 38/40, 60 und >97 kDa, aber auf allen Immunblots Reaktionen bei 20 (Bos d 2) und 22 kDa.

Bei <14 kDa zeigen zwischen 5 % und 12 % der eingesetzten Seren eine Reaktion.

Bei 14 kDa gibt es für die Extrakte I, II und IV nachweisbare Reaktionen in über 50% bis 78%, für Extrakt III aber lediglich in 10 %. Der Extrakt III zeigt bei 18 kDa keine Reaktion mit den Seren und auch die Extrakte I, II und IV reagieren nur mit 2 % bis 5 % der eingesetzten Seren.

Bei 30 kDa zeigen die Extrakte I und IV eine Reaktivität mit den Seren von 35 % bis 62 %, die Extrakte II und III aber nur 5 %.

Bei 32 kDa zeigt der Extrakt III mit 26 % mehr Reaktionen mit den Seren als die Extrakte I, II und IV mit 2 % bis 7 %. Im Molekulargewichtsbereich von 40/42 kDa gibt es Reaktionen von 29% für den Extrakt III und nur in 7 % bis 10 % für die Extrakte I, II und IV.

Bei 67 kDa gibt es in 86 % Reaktionen der Seren mit den Extrakten III, aber lediglich in 5 % bis 22 % mit den Extrakten I, II und IV.

Die Extrakte I, II und IV zeigen bei 55 kDa zwischen 40 % und 60 % Reagibilität, Extrakt III aber nur 14 %.

Selbst hergestellte Extrakte:

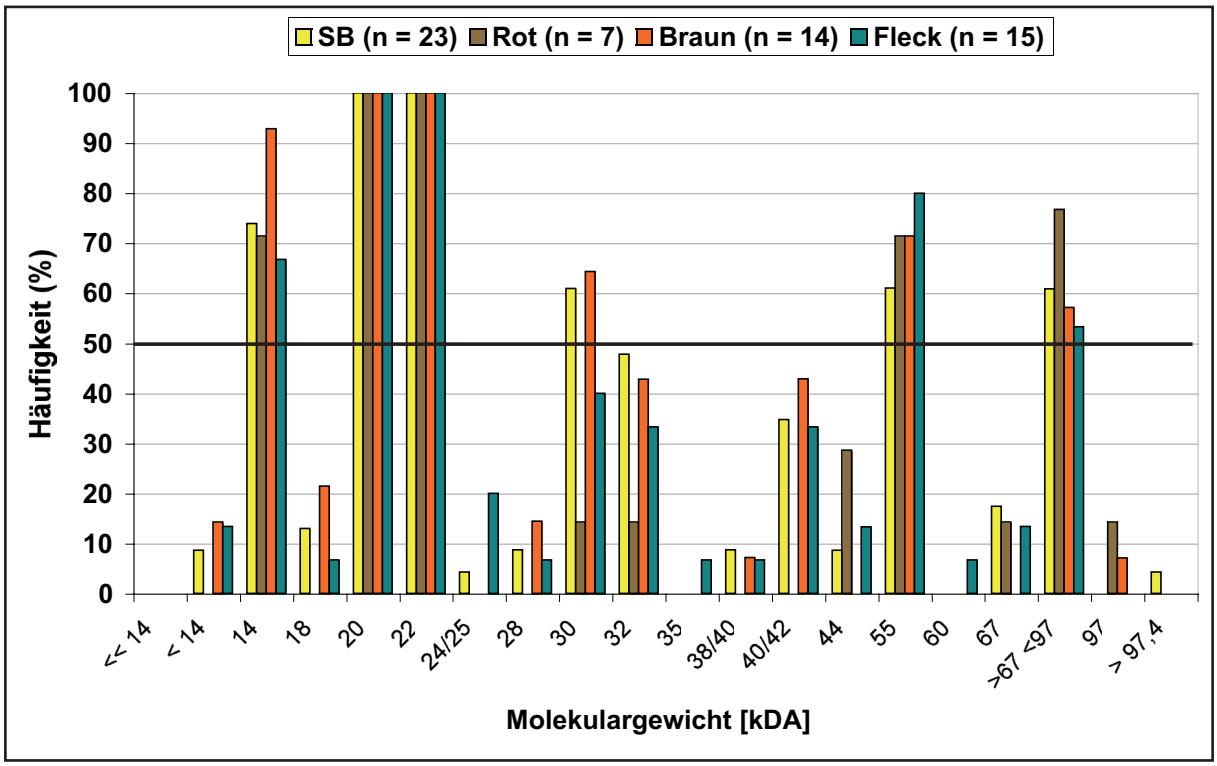

Abb. 14: Darstellung der Ergebnisse der immunologischen Nachweise für die selbst hergestellten Extrakte „SB“ Schwarzbunte Rasse, „Rot“ Rotbunte Rasse, „Braun“ Braunvieh und „Fleck“ Fleckvieh.

Festzustellen ist, dass im Molekulargewichtsbereich von <<14 kDa keine immunologische Reaktionen, in allen anderen hier dargestellten Molekulargewichtsbereichen jedoch variierend immunologische Reaktionen nachgewiesen werden konnten.

Alle Seren zeigen aber im Molekulargewichtsbereich von 20 kDa (Bos d 2) und 22 kDa zu 100 % mit den Extrakten immunologische Reaktionen.

Zusammenfassend wurden in den Immunblot-Experimenten unter Verwendung der kommerziellen und der selbst präparierten Extrakte distinkte Banden bei allen eingesetzten Seren gefunden, auch bei den Seren, die von Landwirten mit RAST-Klassen 0 und 1 stammten. Das Ergebnis der nachgewiesenen Immunreaktion variiert mit den eingesetzten Seren der verschiedenen Landwirte, sodass sich alles

in allem ein sehr vielfältiges Bild ergibt. Insgesamt wurden Immunreaktionen in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 11 bis ca. 97 kDa nachgewiesen.
Bei allen Seren wurden Reaktionen mit dem Majorallergen Bos d 2 bei 20 kDa und bei 22 kDa nachgewiesen. Die Banden in diesen Molekulargewichten waren jedoch von der Intensität nicht immer die stärksten.
Keine Reaktionen wurden bei Molekulargewichten von <<14 kDa und – bis auf eine Ausnahme – bei >97,4 kDa gefunden. Insgesamt finden sich wenige Reaktionen im mittleren Molekulargewichtsbereich zwischen 24 und 28 kDa, 35 und 44 kDa und zwischen 60 und 67 kDa.

3.3.2 Vergleich der Ergebnisse der Immunreaktion der kommerziellen Extrakte mit den Ergebnissen der Immunreaktion der selbst hergestellten Extrakte

In der Tabelle 6 werden die bereits beschriebenen Ergebnisse der immunologischen Reaktionen vergleichend für die kommerziellen Extrakte und die selbst hergestellten Extrakte dargestellt. Im Folgenden wird jeweils die geringste (einschließlich keine = 0) und die höchstmöglichste Anzahl nachgewiesener Reaktionen der beiden Extraktgruppen (kommerzielle Extrakte und alle selbst hergestellten Extrakte) verglichen. Anschließend wird zusammenfassend der Durchschnittswert aus dieser Anzahl von Reaktionen verglichen. Die Angaben erfolgen in Prozent und sind aus den Einzelwerten der Tabelle 5 zusammengestellt, wobei hier wieder alle Rassen einbezogen wurden, auch jene mit einer niedrigen Fallzahl, da der direkte Vergleich zu den Ergebnissen der SDS-Gelelektrophorese im Vordergrund stehen soll, in deren Auswertung nicht die Fallzahl ausschlaggebend war.
Die Tabelle 6 stellt dar, ob und in welchen Molekurargewichtsbereichen sich die kommerziellen Extrakte von den selbst hergestellten Extrakten unterscheiden und ob es trotz eines hohen Durchschnittswertes zusammenfassend für jeweils alle Extrakte der kommerziellen und selbst hergestellten Extrakte bei einzelnen Extrakten keine immunologische Reaktion gab, was mit 0 % wiedergegeben wird. Der Durchschnittswert dient dem direkten Vergleich zwischen den kommerziellen und selbst hergestellten Extrakten und wird für die Abbildung 15 benötigt. Für diese Auswertung wurden wieder alle selbst hergestellten Extrakte der Rinderrassen einbezogen.

Molekular-gewicht [kDa]	min Kommerz [%]	min Selbst [%]	max Kommerz [%]	max Selbst [%]	Ø Kommerz [%]	Ø Selbst [%]
<<14	0	0	0	0	0	0
<14	4,8	0	11,9	20	6,6	7,1
14	9,5	66,7	78,8	100	50	73,1
18	0	0	4,8	21,4	3	5,2
20	100	100	100	100	100	100
22	100	100	100	100	100	100
24/25	0	0	0	20	0	3,1
28	4,8	0	7,2	14,4	5,4	3,7
30	4,8	0	61,9	100	26,8	53,7
32	2,4	0	26,2	47,8	9,5	19,8
35	0	0	7,1	50	3,6	7,1
38/40	0	0	0	50	0	9,1
40/42	4,8	0	28,2	42,9	12,5	13,4
44	2,4	0	7,2	28,6	5,4	6,3
55	14,4	61	59,5	100	42,3	76,7
60	0	0	0	6,7	0	0,8
67	4,8	0	85,7	100	31,6	20,6
>67 <97	2,4	0	23,8	100	12,5	65,9
97	0	0	2,4	50	1,8	8,9
>97,4	0	0	0	4,3	0	0,5

Tab. 6: Direkter prozentualer Vergleich der geringsten mit der höchstmöglichen Anzahl von Immunreaktionen sowie dem daraus resultierenden Durchschnitt dieser Werte zwischen den kommerziellen und den selbst hergestellten Extrakten. Die geringste Anzahl an Reaktionen wird dabei mit min Kommerz für die kommerziellen Extrakte und min Selbst für die selbst hergestellten Extrakte angegeben, die höchstmögliche Anzahl an Reaktionen mit max Kommerz (kommerzielle Extrakte) und max Selbst (selbst hergestellte Extrakte). Der Durchschnittswert aller Reaktionen wird angegeben mit Ø Kommerz (kommerzielle Extrakte) und Ø Selbst (selbst hergestellte Extrakte). Die Anzahl für die kommerziellen Extrakte beträgt 42, die Anzahl der selbst hergestellten Extrakte entspricht wieder denen der jeweiligen Rinderrassen (1 bis 23).

In der Abbildung 15 werden diese Ergebnisse grafisch dargestellt. Verglichen werden dabei nur die Durchschnittswerte aller Reaktionen, um wiederum den direkten Vergleich zwischen den kommerziellen und selbst hergestellten Extrakten zu ermöglichen.

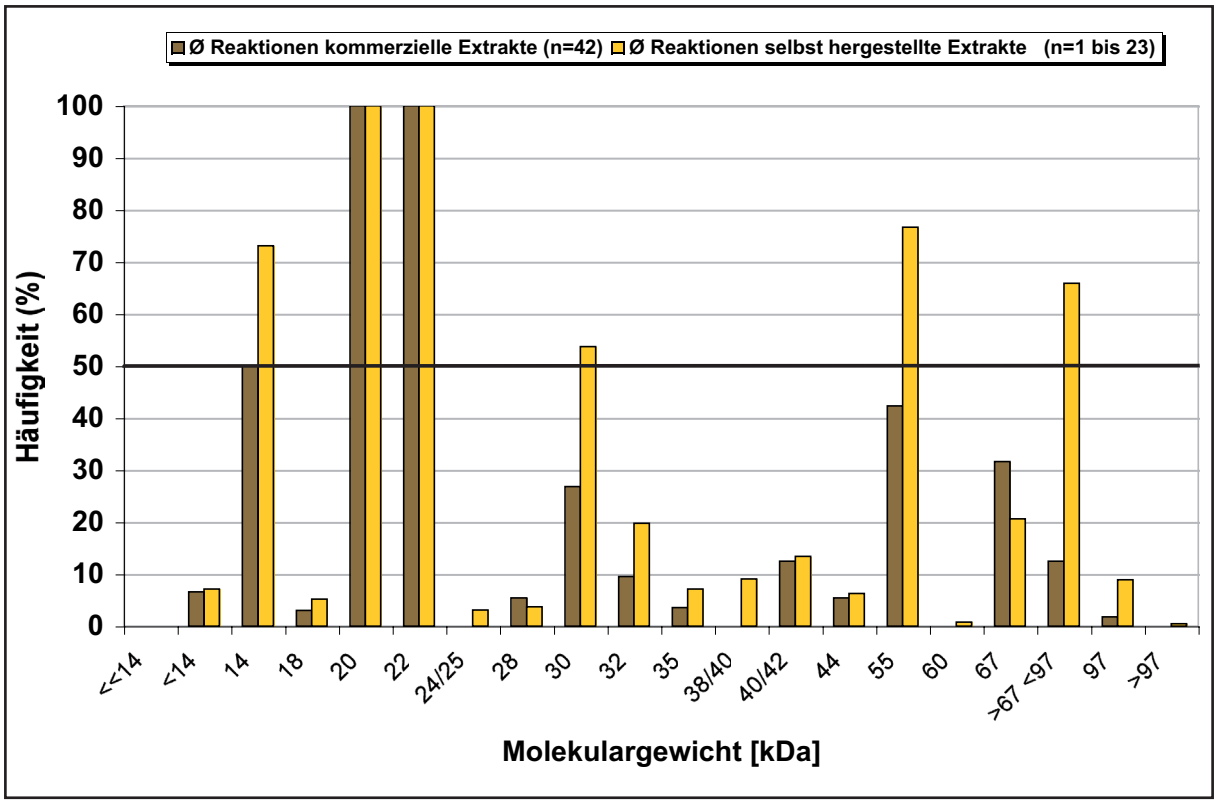

Abb. 15: Vergleich der Immunreaktionen aller 42 Seren zwischen den zu einer Gruppe zusammengefassten kommerziellen Extrakten (n = 42) und den zu einer Gruppe zusammengefassten selbst hergestellten Extrakten (n = 1 bis 23).

Die Abbildung 16 stellt hierzu ergänzend den Vergleich beider Extraktarten bezüglich einer Immunreaktionen von 50 % und größer dar. Es kann deutlich gezeigt werden, dass lediglich in drei Molekurargewichtsbereichen bei allen kommerziellen Extrakten eine immunologische Reaktion der Seren von über 50 % im Immunblot dargestellt werden konnte. Bei den selbst hergestellten Extrakten liegt diese Reagibilität der Seren aber doppelt so hoch.

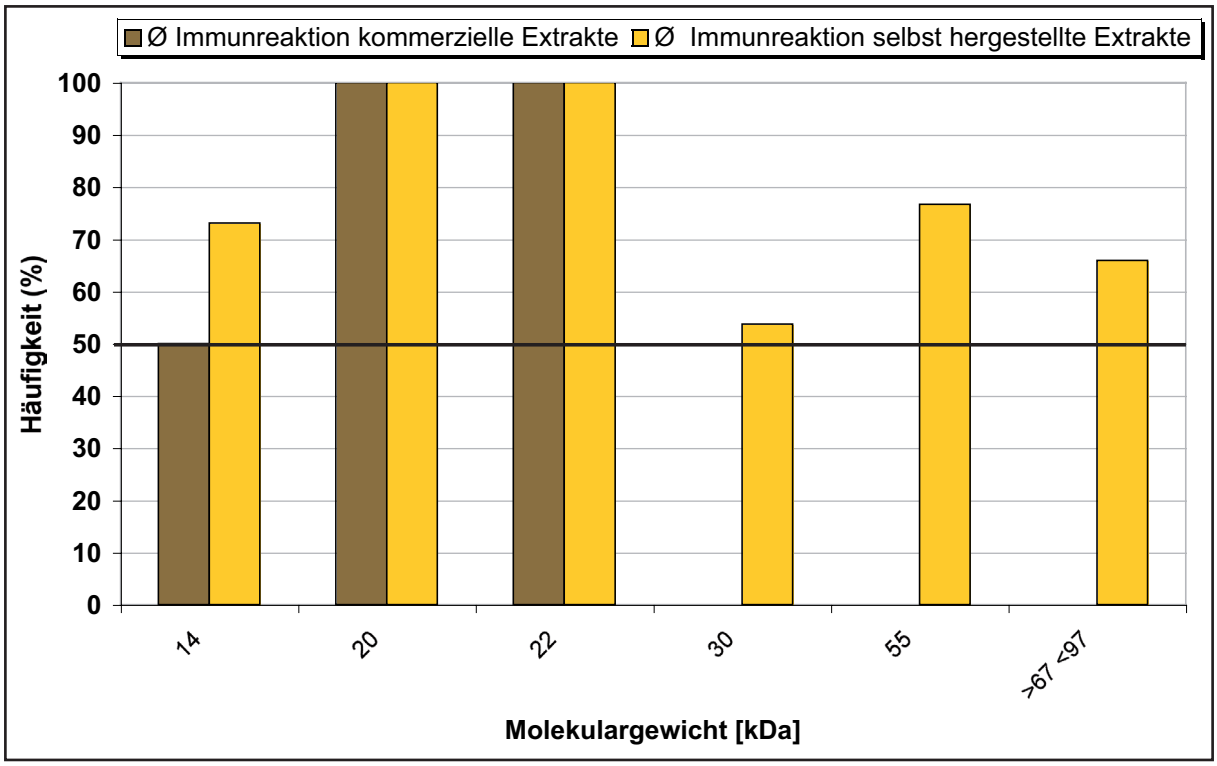

Abb. 16: Darstellung der immunologischen Reaktionen der kommerziellen und der selbst hergestellten Extrakte im Vergleich mit einem Nachweis von gleich oder größer 50 %.

3.4 Vergleich von Proteinfärbung und Immunreaktion

Die Tabelle 7 vergleicht die Ergebnisse der Proteinfärbungen nach SDS-PAGE mit den zusammengefassten durchschnittlichen Immunreaktionen aus den Immunblot-experimenten. Der Vergleich erfolgt jeweils getrennt für die kommerziellen und die selbst hergestellten Extrakte. Es soll die Frage beantwortet werden, ob es Übereinstimmungen oder Differenzen zwischen den durch Färbung nachgewiesenen Banden im SDS-PAGE und den immunologischen Reaktionen im Immunblot gibt.

Molekular-gewicht [kDa]	SDS-PAGE Kommerz [%]	Ø Immunreaktion Kommerz [%]	SDS-PAGE Selbst [%]	Ø Immunreaktion Selbst [%]
<<14	100	0	75	0
<14	100	6,6	100	7,1
14	100	50	100	73,1
18	75	3	62,5	5,2
20	100	100	100	100
22	100	100	87,5	100
24/25	100	0	100	3,1
28	100	5,4	100	3,7
30	0	26,8	37,5	53,7
32	25	9,5	12,5	19,8
35	0	3,6	0	7,1
38/40	0	0	0	9,1
40/42	0	12,5	37,5	13,4
44	0	5,4	0	6,3
55	100	42,3	50	76,7
60	0	0	0	0,8
67	100	31,6	62,5	20,6
>67 <97	0	12,5	0	65,9
97	0	1,8	0	8,9
>97,4	0	0	0	0,5

Tab. 7: Vergleich der Ergebnisse der Proteinfärbung nach SDS-PAGE und der Immunreaktion. Die Anzahl der Proteinfärbungen beträgt wie bereits beschrieben für die kommerziellen Extrakte 42 und variiert bei den selbst hergestellten Extrakten je nach Kontakt der Landwirte zu den gehaltenen Rindern.

In der Abbildung 17 werden die Ergebnisse dieser Tabelle 7 grafisch dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit erfolgt die Darstellung der kommerziellen Extrakte getrennt von den selbst hergestellten Extrakten.

Kommerzielle Extrakte:

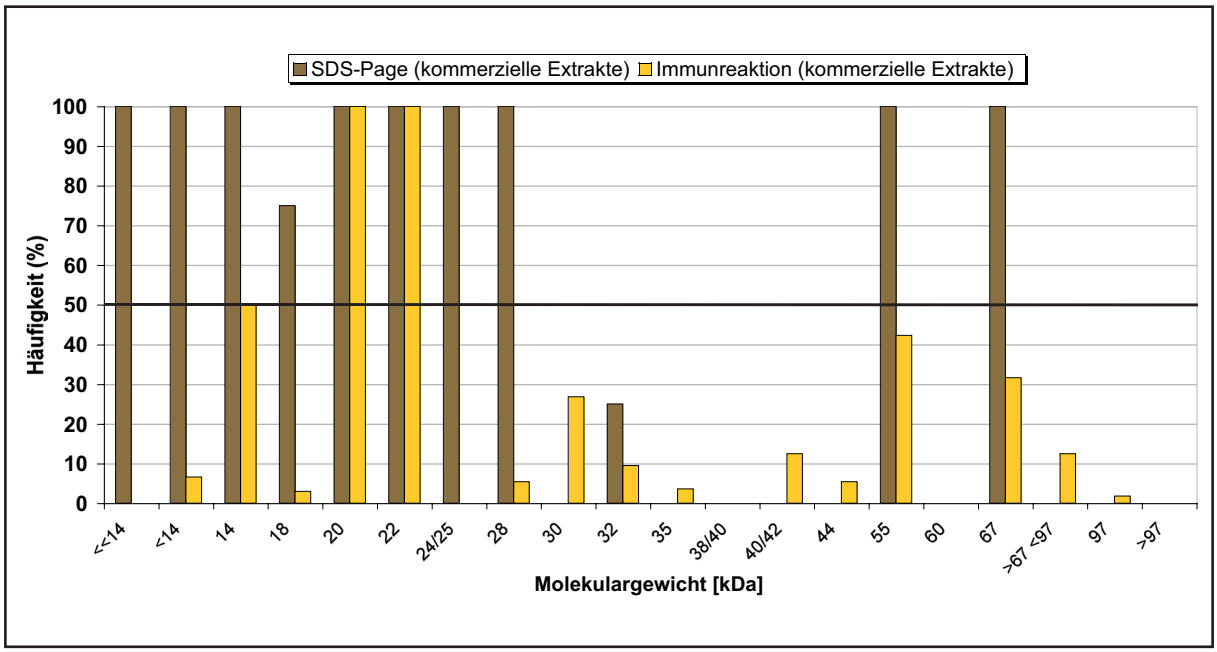

Abb. 17: Vergleich der Ergebnisse Proteinfärbung nach SDS-PAGE mit den Ergebnissen der Immunreaktion für die kommerziellen Extrakte.

Im Molekulargewichtsbereich von << 14 und 24/25 kDa wurden mit der Proteinfärbung im SDS-PAGE Banden nachgewiesen, die keine Reaktionen im Immunblot zeigten, während bei 35, 40/42, 44 und > 67 kDa in einigen Fällen immunologische Reaktionen nachgewiesen wurden, es aber keine Proteinfärbung im SDS-PAGE gab.

Der Molekulargewichtsbereich von 20 und 22 kDa zeigte eine Übereinstimmung zwischen der Proteinfärbung im SDS-PAGE und der Reaktionen im Immunblot von jeweils 100 %.

Im Molekulargewichtsbereich von < 14, 28, 55 und 67 kDa konnten im SDS-PAGE in 100 % der eingesetzten Extrakte Proteinfärbungen nachgewiesen werden. Dem gegenüber stehen immunologische Reaktionen lediglich zwischen 5% und maximal 42 % bzw. bei 14 kDa von 50 %.

Ähnliche Unterschiede gibt es bei 18 kDa. Hier erfolgte ein Nachweis durch Proteinfärbungen im SDS-PAGE von 75 %, aber lediglich in 3 % kam es zu immunologischen Reaktionen im Immunblot und bei 32 kDa mit dargestellten Färbereaktionen im SDS-PAGE zu 25 %, im Gegensatz zu 10 % Nachweis durch immunologische Reaktionen.

Selbst hergestellte Extrakte:

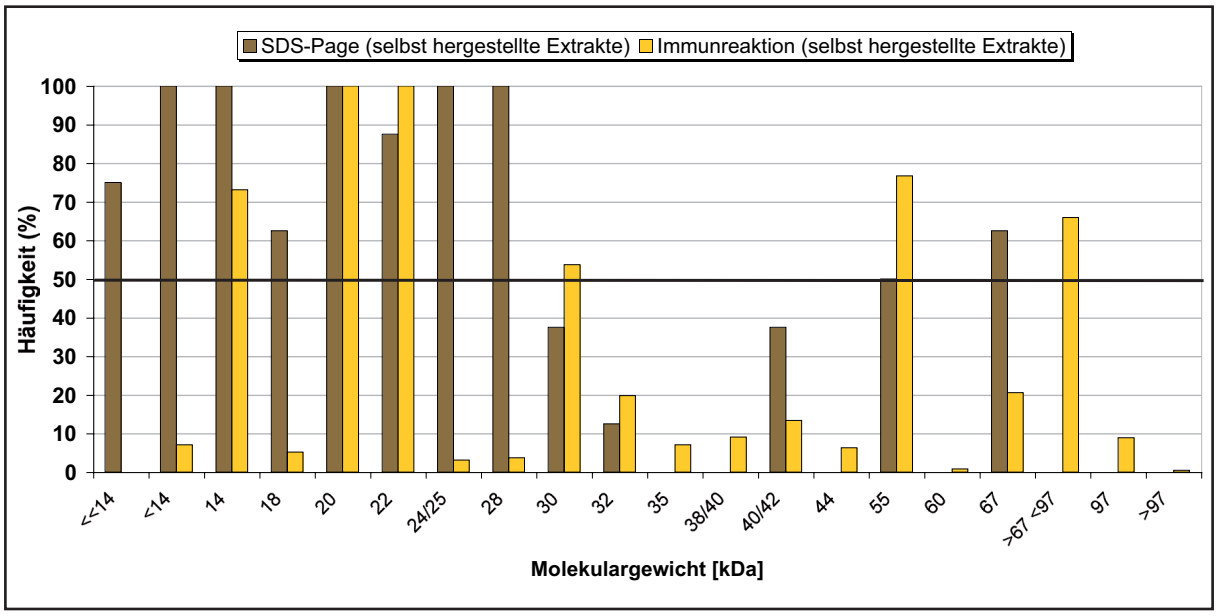

Abb. 18: Vergleich der Ergebnisse der Proteinfärbung nach SDS-PAGE mit den Ergebnissen der Immunreaktion für die selbst hergestellten Extrakte.

Wie bei den kommerziellen Extrakten gibt es im Molekulargewichtsbereich von 20 kDa eine Übereinstimmung in der Proteinfärbung des SDS-PAGE und der immunologischen Reaktion im Immunblot von 100 %. Bei <14, 14, 20, 24/25 und 18 kDa gibt es auf allen SDS-Polyacrylamid-Gelen eine Proteinfärbung. Immunologische Reaktionen auf allen Blots zeigen sich aber nur bei 20 kDa und 22 kDa.

Bei <<14 kDa kommt es zu einer Proteinfärbung in 75 % der untersuchten Extrakte, aber zu keiner immunologischen Reaktion. Im Gegensatz dazu gibt es keine Proteinfärbung im Molekulargewichtsbereich von 35, 38/40 kDa, bei 44 und 60 kDa sowie <67 <97, 97 und >97 kDa, aber einen Nachweis immunologischer Reaktionen, der im Molekulargewichtsbereich von <67 <97 kDa sogar bei 66 % liegt.

Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den Proteinfärbungen des SDS-PAGE und den nachgewiesenen immunologischen Reaktionen oft recht deutlich.

So gibt es bei <14 kDa, 24/25 kDa und 28 kDa für alle Extrakte eine Proteinfärbung im SDS-PAGE. Der immunologischer Nachweis liegt aber nur bei 3 % bis 7 %. Bei 18 kDa beträgt das Verhältnis 62 % Proteinfärbung zu lediglich 5 % immunologischem Nachweis.

3.5 Allergogramm

Abschließend werden die Ergebnisse der Immunreaktion in einem Allergogramm zusammengefasst. Die Ergebnisse der kommerziellen und der selbst hergestellten, rassespezifischen Rinderextrakte sind getrennt dargestellt. Der Wert „Extrakte (Gesamt)“ zeigt, ob überhaupt eine Reaktion in diesem Molekulargewichtsbereich stattgefunden hat, unabhängig von Extrakt und Rasse. Die Werte für „Extrakte (Gesamt)“ können dadurch höher liegen als die einzelnen Werte der kommerziellen bzw. selbst hergestellten Extrakte, können aber nie kleiner als der kleinste Wert eines Extraktes sein.

Die Prozentzahl über den Balken bezieht sich auf die Angabe „Extrakte (Gesamt)“. Der Wert 100 % bezieht sich somit auf die Gesamtanzahl von 42 untersuchten Patientenseren.

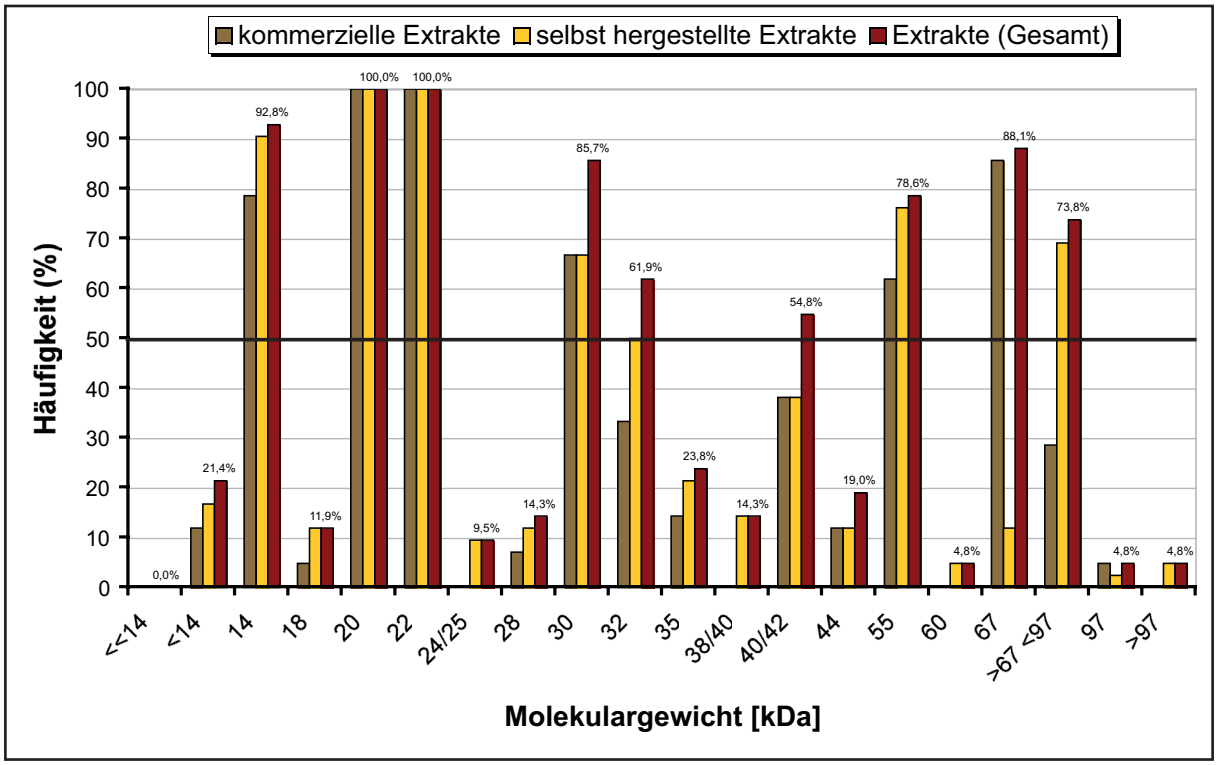

Abb. 19: Allergogramm

Bei 20 und 22 kDa liegen die Nachweise immunologischer Reaktionen bei 100 %. Lediglich im Molekulargewichtsbereich von <<14 kDa konnten überhaupt keine immunologischen Reaktionen nachgewiesen werden. Für die kommerziellen Extrakte gibt es weiterhin bei 24/25, 38/40, 60 und >97,4 kDa keine immunologischen

Reaktionen, während die Seren bei den selbst hergestellten Extrakten auch in diesen Bereichen im Immunblot Banden nachweisen.

Bis auf den Molekulargewichtsbereich von 67 kDa sind die Werte der nachgewiesenen immunologischen Reaktionen der Seren für die selbst hergestellten Extrakte immer größer als die der kommerziellen Anbieter.

4. Diskussion

Landwirte sind berufsbedingt einer Vielzahl von Substanzen mit allergenem Potential ausgesetzt; Rinderhaare stellen dabei eine wichtige Allergenquelle dar (Heutelbeck et al. 2007, Reijula und Patterson 1994).
Die vorliegende Arbeit hat sich mit dem Thema der In-vitro-Diagnostik der Rinderhaarallergie auseinandergesetzt. Ziel der Studie war es, Proteine von Rinderhaaren zu extrahieren und nach Bestimmung des Proteingehaltes dieser Lösung, mittels SDS-PAGE und Immunblot, einen Vergleich in der Reaktivität zwischen den eingesetzten kommerziellen Extrakten und den von uns selbst hergestellten Extrakten zu erstellen, da eine Diskrepanz zwischen der klinischen Diagnostik und den Allergietestergebnissen mit diesen kommerziellen Extrakten vorliegt. Mögliche Ursachen dieser Diskrepanz können die zur Verfügung stehenden Rohstoffe der kommerziellen Rinderhaarallergenextrakte oder auch ein individuelles Sensibilisierungsmuster der betroffenen Landwirte sein.

Es liegen bereits einige Untersuchungen zur Charakterisierung von Rinderhaarallergenen vor (siehe Tabelle 8). Die Hauptallergene lassen sich der Bosdomesticus (domestic cattle) Gruppe zuordnen, das Majorallergen Bos d 2 spielt dabei eine entscheidende Rolle (Mäntyjärvi et al.1996). Studien zu rassespezifischen Unterschieden finden sich in der Literatur bislang noch nicht.

4.1. Patientenkollektiv

Die Auswahlkriterien für die Patienten der in der Literatur zu diesem Thema bereits beschriebenen Studien sind nicht immer vollständig dargestellt. So erfolgten oft keine Angaben zum Alter oder Geschlecht der Patienten und auch nicht, ob noch Kontakt zu Rindern besteht oder die Haltung bereits aufgegeben wurde.
Die im folgenden Abschnitt näher beschriebenen Studien stellen u.a. eine Basis für die Definition der Einschlusskriterien der vorliegenden Arbeit dar. Die Ergebnisse dieser Studien werden in der Tabelle 8 zusammenfassend dargestellt.
Havass führte seine klinischen Untersuchungen an zehn rinderhaarsensibilisierten Kindern durch, ohne die Symptome näher zu beschreiben (Havass et al. 1971). Prahl nutzte 1978 in einer ersten Studie die Seren von 36 Personen und in einer zweiten

Studie 1982 die Seren von zehn Personen mit manifestierter Rinderhaarallergie, diagnostiziert durch Hauttestungen, Bestimmung der RAST-Klasse und Bestimmung des Gesamt-IgE des Serums (Prahl et al. 1978, Prahl et al. 1982). In der Untersuchung von Løwenstein aus dem Jahr 1981 wurden Seren von Allergikern ungenannter Anzahl verwendet. Auswahlkriterien waren hier eine positive Anamnese hinsichtlich allergischer Symptome, die RAST-Klasse sowie das Ergebnis des Haut- und Provokationstestes, wobei hier ein Histamin-Äquivalent-Test genutzt wurde (Løwenstein 1981). Die zehn Landwirte, deren Seren Ylönen 1990 in seiner ersten Studie zu diesem Thema verwendete, wurden alle in der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Universität Kuopio wegen allergischer Beschwerden behandelt (Ylönen et al. 1990). Für seine zweite Studie aus dem Jahr 1992 verwendete er das Serum von 51 Landwirten mit rinderabhängigem Asthma bronchiale, die im Antikörpernachweis mindestens die RAST-Klasse 2 hatten oder Patienten, die einen positiven Prick-Test aufwiesen (Ylönen et al. 1992). Lediglich zwei Seren nutzten Valero et al. (1997) in ihren Untersuchungen. Diese Seren hatten die RAST-Klasse 4 (CAP-RAST/Pharmacia). Die Patienten zeigten Symptome einer Allergie, wie Rhinokonjunktivitis und Asthma bronchiale. Die vorliegende Studie orientierte sich auch an diesen beschriebenen Auswahlkriterien. Die Rekrutierung der Landwirte erfolgte über die jeweiligen Berufsgenossenschaften aus Norddeutschland (Niedersachsen) und Süddeutschland (Bayern und Baden-Württemberg). Die Auswahlkriterien waren die Haltung oder auch bereits aufgegebene Haltung von Rindern, unabhängig welcher Rasse, und die Diagnose allergischer Symptome, ausgelöst durch Kontakt zu Rindern. Diese klinischen Symptome standen bei der Mehrzahl dieser Landwirte im Widerspruch zu den bereits bestimmten Ergebnissen der Laboruntersuchungen, wie z.B. der RAST-Klasse. Es nahmen 42 Landwirte an der vorliegenden Studie teil, wobei es sich um 16 Frauen und 26 Männer handelte. Zum Zeitpunkt der Befragung waren noch 26 Landwirte aktiv in den landwirtschaftlichen Betrieb eingebunden, die anderen führten den Betrieb nicht mehr oder hatten keinen Kontakt zu Rindern. Alle Landwirte, deren Seren genutzt wurden, hatten eindeutige klinische Symptome einer Allergie. Die Anzahl von 42 eingesetzten Seren wird lediglich von der Studie Ylönen et al. (1992) übertroffen. Sie setzten aber nur Seren mit einer RAST-Klasse von gleich oder größer 2 ein. In der vorliegenden Studie sollten aber nicht von vornherein Seren mit einer niedrigen RAST-Klasse ausgeschlossen werden,

auch Seren mit einer RAST-Klasse 0 und 1 wurden einbezogen, da die Diskrepanz zwischen der In-vivo- und In-vitro-Diagnostik aufgezeigt werden sollte.

4.2 Verwendete Materialien und Methoden

4.2.1 Allergenquelle Rinderhaare, Allergenextrakte

Die verwendeten Rinderhaare für die Untersuchungen meiner Studie stammen von den eigenen Tieren der jeweiligen einbezogenen Landwirte. Bei aufgegebener Rinderhaltung wurden die Haare von reinrassigen Rindern aus Zuchthöfen verwendet. Die Auswahl und Lagerung der Allergenquelle orientierte sich an Ergebnissen mehrerer Untersuchungen zu diesem Thema, die als Grundlage für diese Arbeit herangezogen wurden. In einer Studie aus dem Jahr 1981 verglich Prahl die Verwendung von Rinderhaaren mit Harn, Fleisch und Speichel der Rinder als Allergenquelle. Die Haare erwiesen sich als beste Quelle, da die Proteinausbeute hier fünfmal größer war. Erfolgt das Abschneiden der Haare dicht an der Haut der Rinder, erhöht das die Ausbeute an Allergenen (Prahl 1981). Auch die Studie aus dem Jahr 1992 von Ylönen et al. kam bei dem Vergleich von selbst hergestellten Extrakten aus Rinderhaaren und Rinderurin zu dem Ergebnis, dass bei dem Extrakt aus den Haaren mehr Allergene identifiziert und mehr immunologische Reaktionen nachgewiesen werden konnten (Ylönen et al. 1992).

Die Rinderhaare für die vorliegende Studie mussten transportiert und gelagert werden. Vorliegende Studien zur Lagerung und Langzeitstabilität von Allergenquellen zeigen, dass selbst eine längere Lagerung kein Risiko darstellt.

So wurde die Stabilität der Allergenpräparate in der Studie von Deppe et al. aus dem Jahr 1998 beschrieben. Sie untersuchte den Bos-d-2-Gehalt in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur. Auch nach 250 Tagen wurde keine Abnahme der Bos-d-2-Konzentration in der bei Raumtemperatur gelagerten Probe festgestellt. Eine längere Lagerung der Proben bei Raumtemperatur führt somit nicht zu einer entscheidenden quantitativen Beeinflussung der Ergebnisse (Deppe et al. 1998).

Eine weitere Studie untersuchte zusätzlich mittels RAST-Testung die Aktivität und die Qualität von Allergenen (p 1 Milben-Majorallergen) in Staubproben, die über 4 Jahre bei 5 °C und 25 °C gelagert wurden. Auch sie konnte keinen Verlust der Allergenqualität nachweisen (Platts-Mills und de Weck 1989).

Diese Studien und deren Ergebnisse waren die Grundlage für die Verwendung von Rinderhaaren als geeignete Allergenquelle. Da Entfernung, Lagerung und Verarbeitung der Haare (Allergene) sich an den bereits zuvor erwähnten Arbeiten orientiert, ist eine mögliche Verfälschung der Allergenquelle auszuschließen.

4.2.2 Untersuchungsmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurden selbst hergestellte Rinderhaarextrakte von acht unterschiedlichen Rassen und einer Anzahl von individuellen Rindern innerhalb einer Rasse verwendet und diese vier verschiedenen kommerziellen Extrakte vergleichend gegenübergestellt. Außerdem wurden die Rinderrassen den jeweiligen Landwirten so zugeordnet, wie diese in direktem Kontakt zum Rind standen oder der Kontakt noch besteht. Vorteil dieser Methode ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse innerhalb einer Rasse, aber auch zwischen den verschiedenen Rassen und ebenso mit den eingesetzten vier kommerziellen Extrakten. Eine solche Vorgehensweise und auch in diesem Umfang wurde in der Literatur bis jetzt noch nicht beschrieben.

Für die Allergenextrakte gilt allgemein, dass sie – soweit technisch möglich – charakterisiert und standardisiert werden sollen (Wahl und Franke 1991). Nur eine weitgehende standardisierte Herstellung der Extrakte und somit der Allergenphase ermöglicht vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse (Wahl und Paap 1990). Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methodik wurde in den Voruntersuchungen auf ihre Tauglichkeit für die Beantwortung der Fragestellung dieser Studie überprüft. Die hier angewandten biochemischen Verfahren wurden konkret für die vorliegende Arbeit standardisiert.

Die Durchführung der Proteinextraktion richtete sich nach bereits zuvor beschriebenen Extraktionen von Tierhaarallergenen in der Literatur (Prahl et al. 1978, Deppe et al. 1998). Die Molarität der Extraktions- und Rekonstitutionslösung wurde so modifiziert, dass eine ausreichende Proteinkonzentration im Extrakt erreicht wurde und ein ausreichender Allergengehalt in der Lösung sichergestellt werden konnte. Der Allergengehalt in Extrakten auf Wasser- und Detergenzbasis ist vergleichbar (Prahl und Søndergaard 1982). Die Auftrennung der Proteine der jeweiligen Extraktionslösungen in die einzelnen Molekulargewichtsbereiche erfolgte in allen hier erwähnten experimentellen Studien mittels der Gelelektrophorese.

Für die Darstellung der Ergebnisse der Gelelektrophorese in der vorliegenden Studie wurden zwei Proteinfärbungen, nämlich die Coomassie- und die Silberfärbung, durchgeführt und auch beide gleichwertig in die Auswertung einzubezogen. Die Begründung liegt in der unterschiedlichen Aussagekraft der Darstellung der Ergebnisse dieser Methoden. Der Triphenylmethanfarbstoff der Coomassiefärbung zeichnet sich durch eine bemerkenswerte Gleichmäßigkeit der Bindung mit verschiedenen Proteinen aus (Maurer HR 1968). Dem gegenüber liegt der Vorteil der Silberfärbung in der höheren Empfindlichkeit. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt im ng-Bereich, allerdings färben bei dieser Methode verschiedene Proteine auch mit unterschiedlicher Intensität, wodurch sie schlechter reproduzierbar und nicht quantifizierbar ist (Poehling und Neuhoff 1981). Weitere Nachteile dieser Färbung sind der hohe Zeitaufwand sowie das mögliche Entstehen von Artefaktbanden, wenn – wie in diesem Fall – Mercaptoethanol im Probenpuffer verwendet wurde (Hashimoto et al. 1983).
Die sehr empfindliche Silberfärbung zeigt auch in der vorliegenden Studie in einzelnen Molekulargewichtsbereichen Banden, die in den Coomassie gefärbten Gelen oft nicht oder nur sehr schwach dargestellt sind. Andererseits kommt es durch die hohe Empfindlichkeit der Silberfärbung zu Überlagerungen von gefärbten Banden, die sich in der Coomassiefärbung sehr gut getrennt darstellen lassen. Deshalb wurden beide Färbungen durchgeführt und nach der Auswertung miteinander verglichen. Der Mehraufwand rechtfertigt sich dadurch, dass die Nachteile der einzelnen Proteinfärbungen ausgeglichen werden.

Die spezifische Bindung der IgE-Antikörper mit den in dieser Studie im SDS-PAGE charakterisierten Einzelkomponenten, lassen sich im Immunblot qualitativ analysieren. Die Verwendung der SDS-Gelelektrophorese zur Auftrennung der einzelnen Allergenfraktionen und die anschließende Durchführung des Immunblots wurden bereits in den Arbeiten von Ylönen et al. (1990) und Valero et al. (1997) beschrieben. Hier erfolgte die Detektion des immunologischen Ergebnisses, allerdings auf dem ECL-Hyperfilm. Die im Gegensatz dazu von mir eingesetzte BCIP/NBT-Färbelösung bietet die Möglichkeit der direkten Entwicklung der Ergebnisse auf der PVDF-Membran und zeigt eine präzise Darstellung der immunologischen Reaktionen.

In dieser Studie wurden PVDF-Membranen verwendet, da diese sich gut für Protein- und Immunfärbungen eignen (Gültekin und Heermann 1988). Bei der Auswahl der PVDF-Membranen spielte auch die Proteinbindungskapazität eine Rolle, die bei der PVDF-Membran mit bis zu 500 µg/cm^2 wesentlich höher ist als die der Nitrocellulose mit nur 50 bis 200 µg/cm^2 (Holtzhauser 1996).

4.3 Immunblot-Ergebnisse

In zwei Studien aus den Jahren 1990 und 1992 können Ylönen et al. mittels selbst hergestellter Extrakte und der Verwendung des IgE-Immunblots eine höhere immunologische Reaktion nachweisen als bei dem Einsatz eines kommerziellen Extraktes. In der ersten Studie (1990) wurde ein kommerzieller Extrakt genutzt. So erfolgte ein Nachweis immunologischer Reagibilität lediglich bei 20 und 22 kDa für zwei Seren, ein Serum reagierte bei 24 kDa (Ylönen et al. 1990). 1992 wurden die Extrakte durch Ylönen et al. aus Rinderepithelien und Rinderurin selbst hergestellt. Aus dem Extrakt aus Rinderepithelien wurden sieben Allergene mit folgenden Molekulargewichten dargestellt: 16, 20, 22, 24, 30, 35 und 55 kDa. Für 30 der 51 Seren konnte eine immunologische Reaktion im Immunblot nachgewiesen werden, wobei wie in der vorliegenden Studie dem Allergen bei 22 kDa eine hohe Bedeutung zukommt. Insgesamt konnten durch Ylönen et al. für 97 % der Seren bei 22 kDa, für 67 % der Seren und bei 24 kDa immunologische Reaktionen nachgewiesen werden (Ylönen et al. 1992). Der Nachweis höherer immunologischer Reaktivität der Seren für die selbst hergestellten Extrakte und die große Bedeutung der Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 und 22 kDa konnte durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt werden.

Ebenso spiegeln sich die Ergebnisse der vorliegenden Studie hinsichtlich des Molekulargewichtsbereiches unter 14 sowie bei 14 kDa und 60 sowie 67 kDa auch in der Arbeit von Valero et al. wider. Die dort verwendete Silberfärbung für den SDS-PAGE zeigte eine intensive Färbung bei 11 kDa. In dieser Studie von Valero et al. (1997) wird erstmals für die Proteinfärbung der Bereich unter 14 kDa beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte durch den Vergleich von Silber- und Coomassiefärbung dieser Molekulargewichtsbereich beschrieben werden und somit die Aussagen von Valero et al. bestätigt werden.

Valero et al. konnten dann in ihrer Studie immunologische Reaktionen mit hoher Intensität bei 11, 15 und 62,3 kDa und mit einer geringen Intensität bei 24,8 und 22,6 sowie 27 kDa nachweisen (Valero et al. 1997).
Das auch in der vorliegenden Studie als bedeutend eingestufte Allergen bei 20 kDa, findet sich bereits in der Arbeit von Havass aus dem Jahr 1971. Die Studien von Prahl et al. und Løwenstein et al. messen zusätzlich zu den Allergenen von 20 und 22 kDa dem Allergen bei 24 kDa eine entscheidende Rolle bei (Havass et al. 1971, Prahl et al. 1978, Løwenstein 1981, Prahl et al. 1982). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte der Molekulargewichtsbereich von 24/25 kDa bei der Proteinfärbung mit einer sehr intensiven Färbung nachgewiesen werden. Hier kam es jedoch bei allen Extrakten nur zu einer sehr geringen immunologischen Reaktion.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen hinsichtlich der Detektion der Allergene im SDS-PAGE und der anschließenden immunologischen Auswertung bestätigen die Ergebnisse der anderen Studien. Es konnten aber auch in einigen Bereichen deutlich Unterschiede dargestellt und neue Ergebnisse hinzufügt werden. So konnten einerseits Differenzen zwischen den selbst hergestellten Extrakten der Rinderrassen aber auch Unterschiede zwischen den selbst hergestellten Extrakten im direkten Vergleich zu den kommerziellen Extrakten herausgearbeitet werden.
Ziel der vorliegenden Studie war es auch zu klären, ob einzelne Allergen-Extrakte die individuellen Allergisierungs- bzw. Sensibilisierungsmuster im Vergleich zu kommerziellen Allergen-Extrakten ausreichend widerspiegeln. Die Ergebnisse stimmen mit bereits beschriebenen Studien überein, die sich vor allem mit den allergologischen Reaktionen bei einem Molekulargewicht sowohl zwischen 15 und 17 als auch von 11, 20, 22, 24, 27, 30, 35, 55, und 62 kDa befassen und beschreiben. Neben der von allen Studien dargestellten Relevanz der Majorallergene zwischen 18 and 25 kDa, zeigt sich weiterhin auch die allergologische Bedeutung der Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 und 55 kDa und im Molekulargewichtsbereich von 67 bis 97 kDa sowie im niedrigen Molekulargewichtsbereich von 14 kDa. Dieses Ergebnis trifft auf über 50 % der Seren der Landwirte in der vorliegenden Studie zu. Somit konkretisieren meine Ergebnisse die Bedeutung dieser Proteine, die in diagnostischen Rinderallergenextrakten berücksichtigt werden sollten.

Abschließend zu der Diskussion der Ergebnisse soll die Tabelle 8 die zuvor erwähnten Studien in einer Übersicht darstellen.

Erstautor	Ziel der Studie	verwendete Rohstoffe	eingesetzte Methoden	Ergebnisse [MW in kDa]
Havass et al. (1971)	Isolierung der zur biochemischen Analyse notwendigen Eiweißmenge	kommerzieller Rinderhaarextrakt (kein Serum verwendet)	· DEAE-Zellulose-chromato-graphie · Hauttest	aktive Fraktion bei 20
Prahl et al. (1978)	Identifizierung von Major- und Minor-allergenen und Vergleich mit anderen Quellen	selbstpräparierte Rinderepithel-extrakte von verschiedenen Rassen (Seren von 36 Patienten)	· Gelelektrophorese · Gel-Chromato-graphie · Radio-Immun-elektrophorese	· 17 Allergene isoliert · wichtig: 20, 23, 24, 30, 35, 40, 65
Løwenstein (1981)	Versuch der Definition eines Standardallergen-extraktes	kommerzieller Rinderepithelextrakt (Patientenserum unbekannter Anzahl)	· Radio-Immun-elektrophorese	· 11 Allergene isoliert · wichtig: 20, 22, 24
Prahl et al. (1982)	Bestätigung der allergenen Aktivität bereits voruntersuchter Allergene aus Rinderhaarextrakten	selbstpräparierte Rinderepithel-extrakte von verschiedenen Rassen (Seren von 10 Patienten)	· SDS-PAGE · Radio-Immun-elektrophorese	· 17 Allergene isoliert · wichtig: 20, 22, 24
Ylönen et al. (1990)	Charakterisierung der Antigenstruktur und Allergenaktivität von Extrakten aus Rinderepithel	kommerzieller Rinderepithelextrakt (Seren von 19 Patienten)	· SDS-PAGE · Western-Blot · ECL/Hyperfilm	· Allergene bei: 13–17, 25–30 und >30 · hohe Reaktivität bei: 20 und 22 · geringe Reaktivität bei: 24
Ylönen et al. (1992)	Vergleich von selbstpräparierten Extrakten aus Rinderepithelien und -urin	selbstpräparierte Extrakte aus Rinderepithelien und -urin (Seren von 49 Patienten)	· SDS-PAGE · Radio-Immun-elektrophorese	· Epithelien: 16, 20, 22, 24, 30, 35, 55 · Urin: 20, 22, 24, 67
Valero et al. (1997)	Darstellung der Proteine aus Rinderhaar-extrakten und Identifikation der allergenen Fraktionen	kommerzieller Rinderepithelextrakt (Serum von 2 Patienten)	· SDS-PAGE · Western-Blot · ECL/Hyperfilm	· Allergene bei: 11; 15; 22,6; 24,8; 27; 35,8; 62,3 und 136 · hohe Reaktivität bei: 11, 15 und 62,3 · geringe Reaktivität bei: 24,8; 22,6; 27

Tabelle 8: Zusammenfassung der Methoden und Ergebnisse vorliegender Studien.

4.4 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen helfen, die Aussagekraft in der Allergiediagnostik hinsichtlich der Rinderhaarallergie zu bewerten und die Methoden für die Durchführung und Auswertung zu verbessern.

Zu den wichtigsten Ergebnissen der vorliegenden Studie gehört die Darstellung, dass 32 % der einbezogenen Landwirte mit eindeutigen klinischen Symptomen einer Allergie, aber negativen Ergebnissen in den serologischen Tests mit kommerziellen Extrakten, in von mir durchgeführten Immunblotexperimenten deutliche Reaktionen ihrer Seren bei allen eingesetzten Extrakten zeigten. Deshalb lautet die Empfehlung für die allergologische Vorgehensweise, dass bei Patienten mit offensichtlichen rinderbezogenen Symptomen diese Untersuchungen mit den Haaren der eigenen Rinder bzw. mit den selbst hergestellten Extrakten dieser Rinderhaare durchgeführt werden sollten.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis meiner Untersuchungen ist die Feststellung, dass durch die Proteinfärbung im SDS-PAGE dargestellte Banden in einigen Molekulargewichtsbereichen nur bei den selbst hergestellten Extrakten von immunologischer Relevanz waren. Hier kam es immer zu einer Reaktion der Antikörper im Serum mit den Proteinen der selbst hergestellten Extrakte. Im Gegensatz dazu war eine immunologische Reaktion in diesem Molekulargewichtsbereich für die kommerziellen Extrakte nicht nachweisbar. Eine mögliche Ursache dafür kann neben dem Fehlen einiger Proteine in den kommerziellen Extrakten auch die zu niedrige Konzentration der Proteine sein, oder dass durch eine Veränderung während des Herstellungsverfahrens diese ihre Fähigkeit verlieren, mit IgE-Antikörpern zu reagieren.

Aktuell fokussiert sich die Standardisierung kommerzieller Allergen-Extrakte auf eine kleine Anzahl wichtiger Allergene, wie unter anderem dem Majorallergen Bos d 2. Obwohl in allen Extrakten der von mir untersuchten Rinderrassen das Bos d 2 als allergene Komponente identifiziert wurde, scheinen auch andere Molekulargewichtsbereiche wie 14 oder 55 kDa relevant zu sein. Als Folge dessen wurde die Verschiedenartigkeit der Allergen-Strukturen mancher Rassen in kommerziellen Extrakten eventuell nicht genügend beachtet, da die Standardisierung mit besonderem Augenmerk auf den Bos-d-2-Gehalt durchgeführt wurde.

Die Differenzen zwischen den einzelnen Rassen sowie zwischen den kommerziellen und den selbst hergestellten Extrakten können als Ursache für die Diskrepanz

zwischen den klinischen Symptomen und den Ergebnissen der Allergietestung in Frage kommen, ebenso wie die Standardisierung der kommerziellen Extrakte mit dem Schwerpunkt auf eine kleinere Anzahl wichtiger Allergene, wie z.B. das als Majorallergen beschriebene Bos d 2. Das Allergen Bos d 2 wurde auch in der vorliegenden Studie in der Proteinfärbung des SDS-PAGE für alle Extrakte bestätigt und zeigt eine hohe immunologische Relevanz, d.h. die Antikörper aller eingesetzten Seren zeigen in diesem Molekulargewicht nachweisbare Reaktionen im Immunblot.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass es Unterschiede hinsichtlich der dargestellten Banden im SDS-PAGE und der Immunreaktion zwischen den kommerziellen und den selbst hergestellten Extrakten sowie zwischen den einzelnen Rinderrassen gibt. Während sich diese Unterschiede im SDS-PAGE als reproduzierbar für die kommerziellen Extrakte sowie die einzelnen Rinderrassen erwiesen, konnte daraus für den Immunblot kein bestimmtes rassespezifisches Sensibilisierungsmuster abgeleitet werden. Diese Aussage ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Literatur. Bislang wurden Unterschiede zwischen den einzelnen Rassen nicht in der Literatur beschrieben.

Verantwortlich für die Diskrepanz zwischen den kommerziellen und den von uns präparierten Extrakten ist möglicherweise eine Manipulation bei der Herstellung der kommerziellen Extrakte und somit eine Reduktion der Reaktionsfähigkeit der Allergene im Immunblot, da der Proteingehalt aller eingesetzten Extrakte in der gleichen Konzentration stattfand.

Diese Einschätzung wird auch durch Untersuchungen von Osváth und Endre (1971) bestätigt, die Proteine eines Handelskuhhaarextraktes (Sevac) mit einem eigenen Extrakt mittels Agar-Gel-Diffusion verglichen. Die von ihnen festgestellten Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung begründeten sie mit eventuellen „Verschiedenheiten“ während der Extraktion (Osváth und Endre 1971).

Ein quantitativ hohes Angebot an Proteinen, dargestellt durch die Proteinfärbung im SDS-PAGE, ist also nicht gleichzusetzen mit einer starken immunologischen Reaktivität und umgekehrt ist eine niedriges Angebot an Proteinen nicht zwangsweise mit einer schwachen oder ausbleibenden Reaktion im Immunblot verbunden. Daraus ist zu schlussfolgern, dass eine Definition der Extrakte allein über Majorallergene

eher problematisch ist. So weisen die kommerziellen Extrakte im SDS-PAGE bei 14 kDa zwar eine stärker gefärbte Bande auf, diese lässt sich in der immunologischen Reaktion selten oder nur schwach wieder finden, während sie bei den selbst hergestellten Extrakten trotz schwächerem Nachweis in der Proteinfärbung eine starke immunologische Reaktion zeigt. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann man feststellen, dass in den kommerziellen Extrakten nicht mehr alle für eine Sensibilisierung relevanten Proteine detektiert sind, weil sie eventuell durch Herstellungsverfahren so verändert wurden, dass ihre immunologische Reagibilität nicht mehr gegeben ist. Oder sie enthalten diese Proteine einfach nicht mehr.
Eine weitere Problematik stellt in der Allergiediagnostik die Aussagekraft der Untersuchung der Seren bezüglich des spezifischen IgE-Gehaltes auf Rinderhaarallergene und der RAST-Klassifizierung dar. In der vorliegenden Arbeit konnten für alle Seren immunologische Reaktionen im Immunblot nachgewiesen werden. Auch für die, die eine RAST-Klasse 0 oder 1 hatten. Systematische Unterschiede hinsichtlich der Intensität dieser Reaktionen konnten nicht nachgewiesen werden. So spielen die klinischen Symptome der Rinderhaarallergie eine wesentlich bedeutendere Rolle als die Laborwerte der serologischen Diagnostik. Auch das Gesamt-IgE und die damit verbundene Einteilung in Atopiker und Nichtatopiker hatten keinen Einfluss auf die Ergebnisse meiner Untersuchung. Eine alleinige Einteilung der Allergiker über die RAST-Klasse oder den Gesamt-IgE-Gehalt ist nach den Ergebnissen dieser Studie somit nicht ausreichend.

Auch weitere Faktoren aus dem direkten Umfeld der jeweiligen Landwirte spielen eine Rolle. Die Reaktion eines einzelnen auf Allergene und das damit verbundene Spektrum der Allergisierung/Sensibilisierung hängt unter anderem von der chemischen Beschaffenheit des Allergens sowie der Häufigkeit und der Intensität des Kontaktes ab. Der Grad an Bos d 2 in der Stallluft kann variieren (Turowski et al. 2007, Virtanen et al. 1986, Virtanen et al. 1988, Virtanen et al. 1992). Diese Unterschiede können mit Faktoren der Umgebung zusammenhängen, wie z.B. der Belüftung oder baulichen Eigenheiten des Rinderstalls. Sie können auch mit Merkmalen der Rinder im Stall zusammenhängen wie deren Anzahl oder verschiedenen Mengen an Bos-d-2-Ausschüttung der verschiedenen Rinderrassen.

4.5 Ausblick

Gerade in Bezug auf die in der Einleitung beschriebene Problematik der Folgen einer Rinderhaarallergie für die betroffenen Landwirte sollte die Früherkennung in der allergischen Diagnostik einen hohen Stellenwert einnehmen. Diese Studie könnte einen Beitrag dazu liefern, dass die Ergebnisse einer solchen Untersuchung präzise und reproduzierbar sind.
Um zukünftig die Ergebnisse von Allergentests zu verbessern, werden Extrakte benötigt, die in allen Molekulargewichtsbereichen unveränderte Proteine anbieten.

Ziel weiterer Bemühungen sollte es sein, die Methodik kommerziell hergestellter Allergenextrakte zu verbessern, um diagnostische In-vitro- und In-vivo-Verfahren mit der Aussagekraft selbst hergestellter Extrakte anzubieten.
Insbesondere auf dem Gebiet der berufsbedingten Allergien lässt sich aus den dargestellten Ergebnissen noch ein erheblicher Forschungsbedarf ableiten. Dabei sollte ein besonderer Stellenwert den Komponenten zukommen, die in den kommerziellen Extrakten nicht oder nicht ausreichend repräsentiert sind, die aber zu einer Allergisierung des Landwirtes führen. Die so erhaltene Möglichkeit gezielter Screening-Maßnahmen könnte zu einer Rationalisierung in der Diagnostik führen, sodass diese Tests auch als Standard verwendet werden können.

Abschließend kann man aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie eine Konsequenz für die Praktikabilität der Diagnostik von Rinderhaarallergie beschreiben: Um die Differenzen zwischen den klinischen Symptomen und den diagnostischen Untersuchungen (z.B. auch Hauttest) auszuräumen, sollten Extrakte von den Rindern oder ehemals gehaltenen Rindern der betroffenen Landwirte hergestellt und genutzt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Untersuchung wurden mittels SDS-Gelelektrophorese kommerziell erhältliche Rinderallergenextrakte verschiedener Anbieter mit selbst hergestellten Rinderallergenextrakten verschiedener Rassen in ihrem Proteinmuster verglichen. Dabei konnten deutliche Unterschiede der eigenen selbst hergestellten Rinderhaarextrakte im Vergleich zu den kommerziellen Extrakten dargestellt werden.

Die Extrakte wurden in Immunblotexperimenten mit Seren von Landwirten mit klaren rinderbezogenen allergischen Sofortreaktionen untersucht. So konnte durch den Vergleich zwischen dem dargestellten Proteinangebot und der immunologischen Reaktion im Blot nachgewiesen werden, dass in den kommerziellen Extrakten nicht mehr alle für eine Sensibilisierung relevanten Proteine repräsentiert sind oder durch eine mögliche Manipulation ihre immunologische Reagibilität eingebüßt haben. Die so dargestellten Unterschiede sind aber in dem Maße allergologisch relevant, als dass sie zu Sensibilisierungen führen, die nicht mit den kommerziellen Extrakten erfasst werden. Das wäre eine mögliche Erklärung für die beobachtete Diskrepanz sowohl in der klinischen als auch in der In-vitro Diagnostik zwischen den Allergietestergebnissen mit kommerziellen und selbst hergestellten Rinderextrakten.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Studie ist der Nachweis, dass 32 % der Landwirte mit eindeutigen Symptomen einer Rinderhaarallergie, aber negativer klinischer Diagnostik mittels kommerzieller Extrakte im Immunblot Reaktionen ihres Serums mit den selbst hergestellten Extrakten zeigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen auch die hohe allergologische Relevanz der in der Literatur beschriebenen Proteine bei 20 und 22 kDa, zeigen aber auch für die selbst hergestellten Extrakte eine immunologische Reaktion von über 50 % der eingesetzten Seren bei 14, 30, 55 und zwischen 67 und 97 kDa.

Die eingangs aufgestellte Hypothese eines möglicherweise rassespezifischen Sensibilisierungsmusters lässt sich nicht aufrechterhalten. Allerdings gibt es rassespezifische Unterschiede, die sich jedoch keiner bestimmten Systematik zuordnen lassen.

6. Literaturverzeichnis

Aalberse RC (2000):
Structural biology of allergens.
J Allergy Clin Immunol 106 (2), 228–238

Adkinson NF (1981):
The radioallergensorbent test in 1981 – limitation and refinements.
J Allergy Clin Immunol 67, 87–89

Axen R, Drevin H, Kober A, Yman L:
A new laboratory diagnostic system applied to allergy testing.
In: Proceedings of a clinical workshop: IgE antibodies and the Pharmacia CAP systems in allergy diagnosis.
hrsg. v. Johansson SGO|Pharmacia Publication, Uppsala Sweden **1988**, 3–5

Bachert C, Wahl R, Bousquet J, Maasch HJ, Ganzer U (1990):
Determinaton of IgE-specifities in nasal secretions and sera of allergic subjects by crossed radioimmunoelectrophoresis.
Clin Exp Allergy 20, 305–309

Bennich H, Johansson SGO (1971):
Structure and function of human immunoglobulin E.
Adv Immunol 13, 1–6

Bergmann KC:
Der informierte Allergiker.
In: Allergien: Erkennen, Behandeln, Vermeiden
hrsg. v. Bergmann K-C, Vollmer-Rupprecht R, Surhold-Rauer B, Summ A;
Techniker Krankenkasse, Hamburg **2001a**, 2

Bergmann KC:
Verschiedene Formen allergischer Erkrankungen.
In: Allergien: Erkennen, Behandeln, Vermeiden
hrsg. v. Bergmann K-C, Vollmer-Rupprecht R, Surhold-Rauer B, Summ A;
Techniker Krankenkasse, Hamburg **2001b**, 7–18

Bieber T, De La Salle H, Wollenberg A, Hakimi J, Chizzonite R, Ring J, Hanau D, De La Salle C (1992):
Human epidermal Langerhans´ cells express the high affinity receptor for Immunglobulin E (FcεRI).
J Exp Med 175, 1285–1290

Biedermann G:
Entwicklung der Rinderrassen in Deutschland.
In: Sonderheft „Schwerpunkt Rinder“
hrsg. v. GEH (Gesellschaft zur Erhaltung alter und gefährdeter Haustierrassen e.V.)
Kassel **1995**

Blanc PD, Ellbjar S, Janson C, Norback D, Norrman E, Plaschke P, Toren K (1999):
Asthma-related work disability in Sweden. The impact workplace exposures.
Am J Respir Crit Care Med 160 (6), 2028–2033

Bostock J (1819):
Case of a periodical Affection of the Eyes and Chest.
Med-Chir Transact (London) 10, 161

Bousquet J, van Cauwenberge P, Khaltaev N (2001):
Allergic rhinitis and its impact on asthma.
J Allergy Clin Immunol 108 (5), 147–334

Burnette WN (1981):
Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic dedection with antibody and radioiodinaited protein A.
Anal Biochem 112, 195–203

Burr ML, Butland BK, King S (1989):
Changes in asthma prevalence: two surveys 15 years apart.
Arch Dis Child 64, 1452–1456

Burrows, B, Martinez FE, Halonen M (1989):
Association of asthma with serum IgE levels and skin-test reactivity to allergens.
N Engl J Med 320, 271–277

Ceska M, Lundkvist U (1972):
A new and simple radioimmunoassay method for determination of IgE.
Immunochem 9, 1021–1030

Chapman MD, Wood RA (2001):
The role and remediation of animal allergens in allergic diseases.
J Allergy Clin Immunol 107 (3), 414–421

Chapman MD, Smith AM, Vailes LD, Arruda LK (1997):
Recombinant mite allergens.
Allergy 52, 374–379

Coombs RRA, Gell PG:
The classification of allergic reactions underlying disease.
In: Clinical aspects of immunology.
hrsg. v. Gell PGH, Coombs RRA|Davis, Philadelphia 1963, 317

Custovic A, Simpson B, Murray C, Lowe L, Woodcock A and NAC Manchester Asthma and Allergy Study Group (2002):
The National Asthma Campaign Manchester Asthma and Allergy Study.
Pediatr Allergy Immunol 13 (15), 32–37

Debelic M (1979):
Die klinische Bedeutung der Bestimmung von Serum-Gesamt-IgE und spezifischem IgE für die Diagnostik und Verlaufsbeobachtung allergischer Krankheitsbilder.
Therapiewoche 29, 2280–2295

Debelic M, Schwenker O (1986):
Labordiagnostik bei allergischen Atemwegserkrankungen.
Atemw Lungenkr 12, 140–143

Deppe U, Fortemeier B, Liesen H, Westermann B, Müsken H, Bergmann KC (1998):
Langzeitstabilität des Rindermajorallergens Bos d 2 im Hausstaub von Landwirten.
Allergologie 21 (8), 366–370

Diebschlag W:
Diagnostik und Therapie allergischer Erkrankungen.
In: Berufs- und Nahrungsmittelallergien (Ursachen – Auswirkungen – Präventionen)
Ullstein Mosby GmbH & Co. KG, Wiesbaden **1996**, 31–44

Feldner H (2002):
Berufsbedingte bronchiale Hyperreaktivität in der Landwirtschaft.
Atemw Lungenkr 28 (6), 314–318

Galli SJ (2000):
Mast cells and basophils.
Curr Opin Hematol 7, 32–39

Gassner M (1996):
Allergien in der Landwirtschaft.
Schweiz Rundsch Med (Praxis) 85, 950–960

Gleich GJ, Jones RT (1975):
Measurement of IgE antibodies by the radioallergosorbent test.
J Allergy Clin Immunol 55, 346–357

Gordon, S (1997):
Allergy to furred animals.
Clin Exp Allergy 27 (5), 479–482

Gronemeyer W (1979):
Indikation und Wertigkeit des RAST in der praktischen Allergologie.
Allergologie 5, 234–238

Gültekin H, Heermann KH (1988):
The use of polyvinylidendifluoride membranes as a general blotting matrix.
Anal Biochem 172 (2), 320–329

Hammer DK (1979):
Immunglobulin E (IgE)-vermittelte Reaktionen.
Allergologie 2 (4), 168–173

Hashimoto F, Horigome T, Kanbeyashi M, Yoshida K, Sugano H (1983):
An improved method for separation of low-molecular weight polypeptides by Electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel.
Anal Biochem 129 (1), 192–199

Havass Z, Osváth P, Endre L (1971):
Biochemische Untersuchung der allergisierenden Proteine von Rinderhaarextrakten.
Allergie Immunol 17 (4), 299–306

Heinrich J, Richter K, Frye C, Meyer I, Wölke G, Wjst M, Nowak D, Magnussen H, Wichmann HE (2002):
Die Europäische Studie zu Atemwegserkrankungen bei Erwachsenen.
Pneumologie 4, 1–273

Heutelbeck AR (2002):
Krank durch Rinderhaare – Viele Möglichkeiten beim Arbeitschutz.
Sicher Leben 1 (H 6336), 4–5

Heutelbeck AR, Janicke N, Hilgers R, Kütting B, Drexler H, Hallier E, Bickeböller H (2007):
German cattle allergy study (CAS): public health relevance of cattle-allergic farmers.
Int Arch Occup Environ Health 81: 201–8

Hinze S:
Die beruflich bedingte, klinisch aktuelle Rinderhaarsensibilisierung des Atemtraktes.
Med. Diss. Hannover **1993**

Hinze S, Bergmann KC (1995):
Rinderhaarasthma: Symptomatik und Verlauf.
Allergo J 4 (2), 97–101

Hinze S, Bergmann CK, Løwenstein H, Nordskov Hansen G (1996):
Differente Schwellenwertkonzentrationen für Sensibilisierungen durch das Rinderhaarallergen Bos d 2 bei atopischen und nicht-atopischen Landwirten.
Pneumologie 50, 177–181

Holtzhauser M:
Elektrophoretische Techniken.
In: Methoden der Proteinanalytik
hrsg. v. Holtzhauser M|Springer Verlag, Berlin **1996**, 356–378

Ishizaka K, Ishizaka T (1967):
Identification of gamma-E-antibodies as a carrier of reaginic activity.
J Immunol 99, 1187–1198

Iversen M, Pedersen B (1990):
The prevalence of allergy in Danish farmers.
Allergy 45, 347-353

Jaén A, Sunyer J, Basagana X, Chinn S, Zock JP, Antó JM, Burney P and European Community Respiratory Health Survey (ECRHS) (2002):
Specific sensitization to common allergens and pulmonary function in the European Community Respiratory Health Survey.
Clin Exp Allergy 32, 1713–1719

Janicke N, Bickeböller H, Schippke D, Langer C, Kütting B, Drexler H, Hallier E, Heutelbeck AR (2004):
Gesundheitspolitische Relevanz von Landwirten mit Rinderallergie in Deutschland.
Allergo J 13, 515–516

Johansson SGO (1967):
Raised levels of a new immunoglobulin class (IgND) in asthma.
Lancet 1967, II, 951–954

Johansson SGO, Bennich H, Wide L (1968):
A new class of immunoglobulins in human serum.
Immunology 14, 265–272

Karjalainen A, Kurppa K, Virtanen S, Keskinen H, Nordmann H (2000):
Incidence of occupational asthma by occupation and industry in Finland.
Am J Ind Med 37 (5), 451–458

Kay AB, Austen KF, Lichtenstein LM:
Asthma. Physiology, Immunopharmacology and Treatment.
Academic Press, London **1984**

Keller R:
Immunologische Methoden.
In: Immunologie und Immunpathologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1994**, 163–191

Kemp SF, Lockey R:
Diagnostic Methods in Allergy.
CRC Press, Boca Raton **1999**

Kinet JP (1999):
The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology.
Annu Rev Immunol 17, 931–972

King TP:
Allergen nomenclatur. IUIS/WHO Allergen Nomenclature Subcommitee.
In: Immunology Nomenclature
hrsg. v. Turner MW, Natrig JB | Hogrefe & Huber, Seattle **1999**, 125–138

Kogevinas M, Anto JM, Sunyer J, Tobias A, Krohout H, Burney P (1999):
Occupational asthma in Europe and other industrialized areas: a population-based-study.
Lancet 353, 1750–1754

König W, Pfeiffer P, Pison U (1981):
IgE-vermittelte Entzündungsreakionen.
Dtsch Med Wochenschrift 106, 1266–1271

Kroidl RF, Schwichtenberg U (1999):
Allergien vom Typ I in der Landwirtschaft.
Allergologie 22 (4), 230–236

Larsen JN, Løwenstein H (1996):
Allergen nomenclatur.
J Allergy Clin Immunol 97, 577–578

Løwenstein H (1981):
Allergene von Katze, Hund, Rind und Pferd.
Allergologie 4 (5), 265–269

Mäntyjärvi R, Parkkinen S, Rytkönen S, Pentikäinen J, Pelkonen J, Rautiainen J, Zeiler T, Virtanen T (1996):
Complementary DANN cloning of the predominant allergen of bovine dander: A new member in the lipocalin family.
J Allergy Clin Immunol 97 (6), 1297–1303

Marsh DG, Goodfriend L, Piao King T, Løwenstein H, Platts-Mills T (1988):
Allergen nomenclature.
Ann Allergy 60, 499–504

Maurer D, Fiebinger E, Reininger E (1994):
Expression of functional high affinity immunglobulun E receptors (FcεRI) on Monocytes of atopic individuals.
J Exp Med 179, 745–750

Maurer HR:
Methodik der analytischen Disk-Elektrophorese
(Nachweis getrennter Substanzen durch Färbungen)
In: Disk-Elektrophorese: Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
hrsg. v. Fischbeck K| Walter de Gruyter, Berlin **1968**, 23–103

Metzger H, Rivnay B, Henkart M, Kanner B, Kinet JP, Perez-Montfort R (1984):
Analysis of the strucure and function of the receptor for immunglobulin E.
Mol Immunol 21, 1167–1173

More T:
The history of King Richard III.
In: The English Works of Sir Thomas More.
hrsg. V. Campbell E et al.|London-New York **1931**, 426 f.

Müsken H:
Diagnostische Methoden. Anamnese.
In: Praktische Allergologische Diagnostik
hrsg. v. Przybilla B, Bergmann KC, Ring J|Steinkopf Verlag, Darmstadt **2000**, 3–9

Nolte D:
Asthma: Das Krankheitsbild, der Asthmapatient, die Therapie.
Urban & Schwarzenberg Verlag, München **1996**

Nowak D (1994):
Obstruktive Atemwegserkrankungen bei Landwirten:
Epidemiologie und Risikofaktoren.
Atemw Lungenkr 20, 5–16

Ollert M, Ring J (1999):
Prognostische Bedeutung von Immunoblot-Untersuchungen bei Hymenopterengift-Allergie.
Allergologie 22 (2), 78–79

Osváth P, Endre L (1971):
Immunanalytischer Vergleich zwischen Kuhhaarextrakten und anderen Rinder- und Milchproteinen.
Allergie Immunol 17 (1), 63–68

Peltre G, Lapeyre J, David B (1982):
Heterogeneity of grass pollen allergens (Dactylis glomerata) recognized by IgE antibodies in human patiens sera by a new nitrocellulose immunoprint technique.
Immuno Lett 5, 127–131

Pirquet C (1906):
Allergie
Münch Med Wochenschr 1906; 30 : 1457

Platts-Mills TA, de Weck AL (1989):
Dust mite allergens and asthma – a worldwide problem.
J Allergy Clin Immunol 83, 416–427

Poehling H, Neuhoff V (1981):
Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis.
Elektrophoresis 2, 141–147

Prahl P (1981):
Allergens in cow hair and dander.
Allergy 36, 561–571

Prahl P, Søndergaard I (1982):
Allergen Content in Aqueous and Hydrophobic Extracts from Cow Hair and Dander.
Allergy 37, 279–283

Prahl P, Weeke B, Løwenstein H (1978):
Quantitative Immunelectrophoretic Analysis of Extract from Cow Hair and Dander.
Allergy 33, 241–253

Prahl P, Bucher D, Plesner T, Weeke B, Løwenstein H (1982):
Isolation and Partial Charakterisation of Three Major Allergens in an Extract from Cow Hair and Dander.
Int Arch Allergy Immunol 67, 293–301

Pürschel W, Pahl O (1986):
Enzym-immunologische Bestimmungen des Gesamt-IgE bei Neurodermitis atopica.
Allergologie 9, 119–124

Räsänen L, Kuusisto P, Penttilä M, Niemimen M, Savolainen J, Letho M (1994):
Comparison of immunologic tests in the diagnosis of occupational asthma and rhinitis.
Allergy 49, 342–347

Rautalahti M, Terho EO, Vohlonen I, Husman K (1987):
Atopic sensitization of dairy farmers to work-related an common allergens.
Eur J Respir Dis Suppl 152, 155–164

Rautiainen J, Auriola S, Rouvinen J, Kauppinen J, Zeiler T, Novikov D, Virtanen T, Mäntyjärvi R.A (1998):
Molecular and Crystal Properties of Bos d 2, an Allergenic Protein of the Lipocalin Family
Biochem Biophys Res Comm 247 (3), 746–750

Reijula K, Patterson R (1994):
Occupational allergies in Finland in 1981–1991.
Allergy Proc 15 (3), 163-168

Rieger C
Lunge.
In: Immunologie (Grundlagen, Klinik, Praxis)
hrsg. v. Gemsa D, Kalden JR, Resch K u.a.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1997**, 493–509

Ring J (1985):
Erstbeschreibung einer „atopischen Familien-Anamnese“ im Julisch-Claudischen Kaiserhaus: Augustus, Claudius, Britannicus.
Hautarzt 36, 470–474

Ring J, Przybilla B (1987):
Diagnostik der chronischen Urtikaria.
Med Welt 38, 256–259

Ring J:
Allergie-Diagnostik.
In: Angewandte Allergologie
hrsg. v. Ring J
MMV Medizin Verlag GmbH München, München **1992**, 89–108

Ring J:
Vorwort.
In: Angewandte Allergologie
hrsg. v. Ring J|MMV Medizin Verlag GmbH München, München **2004**, 13–14

Rothe T (1992):
25 Jahre Immunglobulin E: heutiger Stellenwert der Gesamt-IgE-Bestimmung.
Allergologie 15, 78–84

Rouvinen J, Rautiainen J, Virtanen T, Zeiler T, Kauppinen J, Taivainen A, Mäntyjärvi R (1999):
Three – Dimensional Structure of the bovine lipocalin allergen Bos d 2.
J Biol Chem 274 (4), 2337–2343

Rylander R (1986):
Lungendisease caused by organic dusts in the farm environment.
Am J Ind Med 10, 221–227

Rylander R, Peterson Y (1994):
Causative agents for organic dust related disease.
Am J Ind Med 25, 1–148

Scheiner O, Kraft D (1995):
Basic and practical aspects of recombinant allergens.
Allergy 50, 384–391

Simons FE (1996):
Learning impairment and allergic rhinitis.
Allergy Asthma Proc 17, 185–189

Simons FE (1999):
Allergic rhinobronchitis: The asthma-allergic rhinitis link.
J Allergy Clin Immunol 104, 534.540

Stadler BM:
Allergie.
In: Immunologie (Grundlagen, Klinik, Praxis)
hrsg. v. Gemsa D, Kalden JR, Resch K u.a.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1997**, 235–250

Taylor K, Hardiman F (1993):
Laboratory animal allergy: an employer's responsibility.
Occup Health 69, 338–341

Terho EO, Husman K, Vohlonen I, Rautalathi M, Tukiainen H (1985):
Allergy to storage mites or cow dander as a cause of rhinitis among Finnish dairy farmers.
Allergy 40 (1), 23–26

Turowski S, Baur J, Seeckts A, Lange M, Metzner R, Scheuermann H, Hallier E, Heutelbeck A (2007):
Charakterisierung der Rinderallergenexposition in Niedersächsischen und Baden-Württembergischen Rinderstallungen.
Verh Dtsch Ges Arbeitsmed Umweltmed 47: 500–502

Valero Santiago A L, Rossel Vives E, Lluch Perez M, Sancho Gomez J, Piulats Xanco J, Malet Casajuana A (1997):
Occupational allergy caused by cow dander: detection and identification of the allergenic fractions.
Allergol Immunopathol 25 (6), 259–265

Van Hage-Hamsten M, Johansson SGO, Zetterstrom O (1987):
Predominance of mite allergy over allergy to pollens and animal danders in a farming population.
Clin Allergy 17 (5), 417–423

Van Kampen V, Merget R, Baur X (2000):
Occupational airway sensitizers: an overview on the respective literature.
Am J Ind Med 38, 164–218

Vercelli D, Geha RS (1992):
Regulation of isotype switching.
Curr Opin Immunol 4, 794–797

Virtanen T, Louhelainen K, Mäntyjärvi R (1986):
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Inhibition method to estimate the level of airborne bovine epidermal antigen in cowsheds.
Int Arch Allergy Appl Immunol 81: 253–257

Virtanen T, Vilhunen P, Husman K, Happonen P, Mäntyjärvi R (1988):
Level of airborne bovine epithelial antigen in Finnish cowsheds.
Int Arch Occup Environ Health 60: 355–360

Virtanen T, Eskelinen T, Husman K, Mäntyjärvi R (1992):
Long- and short-term variability of airborne bovine epithelial antigen concentrations in cowsheds.
Int Arch Allergy Immunol 98: 252–255

Wahl R (1992):
In-vitro-Methoden der Allergiediagnostik.
Atemw Lungenkr 18, 37–40

Wahl R, Paap A (1990):
Untersuchungen zur reproduzierbaren Herstellung von
Milben(Dermato-Phagoides pteronyssinus)-Allergenextrakten.
Allergologie 13, 376–380

Wahl R, Franke D:
Allergen extracts used for diagnosis and therapy:
state of the art of allergen extrac standardization.
In: Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut|Fischer Verlag, Stuttgart 1991, 197–205

Wahn U, Wichelmann HE:
Spezialbericht Allergien.
hrsg. v. Statistisches Bundesamt|Metzler Poeschel Verlag, Stuttgart 2000, 1–147

Wallenstein G, Rebohle E, Bergmann I (1977):
Berufsbedingte allergische Atemerkrankung durch Tierhaare.
Dtsch Gesundheitswesen 32, 554–556

Walker JM (1994):
The bicinchoninic acid (BCA) asay for protein quantitation.
Methods Mol Biol 32, 5–8

Webber A, Lau S, Wahn U:
Direkter Aero-Allergennachweis.
In: Praktische Allergologische Diagnostik
hrsg. v. Przybilla B, Bergmann KC, Ring J|Steinkopf Verlag, Darmstadt 2000, 77–86

Wide L, Bennich H, Johansson SGO (1967):
Diagnosis of allergy by an in vitro test for allergen antibodies.
Lancet 1967, II, 1105–1109

Wütherich B, Kopper F, Virchow C (1973):
IgE-Bestimmung bei Neurodermitis und anderen Dermatosen.
Hautarzt 24, 381–386

Wütherich B, Leuenberger P, Ackermann-Liebrich U, Schindler C, Karrer W, Künzli N, Brändli O und SAPALDIA-Team (2002):
Atopische Sensibilisierung, Luftverschmutzung und respiratorische Erkrankungen in der Schweiz. (SAPALDIA-Studie)
Allergologie 22 (5), 267–274

Ylönen J, Nuutinen J, Rautiainen M, Ruoppi P, Mäntyjärvi R, Virtanen T (1990):
Comparative analysis of bovine extracts by immunoblotting and ELISA-inhibition.
Allergy 45, 30–39

Ylönen J, Mäntyjärvi R, Taivainen A, Virtanen T (1992):
IgG and IgE antibody responses to cow dander and urine in farmers with cow-induced asthma.
Clin Exp Allergy 22, 83–90

Yman L (1990):
Die neue Generation der Allergietestung: Pharmacia CAP-System.
In vitro Diagn Spec 1, 18–22

Yman L, Ponterius R, Brandt R (1975):
RAST-based allergen assay methods.
Develop Biol Stand 29, 151–165

7. Anhang: Dokumentation

7.1 Dokumentation der Patienteninformation

GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

Zentrum Umwelt- und Arbeitsmedizin

Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. E. Hallier

Dr. med. Astrid Heutelbeck
Georg-August-Universität Göttingen
Abteilung für Arbeits- und Sozialmedizin
Waldweg 37, D-37073 Göttingen

Tel.: 0551/39-8045
Fax: 0551/39-6184
e-Mail: aheutel@gwdg.de

Patienteninformation zur Blutentnahme (30 ml) im Rahmen der Studie „Untersuchung zum Risikoprofil hinsichtlich einer Sensibilisierung mit Rinderallergen unter besonderer Berücksichtigung der verschiedenen Rinderrassen“

Lieber Landwirt, liebe Landwirtin

Bei Ihnen ist ein Rinderhaarasthma bzw. ein Rinderhaarschnupfen bekannt. Verantwortlich dafür sind bestimmte Eiweiße, die Allergene, die in den Haaren, Hautschuppen, der Molke, dem Urin und Speichel sowie dem Fruchtwasser der Tiere nachgewiesen werden können. Die Erkrankung, auch Allergie genannt, wurde bei Ihnen mittels Test an der Haut bzw. im Blut festgestellt.

Die Erkenntnisse der letzten Jahre lassen vermuten, daß nicht alle in der Milchwirtschaft und Zucht vertretenen Rinderrassen (z.B. Schwarzbunte oder Rotbunte) in gleichem Maße eine solche Reaktion hervorrufen können. Möglicherweise wird die Hautreaktion von einigen Rassen häufiger als von anderen hervorgerufen.

Wir möchten Sie hiermit um die Teilnahme an einer Studie bitten, die näher untersucht, ob unterschiedliche Eiweiße für die Entstehung einer Allergie bei den verschiedenen Rinderrassen verantwortlich sind. Wir untersuchen hierbei im Blut von Rinderallergikern das für die Allergie verantwortliche Eiweißmuster und vergleichen es mit dem Eiweißmuster von den Haaren verschiedener Rinderrassen. Wir erhoffen uns von dieser Untersuchung Hinweise darauf, ob alle Rinderrassen gleich „allergiegefährlich“ sind. Möglicherweise ergeben sich aus dieser Untersuchung Empfehlungen für die Auswahl von Rinderrassen mit einem geringeren Allergierisiko.

Im Rahmen dieser Untersuchung werden wir in Zusammenarbeit mit der Landwirtschaftlichen Berufgenossenschaft Rinderallergiker in Norddeutschland befragen und an einem Tag (nach Rücksprache) für 2 bis 3 Stunden auf ihrem Hof besuchen, um die notwendigen Untersuchungen durchzuführen.

Für die Untersuchung benötigen wir 30 ml Blut von Ihnen, das wir wie üblich aus der Armvene entnehmen wollen. Nach praxisnaher Voraussage ist ein Risiko für Sie nicht gegeben. Theoretisch denkbar, aber extrem selten, sind Empfindungsstörungen nach der Punktion der Armvenen.

Ergänzend fragen wir nach Ihren Beschwerden bezüglich Ihres Rinderhaarasthmas und werden eine Untersuchung der Atemfunktion (Spirometrie, Peak-flow-Protokoll) durchführen. Auch durch diese Ihnen sicherlich bekannten Untersuchungen ist ein Risiko für Sie nicht gegeben. Ergänzend werden wir eine arbeitsmedizinische Befragung zu Ihrem (ehemaligen) beruflichen Umfeld durchführen und den Stall und das Wohnhaus begehen, um beispielsweise das Risiko einer möglichen Verschleppung von Rinderhaaren abschätzen zu können.

Die von Ihnen erhaltenen Proben und Daten werden sowohl im Labor als auch bei der Auswertung anonymisiert weiterverarbeitet unter voller Gewährleistung des Datenschutzes. Die ärztliche Schweigepflicht gilt im Rahmen der Studie uneingeschränkt.

Weitere Fragen können im persönlichen Gespräch mit Frau Dr. Heutelbeck (Tel.: 05 51/39 80 45) geklärt werden.

Wir möchten Sie hiermit bitten, an der Untersuchung teilzunehmen und zur anonymisierten wissenschaftlichen Auswertung und Archivierung der Daten Ihre Zustimmung auf beiliegender Einverständniserklärung schriftlich zu erteilen.

7.2 Dokumentation der Einverständniserklärung

GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

Zentrum Umwelt- und Arbeitsmedizin

Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. E. Hallier

Dr. med. Astrid Heutelbeck
Georg-August-Universität Göttingen
Abteilung für Arbeits- und Sozialmedizin
Waldweg 37, D-37073 Göttingen

Tel.: 0551/39-8045
Fax: 0551/39-6184
e-Mail: aheutel@gwdg.de

Patientencode:

Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie „Untersuchung zum Risikoprofil hinsichtlich einer Sensibilisierung mit Rinderallergen unter besonderer Berücksichtigung der verschiedenen Rinderrassen“

Ich, ..., habe die Information über die oben genannte Studie und deren Risiken gelesen und in vollem Unfang verstanden. Ich hatte ausreichend Gelegenheit, offene Fragen mit der betreuenden Ärztin zu meiner Zufriedenheit zu besprechen. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen widerrufen werden, ohne daß mir dadurch Nachteile erwachsen.

Ich habe eine Kopie der Patienteninformation und dieser Einwilligungserklärung erhalten. Mit meiner Unterschrift stimme ich der Blutentnahme, der klinischen Untersuchung, der Erhebung krankheitsbezogener Daten sowie der wissenschaftlichen Auswertung und Speicherung der erhobenen Daten in anonymisierter Form zu.

Ort, Datum | Unterschrift des Patienten

Ort, Datum | Unterschrift der aufklärenden Ärztin

Die Unterschrift des jeweiligen Patienten unter dieser Einverständniserklärung war die Voraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie.

7.3 Dokumentation der Zustimmung der Ethik-Kommission

Die Ethik-Kommission hat die Studie „Untersuchung zum Risikoprofil hinsichtlich einer Sensibilisierung mit Rinderallergen unter besonderer Berücksichtigung der verschiedenen Rinderrassen“ am 03.08.2000 genehmigt. Die Antragsnummer der Studie lautet: 7/9/00.

7.4 Publikationen im Rahmen der Dissertation

Junghans C, Heutelbeck ARR, Hallier E, Schulz TG (2003):

Diversification of the IgE binding in immunoblotting of commercial and selfprepared cow allergen extracts.

XXII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI). 7.–11.06.2003 in Paris,

Oral Abstract Session 5 – Allergy Diagnosis, Abstract 88, 29

Heutelbeck AR, Junghans C, Esselmann H, Hallier E, Schulz TG (2009):

Exposure to allergens of different cattle breeds and their relevance in occupational allergy.

Int Arch Occup Environ Health 2009 Feb 24 (Epub ahead of print)

Danksagung

Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Schulz danke ich für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung während der praktischen Arbeiten und während des Schreibens. Ich danke Frau Dr. med. Astrid Heutelbeck, die sich unermüdlich für das Gelingen der Doktorarbeit eingesetzt hat, mir in Fragen der technischen Umsetzung des Themas zur Seite stand und mit vielen Anregungen und motivierenden Worten die Durchführung der Laborarbeiten erleichterte. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung Arbeits- und Sozialmedizin danke ich für die Unterstützung und Anleitung im Laboralltag.

Weiterhin möchte ich mich für die hilfsbereite Unterstützung durch Herrn Johannes Baur vom technischen Aufsichtsdienst der Landes-Berufs-Genossenschaft Baden-Württemberg bedanken. Durch ihn hatte ich die Möglichkeit, betroffene Landwirte im Rahmen dieser Studie vor Ort zu besuchen, zu befragen und Rinderhaare zu gewinnen.

Abschließend danke ich dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. med. Hallier, der die Rahmenbedingungen für die Erstellung dieser Arbeit geschaffen hat und damit die ausgezeichnete Betreuung durch die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Arbeits- und Sozialmedizin ermöglichte.