

Gesundheit und Umwelt
Materialien zur Umweltmedizin



Band 6:

Schutz vor der Entstehung
allergischer Krankheiten:
Protective Faktoren des
bäuerlichen Lebens

Gesundheit und Umwelt – Materialien zur Umweltmedizin

Band 6:

Schutz vor der Entstehung allergischer Krankheiten:
Protektive Faktoren des bäuerlichen Lebens

Impressum

Herausgeber:

Bayerisches Staatsministerium für
Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz (StMGEV)

Referat

Umweltbezogene Gesundheitsvorsorge, Ernährungsmedizin,
Umweltmedizin, Gesundheitsverträglichkeit

Schellingstraße 155

80797 München

Tel.: (089) 2170 – 04 (Vermittlung)

E-Mail: poststelle@stmgev.bayern.de

Internet: <http://www.stmgev.bayern.de>

© StMGEV, alle Rechte vorbehalten

Hinweis:

Die Reihe „**Gesundheit und Umwelt – Materialien zur Umweltmedizin**“ dient der Fachinformation des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (ÖGD) Bayerns. Beiträge dieser Reihe stellen nicht notwendigerweise auch stets die Haltung des Bayerischen Staatsministeriums für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz (StMGEV) dar.

In dieser Reihe sind bisher folgende Bände erschienen:

1. Mobilfunk: Ein Gesundheitsrisiko ? (2001)
2. PCB – Polychlorierte Biphenyle (2001)
3. Fortbildung Umweltmedizin (Material der Fortbildung der Bayerischen Akademie für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin am 20./21.11.2001)
4. Untersuchung und Bewertung der PCB-Belastung von Schülern und Lehrern in der Georg-Ledebour-Schule, Nürnberg (2002)
5. Aufgaben bei der Altlastenbehandlung (Material der Fortbildung der Akademien für Gesundheit, Ernährung und Verbraucherschutz am 19./21.11.2002)
6. Schutz vor der Entstehung allergischer Krankheiten: Protektive Faktoren des bäuerlichen Lebens (2003)

Geleitwort

Die Häufigkeit allergischer Erkrankungen hat in den letzten Jahren dramatisch zugenommen; europaweit geht man davon aus, dass ca. 20 – 30 % der Bevölkerung an verschiedenen Arten von allergischen Krankheiten leidet. Derzeit tritt möglicherweise eine Stabilisierung der

Häufigkeiten auf hohem Niveau ein. Die Inzidenz einzelner allergischer Erkrankungen ist aber deutlichen regionalen Schwankungen unterworfen. Als genereller Trend innerhalb Deutschlands besteht eine höhere Inzidenz allergischer Erkrankungen im Westen; innerhalb der Westhälfte gibt es darüber hinaus Anhaltspunkte für höhere Inzidenzen im Süden. Ausnahmen von diesen Trends sind als unsystematische Schwankungen, aber auch spezifisch in speziellen Klimaregionen, wie z.B. dem Hochgebirge, zu erwarten.

Vor diesem Hintergrund sind Untersuchungen gefordert, die Modelle darstellen und Faktoren identifizieren, welche als Risiko für oder als Protektion gegen die Entstehung allergischer Erkrankungen fungieren. Zwei Erklärungsmodelle werden dabei in Fachkreisen besonders häufig diskutiert:

Einerseits postuliert die „Umwelthypothese“ negative Zusammenhänge zwischen Allergien und Umweltfaktoren. Es ist naheliegend und wird zunehmend durch wissenschaftliche Erkenntnisse unterstützt, dass Umweltbelastungen (z.B. Zigarettenrauch in Innenraumluft) zu einer verstärkten Allergisierung durch natürlich vorkommende Allergene (z.B. Hausstaub-Milben) beitragen kann.

Andererseits postuliert die „Hygienehypothese“ einen Schutz vor der Entstehung allergischer Erkrankungen durch positive Stimulierung des Immunsystems, z. B. wie bei Kontakt zu mehreren Geschwistern oder altersgleichen Kindern in Kinderkrippen. Dabei vordringlich war es, die dabei protektiv wirkenden Faktoren zu identifizieren, da eine generelle Empfehlung zur Verringerung hygienischer Standards in der Gesamtbilanz nicht zielführend sein kann.

Der folgende Endbericht der Studie „Schutz vor der Entstehung allergischer Krankheiten: Protektive Faktoren des bäuerlichen Lebens (ALEX)“, der unter Federführung von Frau PD Dr. von Mutius erstellt wurde, geht der „Hygienehypothese“ unter besonderer Berücksichtigung des bäuerlichen Lebensraumes nach. Diese Ergebnisse sind bereits auch in der allgemeinen Öffentlichkeit und Medien thematisiert worden. Die Förderung der zugrundeliegenden Studie wurde noch unter der Federführung des StMLU begonnen und dann durch das StMGEV übernommen. Weitere Projekte zu dem relevanten Themenkomplex Allergie und Umwelt werden auch aktuell durch das StMGEV gefördert.

Die vorliegende Studie konnte signifikante Allergieprotektion durch Exposition gegen Endotoxin (-ein Bestandteil der Zellwände gramnegativer Bakterien-) und Rohmilchkonsum aufzeigen. Neben dem dadurch erheblichen wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn zur „Hygienetheorie“ soll an dieser Stelle der Hinweis gegeben werden, dass die vorliegenden Daten keineswegs den Wegfall üblicher hygienischer Standards für Kinder aus der Allgemeinbevölkerung nahe legen. Gerade auch der Konsum von völlig unbehandelter Rohmilch stellt aufgrund potentiell gravierender Infektionsgefahren keine allgemeingültige Empfehlung zur Allergieprävention dar. Weitere Forschung muss möglichst einfache und sichere Wege zur Allergieprävention aufzeigen, wenn, wie in der vorliegenden Studie, protektive Faktoren identifiziert und charakterisiert sind.

Das StMGEV möchte im Rahmen der Schriftenreihe „Gesundheit und Umwelt – Materialien zur Umweltmedizin“ die Informationen der „ALEX“-Studie dem ÖGD Bayerns zur Verfügung stellen. Die Wiedergabe des Endberichts erfolgt unredigiert - lediglich der Punkt 10 „Anhang“ entfiel zur Beibehaltung des üblichen Umfangs.

Die Herausgeber

Abschlussbericht

Oktober 2002

„Schutz vor der Entstehung allergischer Erkrankungen: Protektive Faktoren des bäuerlichen Lebens“ (ALEX-Studie)

Beginn der Studie: Februar 1999

Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinikum Innenstadt der LMU München

Dr. S. Maisch
PD Dr. E. von Mutius

Inhalt

1	Einleitung	3
2	Hypothesen.....	5
3	Ziele der Untersuchungen	5
4	Methodik und Ergebnisse der Pilotstudie	5
5	Studiendesign der ALEX Studie	6
5.1	Studienaufbau und Logistik	6
5.2	Studienpopulation	8
5.3	Fragebögen zur Gesundheit.....	9
5.4	Fragebögen zur Ernährung	10
5.5	Interview beim Hausbesuch	11
5.6	Blutuntersuchungen.....	11
5.7	Staubsammlung.....	12
5.8	Milchsammlung.....	13
6	Resultate	15
6.1	Studienbeteiligung (Responseraten).....	15
6.2	Studienbeteiligung (Responseraten) im gesamten multizentrischen Datensatz.....	16
6.3	Prävalenzunterschiede in Bayern	18
6.4	Prävalenzunterschiede in den 3 Regionen.....	19
6.5	Lebensstilfaktoren der untersuchten Populationen	20
6.6	Rolle der Stallexposition und des Bauernmilchkonsums im 1. Lebensjahr.....	21
6.7	Endotoxinwerte bei Bauern- und anderen Kindern.....	25
6.8	Auswirkung der Endotoxinexposition auf die Gesundheit.	25
6.9	Endotoxinexposition und Stallaufenthalt im ersten Lebensjahr.....	34
6.10	Ergebnisse der Zytokinproduktion nach Zellstimulation.	35
6.11	Zytokinproduktion versus Endotoxinbelastung.	40
7	Diskussion.....	45
8	Ausblick	49
9	Literatur.....	50
10	Anhang.....	53

1 Einleitung:

Die Entstehung allergischer Erkrankungen ist von multiplen Faktoren abhängig. Hierbei spielen neben genetischer Prädisposition auch die verschiedensten Umwelteinflüsse eine wichtige Rolle. In Studien mit großen Fallzahlen wurde nachgewiesen, dass der Bildungsstatus der Eltern (1,2) und die Anzahl der Geschwister (v.a. Vorhandensein älterer Geschwister) sowie wahrscheinlich häufige Infekte des oberen Atemtraktes oder des Gastrointestinaltraktes im frühen Lebensalter eine Rolle bei der Entstehung von Heuschnupfen und Asthma spielen könnten (3-15). Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe, die die Prävalenz atopischer Erkrankungen zwischen der ehemaligen DDR und den alten Bundesländern erforschte, ergeben deutliche Prävalenzunterschiede zwischen den untersuchten Städten (16). Kinder aus der ehemaligen DDR, die u.a. vor ihrem ersten Geburtstag in Kinderkrippen untergebracht waren, hatten gegenüber den westdeutschen Kindern deutlich niedrigere Sensibilisierungs- und Prävalenzraten für Heuschnupfen (17). Eine andere Studie fand einen deutlich inversen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Personen im Haushalt und der atopischen Sensibilisierung. Je mehr Personen auf engem Raum lebten, desto geringer war die Erkrankungsrate (18).

Neueste Untersuchungen aus ländlichen Regionen in Bayern, rund um Salzburg und der deutschsprachigen Schweiz haben aufgezeigt, dass auch signifikante Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit allergischer Erkrankungen auf engstem Raum zu finden sind, wenn man die Erkrankungsraten zwischen Bauernkindern mit denen von Nichtbauern-Kindern vergleicht, die in derselben Region leben (19,20).

Die erste Beobachtung geht auf die Münchner Asthma- und Allergiestudie zurück, die in den Jahren 1989-90 in einer ländlichen Region Oberbayerns durchgeführt wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass Kinder von Familien, die mit Holz oder Kohle heizen, ein signifikant niedrigeres Risiko aufwiesen, an Heuschnupfen, allergischer Sensibilisierung und bronchialer Hyperreaktivität zu erkranken (21). Diese Resultate wurden dahingehend interpretiert, dass diese Art des Heizens bzw. Kochens für einen traditionelleren Lebensstil steht und somit einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung allergischer Erkrankungen spielen könnte.

Eine weitere Studie in Niederbayern und der Oberpfalz, die im Rahmen der Schuleingangsuntersuchungen durchgeführt wurde, zeigte, dass Kinder vom Bauernhof die Hälfte des Risikos von Nichtbauern-Kindern derselben Region haben, einen Heuschnupfen zu entwickeln. Ein etwas geringerer Effekt zeigte sich für Asthma.

Nachfolgende Untersuchungen in der Schweiz bestätigten ebenfalls einen ausgeprägten Schutz gegenüber der Entstehung von Heuschnupfen und allergischer Sensibilisierung.

Schließlich konnten auch in einer Salzburger Studie starke Unterschiede zwischen Bauernkindern und anderen Bewohnern der gleichen Region gezeigt werden (19). Eine deutlich niedrigere Prävalenzrate für Heuschnupfen und allergische Sensibilisierung zeigte sich bei Bauernkindern.

In allen vier oben genannten Studien konnten bereits bekannte Determinanten wie Familiengröße, Anzahl der Geschwister, Grad der elterlichen Schulbildung und die familiäre Prädisposition für allergische Erkrankungen diesen starken Unterschied zwischen Bauern und Nichtbauern nicht erklären. Die Annahme, dass andere Einflussfaktoren eine wichtige protektive Rolle spielen müssen, lag nahe. Häufiger Stalltierkontakt ergab sich aus den multivariaten statistischen Analysen als potentieller Erklärungsfaktor. In der österreichischen Studie zeigten auch die Nichtbauern-Kinder mit häufigem Kontakt zu Stalltieren eine deutlich niedrigere Sensibilisierungsrate als diejenigen, die sich kaum in Tierställen aufhielten.

Aus der Arbeitsmedizin ist bekannt, dass in Tierställen die Exposition von Endotoxinen sehr hoch ist (22). Diese Endotoxine (Kohlenhydrat-Protein-Phospholipid-Komplexe) sind Bestandteile der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. Aufgereinigt wird es als Lipopolysaccharid (LPS) bezeichnet. Die biologische Aktivität des Endotoxins ist nicht an die lebende Bakterienzelle gebunden. Nach Bindung an das LPS-bindende Protein (LPB) vermittelt es als Adaptermolekül u.a. den Transfer zum Oberflächenantigen CD14, um dann als Ligand-Rezeptor-Paar (LPS/LPB-CD14) verschiedene Zellen zu aktivieren (23,24), die zur Sekretion von Zytokinen und zur Expression von Adhäsionsmolekülen führen.

LPS gilt auch als starkes Stimulans der antigenpräsentierenden Zellen, welche Interleukin 12, einen starken Mediator der TH1-Aktivierung, produzieren (25). TH1-Aktivierung bedeutet eine Unterdrückung des TH2-Weges, der maßgeblich für allergische Reaktionen verantwortlich ist. Somit könnte eine vermehrte LPS- bzw. Endotoxinexposition eine Unterdrückung der allergischen Sensibilisierung bewirken.

Neben dem Endotoxin-Effekt kristallisierte sich in den vorangegangenen Studien ein fraglich protektiver Effekt von häufigem Milchkonsum als ein weiterer möglicher Einflussfaktor heraus, wobei unklar blieb, ob die eigenproduzierte Milch oder die Vollmilch aus dem Laden invers mit allergischen Erkrankungen assoziiert ist.

Bisher konnte also zusammenfassend gezeigt werden, dass Bauernkinder eine geringere Prävalenz von Heuschnupfen, allergischer Sensibilisierung und in geringerem Maße auch von Asthma bronchiale haben. Der Kontakt zu Stalltieren erklärte in vorangegangenen Studien den „Bauerneffekt“, wobei auch Nichtbauern-Kinder mit häufigem Stalltierkontakt deutlichen Schutz vor allergischen Erkrankungen hatten.

2 Hypothesen:

Aufgrund der oben genannten Vorstudien stellten sich für diese Studie folgende Arbeitshypothesen:

1. Das Ausmaß der Exposition gegenüber Stalltieren ist Ausdruck für ein unterschiedliches Maß an Exposition gegenüber Endotoxinen.
2. Die Endotoxinexposition übt einen entscheidenden protektiven Effekt auf die Entstehung allergischer Erkrankungen aus.
3. Neben dem Stalltierkontakt kommen weitere Unterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkinder wie z.B. das Ernährungsverhalten (v.a. Milchkonsum) als Risikofaktoren bei der Entstehung allergischer Erkrankungen in Frage.

3 Ziele der Untersuchungen:

Ziel dieser Studie war es, die verschiedenen Risikofaktoren bei der Entstehung allergischer Erkrankungen im Kindesalter zu untersuchen. Hierbei lag der Schwerpunkt auf der bäuerlichen Lebensweise, um mögliche protektive Faktoren der Allergieentstehung zu identifizieren. In einer vorgeschalteten Pilotstudie, die aus eigenen Mitteln finanziert wurde, konnten bereits signifikante Unterschiede der Endotoxinexposition zwischen Bauern- und Nichtbauernkindern festgestellt werden. Diese Daten galt es anhand einer größeren Fallzahl zu erhärten. Auch weitere Unterschiede zwischen bäuerlichem und nicht bäuerlichem Leben sollten als mögliche Risiko- bzw. Schutzfaktoren untersucht werden.

4 Methodik und Ergebnisse der Pilotstudie:

Ausgehend von der Hypothese, dass Kinder mit regelmäßigem Stalltierkontakt eine größere Endotoxinbelastung haben und diese bei der Entstehung von allergischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte, wurde eine Pilotstudie in Zusammenarbeit mit der Arbeitsmedizin der LMU München und mit der Universität Basel im Zeitraum Dezember 1998 bis Juni 1999 durchgeführt (Anlage 1). In Bayern und in der Schweiz wurden bei Bauern- und Nicht-Bauernfamilien aus den gleichen ländlichen Regionen Staubsammlungen durchgeführt und der darin enthaltene Endotoxingehalt gemessen. Insgesamt waren 84 Familien mit 146 Kindern (n= 119 in Bayern, n=27 in der Schweiz) zwischen 1-14 Jahren an der Studie beteiligt. Die Staubsammlung erfolgte von den Matratzen der Kinder und vom Küchenboden der Familien. Zusätzlich wurde in den Ställen der Bauern Feinstaub aus der Luft durch Luftsaugvorrichtungen mit zwei unterschiedlichen Filtern (mit verschiedener Partikeldurchlässigkeit) für etwa 3 Stunden

gesammelt. Aus dem Stall und Wohnbereich der Kinder wurden ferner Staubproben als Sedimentstaub gewonnen. Alle Proben wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt und innerhalb einer Woche analysiert.

Im Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin der LMU München wurde unter der Leitung von Prof. Dr. D. Nowak ein Verfahren des Endotoxinnachweises im Staub etabliert. Für den sogenannten Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (LAL-Assay) wurden durch mehrere Waschschriffe wässrige Extrakte des Staubs hergestellt und verdünnt. 100 µl dieses Extraktes wurden bei 37 Grad Celsius mit einer LAL Reagenz (kinetic-QCL, von BioWhittaker) versetzt und ein chromogen-kinetischer Test durchgeführt. Die Standardkurve wurde im Bereich von 0,005-50 EU/ml Staub angesetzt.

Die ermittelte Endotoxinexposition pro mg Staub war bei Bauernfamilien deutlich höher im Küchenstaub als bei Nicht-Bauernfamilien (29). Das gleiche galt auch für die Matratzen der Kinder. Der Unterschied in der Endotoxinbelastung war auch zwischen den Nicht-Bauernkindern mit regelmäßigem Stalltierkontakt (d.h. mindestens 1x pro Woche Stalltierkontakt) und denen ohne regelmäßigem Kontakt signifikant.

Diese Pilotstudie zeigte, dass regelmäßiger Stalltierkontakt eine höhere Endotoxinbelastung auch im Innenraum nach sich zieht und diese größere Exposition sogar in den Matratzen der Kinder messbar ist.

5 Studiendesign der ALEX Studie:

Es handelte sich um eine Querschnittsstudie von Kindern aus den Schulklassen 1 - 6 einiger Grund- und Teilhauptschulen im Ostallgäu/Bayern.

Die Durchführung der Studie wurde von der Ethik-Kommission der Bayerischen Landesärztekammer nach Prüfung des Studiendesigns genehmigt.

5.1 Studienaufbau und Logistik:

Die Studie wurde im Bereich Ostallgäu durchgeführt, da nach Informationen des Gesundheitsamtes in diesem Gebiet noch eine hohe Dichte an Bauernfamilien anzutreffen ist (>10%).

Über die Regierung von Schwaben erhielten wir die Erlaubnis zur Durchführung der Studie in dieser Region. Mit dem Einverständnis und der Hilfe des zuständigen Schulamts konnten 11 Schulen im Ostallgäu ausgesucht werden, die im ländlichen Gebiet liegen (Abbildung 1).

Alle ansässigen Kinderärzte erhielten von uns ein Informationsschreiben über die Studie mit der Bitte, die Durchführung zu unterstützen, falls von den Eltern Nachfragen kommen. Das zuständige Gesundheitsamt Ostallgäu wurde ebenfalls über Sinn und Zweck dieser Studie schriftlich informiert.

Nach telefonischer und schriftlicher Information der jeweiligen Schuldirektoren wurden die einzelnen Schulen durch die Studienärztin besucht und die Lehrer bei einer Informationsveranstaltung über den Hintergrund und Sinn der Studie aufgeklärt. In diesem Rahmen wurden Termine für die Verteilung der Fragebögen sowie für die Blutentnahmen vereinbart.

Fragebögen wurden mit gesondertem Elternschreiben klassenweise an alle Kinder der teilnehmenden Schulen ausgeteilt und etwa 2-3 Wochen später eingesammelt.

Die Blutentnahmen fanden ebenfalls in den jeweiligen Schulgebäuden statt. Hierfür wurde der Studienärztin ein Schularztraum oder ähnliches zur Verfügung gestellt. Den teilnehmenden Kindern wurden (nach nochmaligem mündlichen Einverständnis) lokal betäubende Pflaster (EMLA®) an der Blutentnahmestelle aufgeklebt. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 30 Minuten wurden die Kinder einzeln oder paarweise zur Blutentnahme gebeten. Um den Schulunterricht so wenig wie möglich zu stören, wurden die Pflaster vor oder am Ende einer Unterrichtseinheit geklebt. Ebenso wurde mit den jeweiligen Klassenlehrern der Blutentnahmezeitpunkt abgesprochen.

Für die Staubsammlungen vereinbarten die Mitarbeiter mit den teilnehmenden Familien telefonisch mindestens 1 Woche vor Besuch der Familien einen Termin.

5.2 Studienpopulation:

In den 11 Grund- und Teilhaupschulen (Grundschule + zusätzliche Klassen 5 und 6) im Ostallgäu wurden an 2201 Kinder im Alter von 6 - 12 Jahren (Klassen 1 bis 6) Elternfragebögen ausgeteilt. Voraussetzung für die Teilnahme war ein vollständig oder annähernd komplett ausgefüllter Fragebogen. Im Anhang des Fragebogens konnten die Eltern ihr Einverständnis für eine Blutentnahme und/oder Staubsammlung abgeben. Es wurde ausdrücklich darauf hingewiesen, dass ein Einverständnis nicht gleich eine Teilnahme garantiert und nur ein Teil der befragten Kinder an weiterführenden Untersuchungen teilnehmen können. Nach Erhalt von insgesamt 1709 ausgefüllten Fragebögen wurden drei Studiengruppen gebildet: die Bauernkinder und die Nicht-Bauernkinder mit und ohne regelmäßigen Stalltierkontakt. Insgesamt konnten so 609 Kinder für die Studie rekrutiert werden, die mit weiterführenden Untersuchungen einverstanden waren. Bei der Auswahl der Studiengruppen gingen wir wie folgt vor:

- 1) Es wurden drei Studiengruppen anhand von Antworten aus dem Elternfragebogen definiert: a) Bauernkinder, b) Nicht-Bauernkinder mit regelmäßigem Stalltierkontakt und c) Nicht-Bauernkinder ohne regelmäßigen Stalltierkontakt. Die Definitionskriterien der einzelnen Gruppen sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1):

	Leben Sie auf einem Bauernhof? (Frage 36)	Hatte Ihr Kind Kontakt zu einem der folgenden Tiere? (Frage 30)	Wie häufig hielt sich Ihr Kind in den letzten Monaten in einem Tierstall auf? (Frage 33)
a) Bauernkinder	ja	ja (für Stalltiere*)	mindestens einmal/Woche
b) Nicht-Bauernkinder mit regelmäßigem Stalltierkontakt	nein	ja (für Stalltiere*)	mindestens einmal/Woche
c) Nicht-Bauernkinder ohne Stalltierkontakt (=Kontrollgruppe)	nein	nein (für Stalltiere*)	Weniger als einmal/Woche oder seltener

*Als Stalltiere wurden folgende Tiere definiert: Kühe/Rinder, Schweine, Schafe, Geflügel, Pferde, Ziegen

- 2) Alle Bauernkinder mit ausgefülltem Fragebogen und mindestens Einverständnis zur Blutentnahme wurden für Blutentnahmen rekrutiert. Eine Zufallsstichprobe von Nicht-Bauernkindern ohne regelmäßigen Stalltierkontakt, die sowohl mit Blutentnahme als auch Staubsammlung einverstanden waren, dienten als Kontrollgruppe und wurden nach Alter und Geschlecht gematcht. Die dritte Gruppe bestand aus Kindern, die zwar nicht auf dem Bauernhof leben, aber trotzdem regelmäßig Stalltierkontakt haben. In diese Gruppe wurden alle Kinder aufgenommen, die mit einer zusätzlichen Blutentnahme und mit der Staubsammlung einverstanden waren.

5.3 Fragebögen zur Gesundheit:

Der Fragebogen basiert auf einem international standardisierten Fragebogen der ISAAC-Studie (International Study of Asthma and Allergies in Childhood), der in Voruntersuchungen bereits erfolgreich zum Einsatz kam. Einige Fragen zum bäuerlichen Lebensstil wurden zusätzlich eingefügt.

Mit einer Anleitung zur richtigen Beantwortung der Fragen wurden insgesamt 53 Fragen gestellt (Anlage 2). Die Fragen betrafen folgende Punkte:

- 1) allgemeine Angaben zum Kind (Geschlecht, Staatsangehörigkeit, Geburtsort etc.)
- 2) Gesundheit des Kindes und der Familienmitglieder (v.a. bezüglich Asthma, Heuschnupfen und Neurodermitis)
- 3) die Lebenssituation (spezielle Fragen zum Leben auf dem Bauernhof und Tierhaltung etc.)
- 4) Ernährungsfragen und Milchkonsum (Verzehr von Lebensmitteln aus eigener Erzeugung, Milch aus dem Laden oder vom Hof etc.)
- 5) Weitere Angaben, z.B. zum Bildungsstand der Eltern

Am Ende des Fragebogens konnten noch Bemerkungen zum Fragebogen notiert werden. Um den Datenschutz zu wahren, wurden die Fragebögen anonym ausgefüllt und mit ID-Nummern gekennzeichnet. Lediglich die Einwilligungserklärungen für die Blutentnahme und für die Staubsammlung waren mit Namen und Adresse des Kindes versehen. Die Fragebögen wurden klassenweise an den Studienschulen verteilt und nach etwa 2-3 Wochen in verschlossenen Kuverts wieder eingesammelt und von der Studienärztin abgeholt. Die Einwilligungen wurden vom restlichen Fragebogen abgetrennt und gesondert aufbewahrt, so dass der Datenschutz gegenüber Dritten gewahrt werden konnte. Lediglich aufgrund der ID-Nummern, die sowohl auf der ersten Seite des Fragebogens als auch auf dem Einwilligungszettel aufgedruckt sind, kann die Zuordnung gewährleistet werden.

Durch eine Dateneingabefirma wurden alle Daten der Elternfragebögen in eine umfassende Datei für die statistischen Analysen eingegeben.

5.4 Fragebögen zur Ernährung:

Zur Erfassung der Ernährungsgewohnheiten der Kinder wurden standardisierte Ernährungsfragebögen (Anlage 3) verwendet. Dieser Fragebogen wurde vom Deutschen Institut für Ernährungsforschung (DIFE) in Potsdam-Rehbrücke entwickelt und bereits in der EPIC-Studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) eingesetzt und validiert (26, 27, 28). Dieser Fragebogen umfasst 158 Lebensmittel-Items. Durch 87 farbige Abbildungen von Portionsgrößen verschiedener Nahrungsmittel wird die Abschätzung der verzehrten Portionen erleichtert. Speziell für Kinder gibt es bisher keine entsprechenden Fragebögen.

Die Eltern erhielten vor der Staubsammlung den Fragebogen mit schriftlicher Anleitung zum korrekten Beantworten der Fragen zugeschickt. Beim Hausbesuch zur Staubsammlung wurden mit den Mitarbeitern der Studie unklare Fragen besprochen und die Fragebögen auf Vollständigkeit der Angaben überprüft, bevor sie eingesammelt wurden.

Die Fragebögen wurden per Post zu Prof. H. Boeing an das Deutsche Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke zur Eingabe versandt. Dort wurden die Fragebögen maschinell eingelesen und in einer Datei sowohl in einzelne Nahrungsmittel als auch in einzelne Nahrungsbestandteile (Fett, Eiweiß, etc.) aufgelistet.

5.5 Interview beim Hausbesuch

Neben der Staubsammlung füllten die Mitarbeiter bei den Hausbesuchen durch kurze Interviews die Zusatzfragebögen mit Fragen zum Impfstatus des Kindes, Stillen etc. (s. Anlage 4a) mit den Eltern aus. Dieser Zusatzfragebogen wurde bei allen Kindern ausgefüllt. Bei den Bauernfamilien wurde zusätzlich ein Kurzinterview über die Stalltiere (welche Tiere, wo werden sie gehalten zu den verschiedenen Jahreszeiten) und die Aufenthaltshäufigkeit des Kindes im Stall durchgeführt und dokumentiert (s. Anlage 4b).

5.6 Blutuntersuchungen:

Nach telefonischer Terminvereinbarung mit den jeweiligen Schulen und entsprechender Vorbereitung der Kinder wurden durch die Studienärztin je teilnehmenden Kind drei Blutröhrchen abgenommen: Ein Serumröhrchen (ca. 7 ml) für Allergietestungen, Heparinblut (ca. 4 ml) für Zytokinstimulationen und EDTA-Blut (ca. 2,7 ml) für Differentialblutbild sowie DNA-Extraktionen. Zur Blutabnahme wurden Butterflys (21G) sowie Blutröhrchen der Firma Sarstedt (S-Monovetten) verwendet. Jedes Kind erhielt als Dankeschön wahlweise eine Frisbeescheibe oder ein kleines Geschicklichkeitsspiel. Die Erst- und Zweitklässler erhielten zusätzlich eine „Tapferkeitsurkunde“.

Die Heparin- und Serumröhrchen wurden gekühlt und das EDTA-Blut bei Raumtemperatur transportiert. Die Blutröhrchen wurden noch innerhalb weniger Stunden nach Abnahme (<5std) für die verschiedenen Untersuchungen im Labor bearbeitet. Hierzu waren folgende Arbeitsschritte nötig:

- A) Das Serum wurde abzentrifugiert und in drei Portionen (jeweils 1 ml) bei mindestens –20Grad Celsius eingefroren. Für eine zweifelsfreie Zuordnung wurden alle Portionen mit den jeweiligen ID-Nummern der Teilnehmer gekennzeichnet. Eine Serumportion von allen Studienkindern wurde für eine RAST-Testung in das Allergielabor von Prof. Wahn (Universitätskinderklinik Charité, Berlin) verschickt. Es wurden das Gesamt-IgE, RAST auf Kuhepithel und die Screeningtests SX1 für Inhalationsallergene sowie FX5 für Nahrungsmittelallergene (Pharmacia and Upjohn Diagnostics, Freiburg, BRD) durchgeführt. Bei einem positiven SX1-Test wurde zusätzlich das spezifische IgE für Gräser (Lol 5), Birke

(Bet v1), Milbenallergene (Der p1 und Der f1) und Katzenhaare (Fel d1) bestimmt. Bei einem positiven FX5-Test wurde das spezifische IgE für Hühnereiweiß und Kuhmilch gemessen.

B) Für die Zytokinstimulation wurden pro Studienkind 4 sterile Röhrchen mit Stimulantien und Kontrollmedien vorbereitet. Die Röhrchen bezogen wir aus dem Labor von Herrn Dr. Hartung vom Institut für Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz. Alle 4 Röhrchen enthielten ein Kontrollmedium (4 ml RPMI 1640 + 100 mg Streptomycin von Biowhittaker, Deutschland), wobei in ein Röhrchen LPS vom *Salmonella abortus equi* (10 µg/ml) und in ein Röhrchen SEB (1 µg/ml von Sigma, Deisenhofen/Deutschland) zugesetzt wurde. In die 4 Röhrchen wurden jeweils 1 ml Heparinblut pipettiert und im Anschluss in einem Brutschrank, der ein Gasgemisch mit 5% CO enthielt, bei 37 Grad Celsius stimuliert. Das LPS-haltige Röhrchen + 1 Kontrollmedium wurden für 24 Stunden und das SEB-haltige Röhrchen + Kontrollmedium wurden für 72 Stunden inkubiert. Diese verschiedenen Inkubationszeiten wurden als die optimale Stimulationszeit in zuvor durchgeführten Testdurchläufen im Labor von Professor Renz (Universitätskinderklinik Charité, Berlin) geprüft. Nach der Inkubationszeit wurden die Röhrchen für 2 Minuten zentrifugiert und in 5 kleinen Portionen von mindestens 600 µl bei -80 Grad Celsius eingefroren. In den stimulierten Proben wurden die Zytokine INF γ , IL5, IL10, IL12 und TNF- α im Labor von Prof. Dr. H. Renz (Universitätskinderklinik Charité, Berlin) gemessen. Die Messungen erfolgten mittels ELISA, wobei handelsübliche Kits von der Firma BD Pharmingen/Deutschland und Mäuseantikörper gegen menschliches IFN- γ verwendet wurden.

C) Vom EDTA-Blut wurde zunächst ein Differentialblutbild bestimmt. Nach Zentrifugation der Röhrchen wurde das abzentrifugierte Plasma in verschließbare Gefäße abpipettiert und bei -80 Grad Celsius eingefroren. Der Zellüberstand in den Röhrchen wurde mehrfach gewaschen und die Zellen in Plastikgefäßen aufbewahrt. Nach einer Lagerzeit von etwa 4 Monaten wurde freie DNA aus den Zellen gewonnen und diese wiederum gekühlt aufbewahrt.

5.7 Staubsammlung:

Durch drei Mitarbeiter wurden die Familien nach telefonischer Terminabsprache für die Staubsammlung besucht. Die Familien wurden angehalten, mindestens 3 Tage vor der Staubsammlung nicht die Böden zu putzen und die Betten nicht frisch zu beziehen.

Um die Sammelbedingungen und -methoden bei allen Mitarbeitern so gleich wie möglich zu halten, wurde ein Staubnahmeprotokoll (Anlage 5) erstellt, das u.a. die genaue Staubsammelzeit,

Staubsaugerleistung und detailliertes Vorgehen dokumentierte. Bei einem Treffen aller Mitarbeiter wurde die praktische Durchführung des Protokolls besprochen und auch durchgetestet. Jede Staubsammlung wurde genau protokolliert.

Es wurden Staubproben von der Matratze des Kindes und vom Wohnraum, in dem sich das Kind vorwiegend aufhält, gewonnen. Hierzu wurde eine genau definierte Fläche für eine bestimmte Zeit gesaugt. Alle Mitarbeiter benutzten die gleichen Geräte für die Staubsammlungen. Die Staubsauger von der Firma Miele (Typ S624) wurden einheitlich auf eine maximale Motorleistung von 1600 Watt (=721/sec Saugluftmenge) eingestellt. An dem Staubsaugerrohr wurden Filterhalter mit einem auswechselbaren Filter angesteckt, so dass der gesamte Staub, der angesaugt wurde, im eingelegten Filter hängen blieb. Der Staub auf dem Filter wurde anschließend gewogen und in zwei sterile Eppendorfgläser abgefüllt. Je eine Portion wurde bei Raumtemperatur für die Endotoxinmessung (mind. 100 mg Feinstaub) und die andere Portion bei mindestens -20 Grad für die Allergenmessung (mind. 200 mg) aufbewahrt.

Die Endotoxinmessungen wurden im Institut für Umwelt- und Arbeitsmedizin der LMU München mittels des Limulus-Amoebocyten-Lysat-Tests (LAL-Assay, s.a. Punkt 3.) durchgeführt.

Die Allergenmessungen fanden im Labor von Prof. Wahn (Universitätskinderklinik Charité, Berlin) statt. Die Bestimmung der Allergenkonzentrationen erfolgte mittels Verwendung monoklonaler Antikörper gegen Milbenallergene (Der p1 und Der f1) und Katzenallergen (Fel d1).

5.8 Milchsammlung:

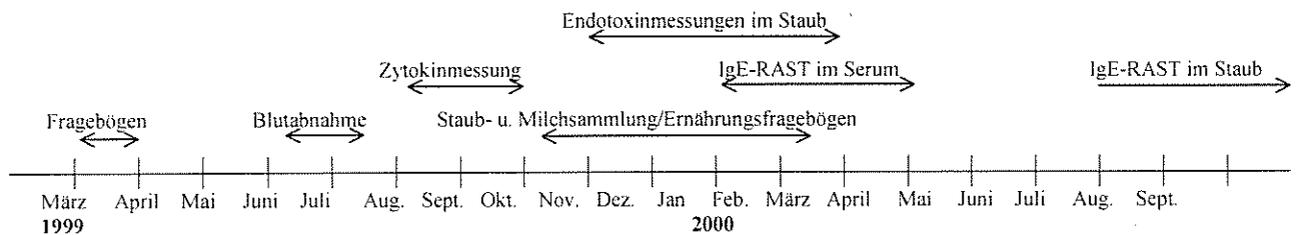
Bei den Bauern, die zusätzlich zur Staubsammlung mit einer Milchsammlung einverstanden waren, wurden Milchproben abgenommen. Hierzu wurde ebenfalls ein Protokoll für die Mitarbeiter verfasst (Anlage 6). Es wurde genau vermerkt, ob die Milch steril/unsteril und aus welchem Gefäß sie gewonnen werden konnte. Insgesamt wurden mit einer sterilen Pipette 4x50ml Milch pro Bauernfamilie gesammelt und bei -80 Grad Celsius eingefroren.

5.9. Zeitlicher Ablauf der Studie:

In den Schulen wurden im Frühjahr 1999 die Fragebögen zur Erfassung der Gesundheit und Lebensweise des Kindes ausgeteilt. Nach Durchsicht der Einwilligungserklärungen wurden bei den Kindern in den Monaten Juni/Juli 1999 während der Schulzeit Blutentnahmen durchgeführt. Zum Schluss wurden die Familien nach telefonischer Rücksprache zur Staubsammlung zu Hause besucht. Diese Besuche fanden zwischen Oktober 1999 und Februar 2000 statt. In diesem Rahmen

erhielten die Eltern außerdem Fragebögen zu Ernährungsgewohnheiten ihres Kindes zugeschickt, die bei den Hausbesuchen eingesammelt wurden. Bei einigen Bauernfamilien wurden zusätzlich zu den Staubproben Milchproben eingesammelt. Die Zeiträume der Untersuchungen sind in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2): Zeitlicher Ablauf der Studie



5. 10. Statistische Auswertung:

Für die Auswertung der in der ALEX-Studie gewonnenen Daten wurden die bayerischen Daten mit denen, welche in Österreich und der Schweiz mit dem gleichen Instrumentarium erhoben wurden, kombiniert. Anschließend erfolgten deskriptive Analysen unter Verwendung von χ^2 -test und Fisher's Exakt Test abhängig von der Verteilung der Daten.

Nach logarithmischer Umrechnung (\log_{10}) der Endotoxinwerte wurden mittels des PC-Programms SAS multivariate logistische Regressionsanalysen unter Verwendung der Endotoxinkonzentration als stetiger Variablen durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte eine Adjustierung der Werte für Alter, Geschlecht, Studiengebiet, Familienanamnese, Asthma und Heuschnupfen, Bildungsstand der Eltern und Anzahl der älteren Geschwister (Ausgangsmodell). Zusätzlich wurden weitere potenzielle Störvariablen, d.h. „Bauernstatus“, „erstes Lebensjahr Exposition zu Stall und Rohmilch“, „Kontakt zu Hunden oder Katzen während des ersten Lebensjahres“ und die Allergenkonzentrationen (Der f1, Der p1 und Fel d1, ebenfalls logarithmisch umgerechnet) evaluiert. Ferner wurde ein Interaktionsfaktor getestet, um feststellen zu können, ob sich der Effekt der Endotoxinexposition bei Kindern mit bzw. ohne atopischer Sensibilisierung ($\text{RAST} \geq 0,35 \text{ kU/L}$) unterscheidet.

Um mögliche Schwellenwerte oder andere Nicht-Linearitäten in der Expositionsantwort auswerten zu können, wurden mittels S-Plus-Programms nicht-parametrische Glättungen vorgenommen und für jedes Modell die Glättungskonstante durch das Akaike Informations-Kriterium bestimmt. Auf die gleiche Weise wurde auch die Beziehung zwischen dem Endotoxinniveau und der Zytokinantwort ermittelt. Anschließend erfolgte die logarithmische Umrechnung der Zytokinmesswerte und die Assoziation zu den Endotoxinwerten wurde über den Bereich der 25. - 75. Perzentile der Endotoxin-Exposition ausgewertet.

Danach erfolgte eine Wiederholung der Regressionsanalysen mittels begrenzter Stichprobe von Nicht-Bauernkindern und Adjustierung für bekannte Allergie vermeidende Maßnahmen (Weggabe von Haustieren und Entfernung des Teppichs aufgrund von Allergien in der Familie), Kontakt zu Hunden oder Katzen während des ersten Lebensjahres, Aufenthalt in Ställen während des ersten Lebensjahres und der Konsum von Frischmilch während des ersten Lebensjahres.

6 Resultate:

6.1 Studienbeteiligung (Responseraten):

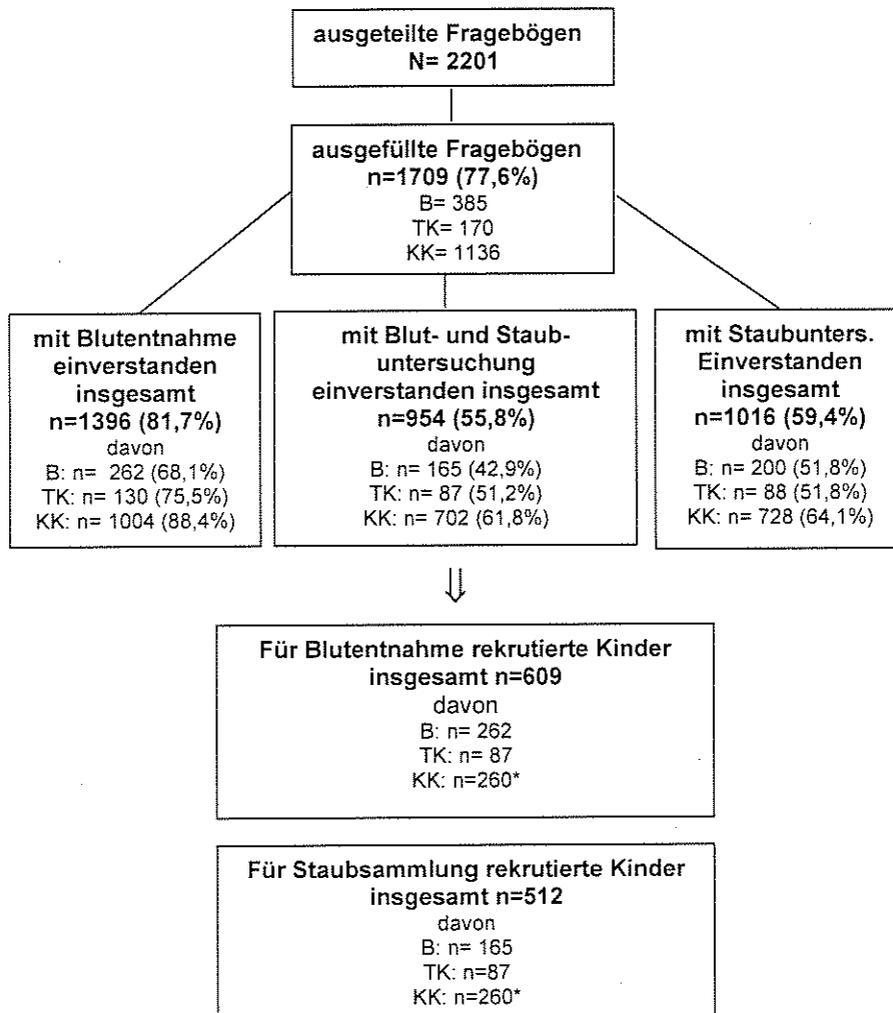
Insgesamt wurden 2201 Fragebögen an 11 Grund- und Teilhauptschulen im Ostallgäu verteilt und 1709 ausgefüllte Fragebögen wieder eingesammelt. Dies entspricht einer Responserate von 77,6%. Einverstanden mit der Blutentnahme waren 1396 Kinder (81,7%), mit der Staubsammlung 1016 Kinder (59,4%). Für 954 Kinder (55,8%) erhielten wir die Zusage für Blut- und Staubuntersuchung. Die Responseraten sind in Abbildung 3 dargestellt.

Für die Blutuntersuchungen wurden 609 Kinder per Zufallsstichprobe rekrutiert. Eine Blutentnahme erfolgte bei den 262 Bauernkindern, die mit einer Blutentnahme einverstanden waren, bei 87 Nicht-Bauernkindern mit regelmäßigem Stalltierkontakt und 260 Nicht-Bauernkindern ohne regelmäßigen Stalltierkontakt (=Kontrollgruppe), die mit Blut- und Staubuntersuchungen einverstanden waren. Von den ursprünglich 262 Bauernkindern, die mit der Blutentnahme einverstanden waren, gaben nur 165 Kinder auch für die Staubsammlung ihr Einverständnis. Dadurch wurde bei insgesamt 512 Kindern eine Staubsammlung geplant. Tatsächlich wurden bei 489 Kindern Staubproben entnommen, da 23 Kinder wegen Umzug (n=5) nicht mehr erreichbar waren oder die weitere Teilnahme ablehnten (n=18).

Es wurden 489 Ernährungsfragebögen verschickt und bei 100 Bauernfamilien Milch vom Hof abgenommen.

Abbildung 3: Studienteilnahme

(B=Bauernkinder, TK=Nichtbauern mit regelmäßigem Stalltierkontakt, KK=Nichtbauern ohne regelm. Stalltierkontakt)



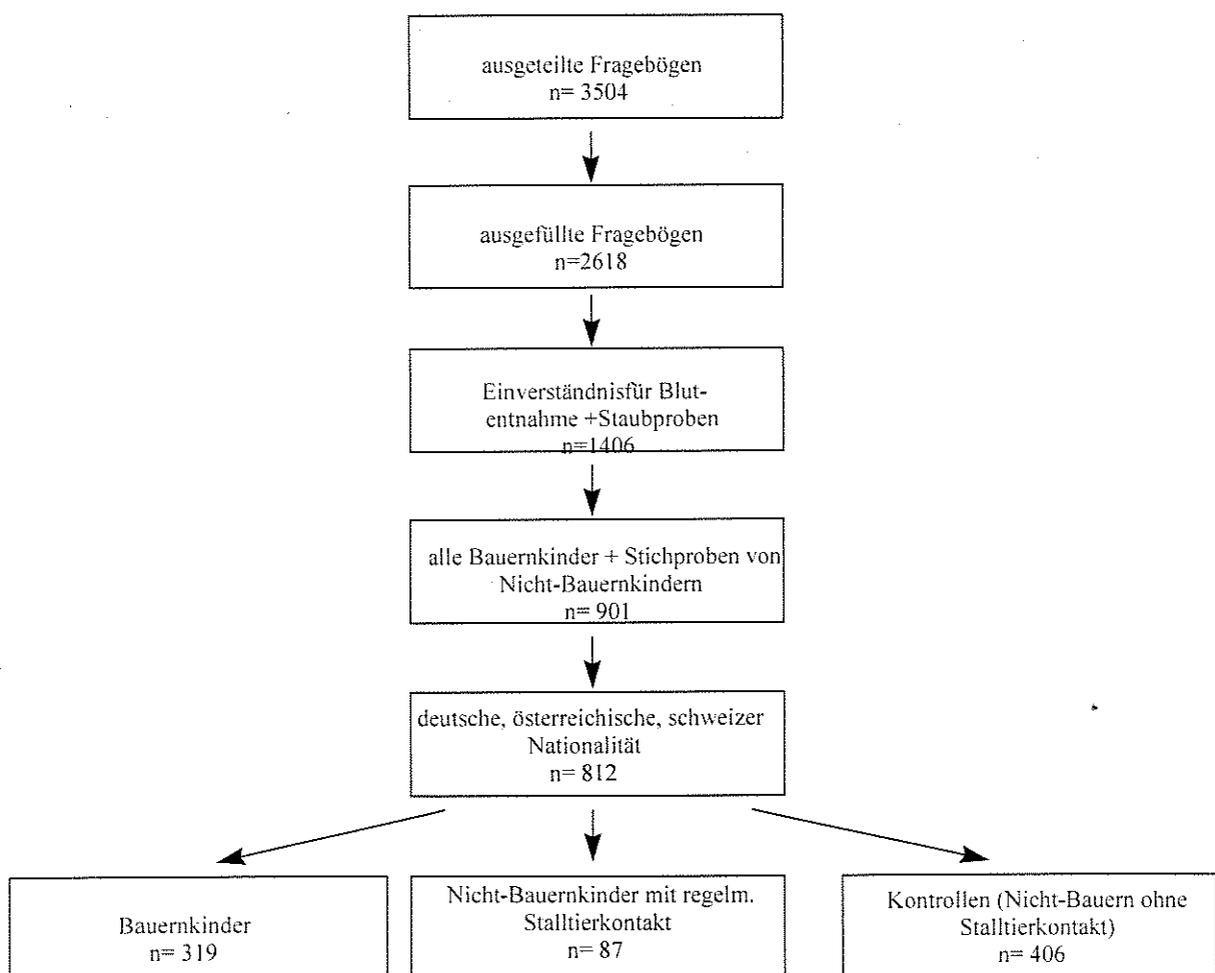
*=Zufallstichprobe von Kindern, die mit Blut- und Staubuntersuchung einverstanden waren

6.2 Studienbeteiligung (Responseraten) im gesamten multizentrischen Datensatz:

Insgesamt wurden die Eltern von 3504 Schulkindern der Klassen 1 - 6 in den 3 Studienregionen angesprochen. 2618 (75%) dieser Eltern beteiligten sich an der Befragung und wurden daraufhin gebeten, ihr Einverständnis zu weiteren Untersuchungen zu geben, welche die Messung von spezifischem IgE (RAST) im Serum und die Sammlung von Staubproben beinhaltete. 1406 (54%) von diesen 2618 Familien erteilten dazu ihre Erlaubnis. Aus dieser Gruppe wurden alle Kinder von Bauernfamilien und zufällige Stichproben von Nicht-Bauernkindern aus derselben ländlichen Gegend eingeladen, an der Studie teilzunehmen (n=901). Schließlich beschränkten wir unsere Analysen auf in Österreich, Deutschland oder der Schweiz geborene Kinder, deren Eltern Staatsbürger einer dieser Nationen waren, um ethnische Störfaktoren zu vermeiden (n=812).

Vollständige Daten waren von 812 Kindern vorhanden. Davon kamen 319 Kinder von einem Bauernhof und 493 Kindern aus Nicht-Bauernfamilien. 87 der 493 Nicht-Bauernkinder hatten regelmäßigen Stalltierkontakt. Zu den Bauernkindern wurden gleich viele „Kontroll-Kinder“ ohne Stalltierkontakt ausgewählt, die gleiches Alter und Geschlecht hatten. Das Durchschnittsalter betrug $9,46 \pm 1,16$ (SD) Jahre. Die adjustierten odds ratios für Asthma- und Heuschnupfensymptome in Bezug auf den Bauernstatus unterschieden sich nicht signifikant von der Untergruppe der 812 Kinder mit vollständigen Daten und Zustimmung für weitere Untersuchungen und denen, die nur den Fragebogen beantworteten (0,59 vs. 0,48; und 0,44 vs. 0,32). Die im Text beschriebenen Responseraten der Studienteilnahme sind zusätzlich in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

Abbildung 4): Studienbeteiligung/Responseraten



6.3 Prävalenzunterschiede in Bayern

Bei der Auswertung der bayerischen Daten aus dem Elternfragebogen konnten deutliche Prävalenzunterschiede zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkindern festgestellt werden. Laut Elternangaben wurde bei 8,6% der Nicht-Bauernkinder und bei 3,8% der Bauernkinder jemals die Arzt diagnose Asthma gestellt. An Heuschnupfen litten 8,8% der Nicht-Bauernkinder gegenüber nur 2,9% der Bauernkinder. Weniger deutlich war der Unterschied bei Neurodermitis: Eltern von 17,7% der Nicht-Bauernkinder und 15,5% der Bauernkinder gaben an, dass ihr Kind jemals an Neurodermitis litt.

Auch im Blut konnten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Populationen festgestellt werden. Die spezifischen Allergietests im Serum waren bei Nicht-Bauernkindern deutlich häufiger positiv (= RAST-Klasse >2) als bei Bauernkindern. Im SX1-Screeningtest hatten 22,3% der Nicht-Bauernkinder und 12,3% der Bauernkinder einen positiven RAST ($p < 0.05$). Bei dem FX5-Screeningtest konnte ein positives RAST-Ergebnis bei 4,2% der Nicht-Bauernkinder und 1,2% der Bauernkinder ($p < 0.05$) gemessen werden. Diese Unterschiede zwischen den beiden Populationen sind deutlich signifikant. Dies bestätigte sich auch in dem Kombinationstest von Gras/Birke/Katze, bei der 23,2% der Nicht-Bauernkinder gegenüber 15,2 Bauernkindern eine positive RAST-Klasse hatten ($p < 0.05$). Positiv auf Milbe reagierten 12,7% der Nicht-Bauernkinder und 11,9% der Bauernkinder. Bei der Vorratsmilbe hatten 2% Nicht-Bauernkinder und 2,5% der Bauernkinder eine positive Reaktion. Auf Rinderallergen reagierten 2,8% der Nicht-Bauernkinder und 3,3% der Bauernkinder positiv.

6.4 Prävalenzunterschiede in den 3 Regionen

Im Gesamtkollektiv aus allen drei Ländern ergaben sich die nachfolgend dargestellten ausgeprägten Prävalenzunterschiede zwischen Kindern, die auf einem Bauernhof aufgewachsen waren, und Kindern, die nicht von einem Bauernhof stammten.

Abbildung 5): Studienbeteiligung/Responseraten

Atopische Zielparameter	Bauernkinder		Nicht-Bauernkinder		Odds Ratio	95% KI
	%	n / N	%	n / N		
Heuschnupfen	4,1	13/319	10,6	52/489	0,357	0,191-0,667
Juckende und tränende Augen im letzten Jahr	6,0	19/317	12,8	62/483	0,432	0,254-0,739
Atopische Sensibilisierung	17,2	55/319	23,5	116/493	0,677	0,474-0,968
Atopisches Asthma	3,8	10/262	7,2	29/402	0,510	0,244-1,066
Nicht-Atopisches Asthma	1,9	5/262	3,2	13/402	0,582	0,205-1,653
Atopisches Giemen	4,7	15/317	6,0	29/482	0,776	0,409-1,472
Nicht-Atopisches Giemen	1,6	5/317	6,2	30/482	0,242	0,093-0,629

6.5 Lebensstilfaktoren der untersuchten Populationen

Nachfolgend ist eine Auflistung der charakteristischen Lebensstilfaktoren der untersuchten Populationen zu ersehen. Insgesamt finden sich auch bei den Nicht-Bauernkindern längere Aufenthalte im Stall und Rohmilchkonsum.

	Bauern (N=319)	Nicht-Bauern (N=493)
Zum ersten Mal im Stall		
im 1. Lebensjahr	63,0%	15,7%
zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr	29,5%	30,3%
Zeitdauer des Stallaufenthalts im 1. Lebensjahr		
keine	37,0%	84,3%
1-10 min/Tag	9,4%	7,9%
11- 20 min/ Tag	15,4%	3,9%
21- 60 min/ Tag	26,3%	3,2%
mehr als 60 min/ Tag	11,9%	0,8%
Mütterliche Tätigkeit auf dem Hof während der Schwangerschaft		
keine	17,6%	---
weniger als einmal/Woche	9,7%	---
1-6 mal/Woche	16,7%	---
täglich	20,1%	---
mehr als einmal / Tag	35,9%	---
Konsum von Bauernmilch		
im 1. Lebensjahr	81,5%	34,7%
Konsum der Bauernmilch durch die Schwangere	80,1%	32,6%

6.6 Rolle der Stallexposition und des Bauernmilchkonsums im 1. Lebensjahr.

In der nachfolgenden Tabelle 2 ist die Auswirkung von Stallkontakt und Rohmilchkonsum im 1. Lebensjahr auf die Häufigkeit und das Risiko von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung dargestellt. Ein stark protektiver Effekt gegenüber der Entwicklung von Asthma, Heuschnupfen und atopischer Sensibilisierung konnte nur bei Kindern gefunden werden, die im 1. Lebensjahr gegenüber Ställen, Bauernmilch oder beidem ausgesetzt waren. Diese protektiven Faktoren scheinen sich in ihren schützenden Eigenschaften zu addieren, da die niedrigsten Krankheitshäufigkeiten bei den Kindern zu finden waren, die in ihrem 1. Lebensjahr beiden Faktoren ausgesetzt waren.

Tabelle 2): Häufigkeit und Risiko (adjustierte* Odds Ratios, 95% KI) für Asthma, Heuschnupfen und atopische Sensibilisierung in Abhängigkeit von der Exposition gegenüber Ställen und dem Bauernmilchkonsum im 1. Lebensjahr.

	Stallkontakt und Milch im 1. Lebensjahr (n=218)	Stallkontakt, aber keine Milch im 1. Lebensjahr (n=48)	Milch, aber keinen Stallkontakt im 1. Lebensjahr (n=189)	Stallkontakt, Milch, oder beides nach dem 1. Lebensjahr (n=138)	Weder Stallkontakt noch Milchexposition
Diagnose Asthma	1,4 % 0,14 (0,04-0,48)	6,3 % 0,51 (0,14-1,86)	5,8 % 0,48 (0,21-1,1)	10,9 % 0,88 (0,42-1,86)	11,8 % Referenz
Mindestens 1 Anfall von Giemen in den letzten 12 Monaten	2,8 % 0,17 (0,07-0,45)	6,4 % 0,43 (0,12-1,52)	6,5 % 0,43 (0,20-0,92)	8,8 % 0,60 (0,28-1,28)	14,8 % Referenz
Heuschnupfen	3,2 % 0,20 (0,08-0,50)	4,2 % 0,25 (0,05-1,13)	4,2 % 0,24 (0,10-0,56)	13,1 % 0,88 (0,44-1,74)	16,0 % Referenz
laufende Nase und juckende Augen in den letzten 12 Monaten	5,1 % 0,27 (0,13-0,57)	8,3 % 0,44 (0,14-1,37)	7,5 % 0,42 (0,21-0,86)	11,8 % 0,65 (0,33-1,30)	19,8 % Referenz
Atopische Sensibilisierung	12,4 % 0,32 (0,17-0,62)	20,8 % 0,56 (0,25-1,27)	15,3 % 0,43 (0,24-0,77)	29,0 % 0,99 (0,58-1,69)	32,9 % Referenz

*Adjustiert für Alter, Geschlecht, Bildungsstand der Eltern, Familienanamnese von Asthma und Heuschnupfen, Anzahl der älteren Geschwister und Bauernstatus. Als atopische Sensibilisierung wurde definiert: Jede Reaktion auf ein inhalatives Allergen (Hausstaub- und Vorratsmilben, Katzenhaare, Grass- und Birkenpollen, Kuhepithel) von $\geq 3,5$ kU/L.

Die Rolle der Exposition der schwangeren Mutter wurde ferner bei den Kindern mit frühkindlicher Exposition im ersten Lebensjahr untersucht. Wenn alle drei Expositionsfaktoren

- Stallaufenthalt im 1. Lebensjahr,
- Rohmilchkonsum im 1. Lebensjahr und
- Stallexposition der Mutter während der Schwangerschaft

zusammen kamen, hatte kaum noch ein Kind im Schulalter Asthma bronchiale oder Heuschnupfen.

Tabelle 3): Prävalenzen (in %) und Risiko (adj. OR +95% KI) für Asthma, Heuschnupfen und atopische Dermatitis in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Aufenthalts der schwangeren Mutter auf dem Hof und Exposition der Bauernkinder gegenüber Stall und Bauernmilchkonsum im ersten Lebensjahr.

	schwängere Mutter tätig auf dem Bauernhof tätig (n=119)	schwängere Mutter nicht tätig auf dem Bauernhof tätig (n=58)	schwängere Mutter nicht täglich auf dem Bauernhof tätig und keine Exposition des Kindes gegenüber Stall und Bauernmilch im 1.Lj. (n=28)
Diagnose Asthma	0,0% -----	1,7% 0,02 (0,001-0,47)	14,3% Referenz
mindestens 1 Anfall von Giemen in den letzten 12 Monaten	0,9% 0,04 (0,001-,30)	3,5% 0,17 (0,01-2,51)	7,1% Referenz
Heuschnupfen	0,8% 0,07 (0,005-0,91)	6,9% 0,43 (0,06-2,87)	10,7% Referenz
laufende Nase und juckende Augen in den letzten 12 Monaten	0,8% 0,04 (0,003-0,53)	12,3% 0,61 (0,13-2,87)	14,3% Referenz
Atopische Sensibilisierung*	8,4% 0,18 (0,06-0,56)	19,0% 0,36 (0,12-1,08)	39,3% Referenz

Eine über das erste Lebensjahr hinausgehende Stallexposition erbrachte für die Atopie und den Heuschnupfen einen weiteren protektiven Effekt.

Tabelle 4): Prävalenz (in %) und Risiko (adjustierte Odds Ratios + 95% KI) für Asthma, Heuschnupfen und atopische Sensibilisierung in Abhängigkeit von der Dosis und Dauer der Stallexposition

	Überdurchschnittliche ^a Exposition im 1. Lebensjahr (n=133)	Unterdurchschnittliche ^b Exposition im 1. Lebensjahr (n=131)	Starke – starke ^c Exposition im 1. und 2. – 5. Lebensjahr (n=122)	Starke – schwache ^d Exposition im 1. und 2. – 5. Lebensjahr (n=43)	Schwache –schwache ^e Disposition im 1. und 2.- 5. Lebensjahr (n=88)	Keine Stallexposition in den ersten 5 Lebensjahren (n=267)
Diagnose Asthma	2,3 % 0,39 (0,08-1,81)	2,3 % 0,29 (0,08-1,10)	0,8 % 0,09 (0,01-0,75)	0,0 % -----	3,4 % 0,32 (0,09-1,16)	9,4 % Referenz
mindestens 1 Anfall von Gleimen in den letzten 12 Monaten	3,1 % 0,88 (0,22-3,51)	3,8 % 0,54 (0,19-1,53)	1,7 % 0,22 (0,04-1,05)	0,0 % -----	5,7 % 0,52 (0,19-1,43)	12,1 % Referenz
Heuschnupfen	0,8 % 0,05 (0,01-0,46)	6,2 % 0,52 (0,19-1,45)	0,8 % 0,09 (0,01-0,74)	2,3 % 0,31 (0,04-2,60)	8,0 % 0,88 (0,35-2,21)	11,3 % Referenz
laufende Nase und juckende Augen in den letzten 12 Monaten	2,3 % 0,13 (0,03-0,56)	9,2 % 0,72 (0,31-1,68)	1,7 % 0,12 (0,03 – 0,59)	4,8 % 0,46 (0,09-2,27)	11,4 % 1,06 (0,47-2,39)	14,4 % Referenz
Atopische Sensibilisierung *	8,2 % 0,28 (0,12-0,66)	19,7 % 0,79 (0,43-1,48)	8,2 % 0,23 (0,10-0,53)	11,6 % 0,37 (0,12-1,08)	23,9 % 0,93 (0,50-1,73)	26,6 % Referenz

*definiert als Reaktion auf ein inhalatives Allergen (Hausstaub- und Vorratmilben, Katzenhaare, Gras- und Birkenpollen, Kuhepithel) von ≥ 3.5 kU/l
a über dem Median liegende Gesamtdauer des Stallaufenthalts im 1. Lebensjahr

b unter dem Median liegende Gesamtdauer des Stallaufenthalts im 1. Lebensjahr

c über dem Median liegende Gesamtdauer des Stallaufenthalts im 1. und 2. Lebensjahr der ersten 5 Lebensjahre

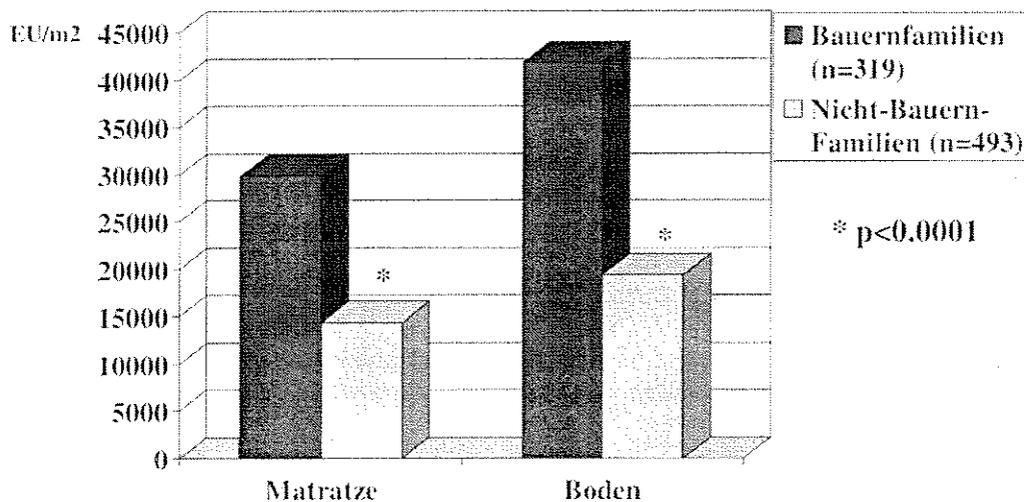
d unter dem Median liegende Gesamtdauer des Stallaufenthalts im 1. Lebensjahr und über dem Median der Gesamtdauer des Stallaufenthalts im 2. – 5. Lebensjahr

e unter dem Median liegende Gesamtdauer des Stallaufenthalts im 1. und 2. Lebensjahr der ersten 5 Lebensjahre

6.7 Endotoxinwerte bei Bauern- und anderen Kindern

In der nachfolgenden Abbildung sind die Endotoxinwerte des Staubs der Matratze und des Bodens von Bauern- und Nicht-Bauern-Familien dargestellt. Man sieht eindrücklich die signifikant höhere Endotoxinbelastung bei den Bauernfamilien im Vergleich zu den Nicht-Bauernfamilien.

Endotoxinwerte (EU/m²) in der Matratze von Bauern- und Nicht-Bauern-Familien



6.8 Auswirkung der Endotoxinexposition auf die Gesundheit

Die Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalysen, welche die Auswirkung der Endotoxinkonzentration im Matratzenstaub (EU/mg Staub) auf das Auftreten von Krankheitssymptomen und Krankheitshäufigkeit untersuchen, sind in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellt. Die adjustierten Odds Ratios sind für eine Endotoxinzunahme von der 25. bis zur 75. Perzentile berechnet. Die Modelle wurden für Alter, Geschlecht, Studienregion, Familienanamnese Asthma und Heuschnupfen, Bildungsstand der Eltern und Zahl der älteren Geschwister adjustiert. Die Höhe der Endotoxinexposition zeigte eine starke, inverse Assoziation mit atopischem Asthma, Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen und atopischer Sensibilisierung.

Tabelle 5):

*p<=0,05	Gesamtzahl Kinder (n= 821)		Nicht-Bauernkinder (n=493)	
Atopische Zielparameter	Endotoxin-Konzentration EU/mg	Endotoxinbelastung EU/m ²	Endotoxin-Konzentration EU/mg	Endotoxinbelastung EU/m ²
	OR (95% KI)	OR (95% KI)	OR (95% KI)	OR (95% KI)
Heuschnupfen	0,58 (0,39-0,85)*	0,53 (0,35-0,81)*	0,79 (0,52-1,19)	0,56 (0,33-0,95)*
Juckende und tränende Augen im letzten Jahr	0,61 (0,43-0,86)*	0,50 (0,34-0,72)*	0,70 (0,47-1,05)	0,46 (0,28-0,76)
Atopische Sensibilisierung (SX1>3,5 kU/L)	0,78 (0,60-1,01)	0,76 (0,58-0,98)*	0,80 (0,59-1,08)	0,73 (0,51-1,04)
Atopisches Asthma	0,73 (0,44-1,19)	0,48 (0,28-0,81)*	0,68 (0,39-1,19)	0,52 (0,25-1,07)
Nicht-atopisches Asthma	1,25 (0,62-2,51)	1,13 (0,57-2,26)	1,29 (0,62-2,68)	1,00 (0,46-2,21)
Atopisches Giemen	0,89 (0,57-1,39)	0,62 (0,39-0,99)*	0,79 (0,46-1,33)	0,64 (0,33-1,25)
Nicht-atopisches Giemen	0,97 (0,58-1,61)	1,14 (0,68-1,90)	1,36 (0,86-2,14)	1,82 (1,04-3,18)*

In den nachfolgenden Abbildungen sind die geglätteten Graphen der adjustierten Prävalenz von Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen, atopischer Sensibilisierung, atopischem Asthma, nicht-atopischem Asthma, atopischem Giemen und nicht-atopischem Giemen versus Höhe der Endotoxinexposition dargestellt. Die Prävalenz von Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen, atopischer Sensibilisierung, atopischem Asthma und atopischem Giemen zeigte eine monotone Abnahme mit steigender Endotoxinbelastung. Hingegen nahm mit steigender Endotoxinbelastung die Prävalenz für nicht-atopisches Asthma und nicht-atopisches Giemen zu.

Abbildung 7 a): Prävalenz Heuschnupfen versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

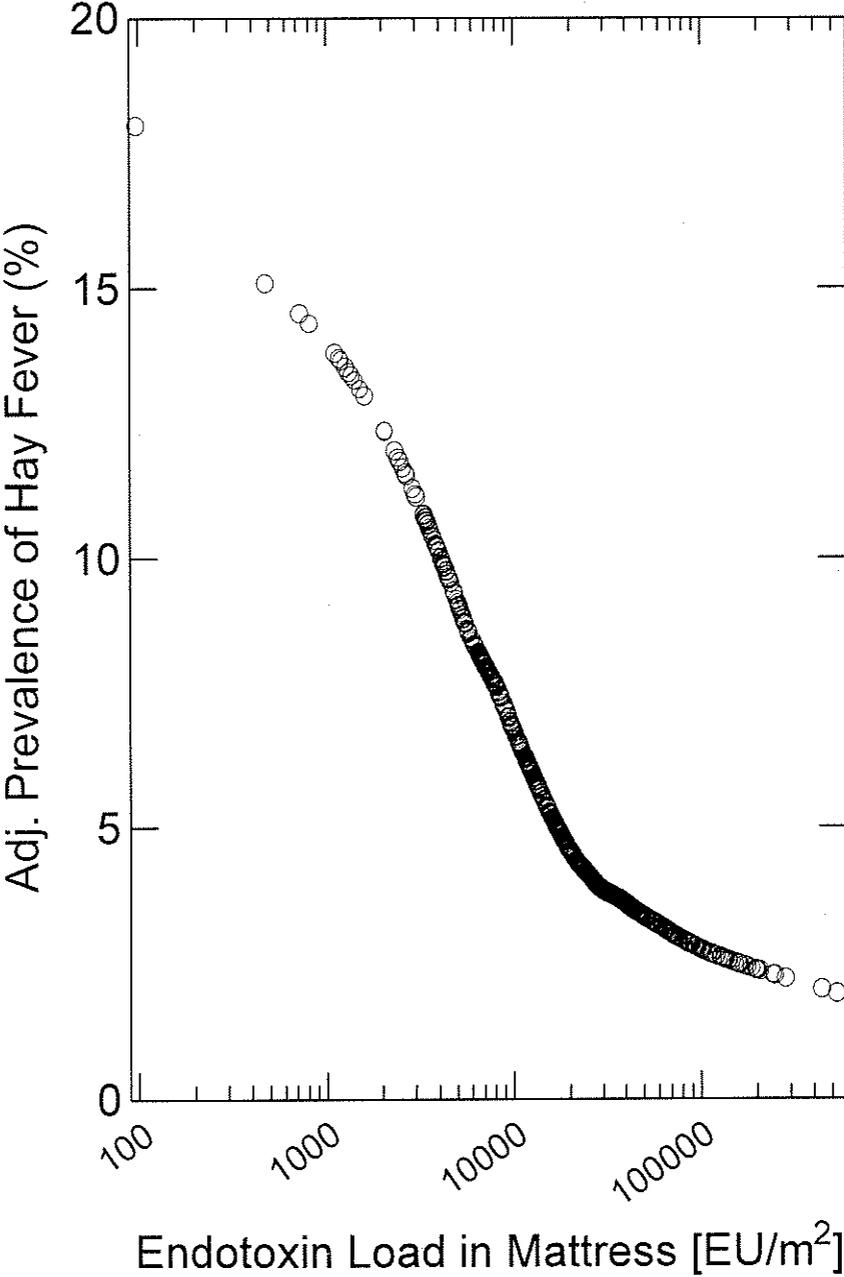


Abbildung 7 b): Heuschnupfensymptome versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

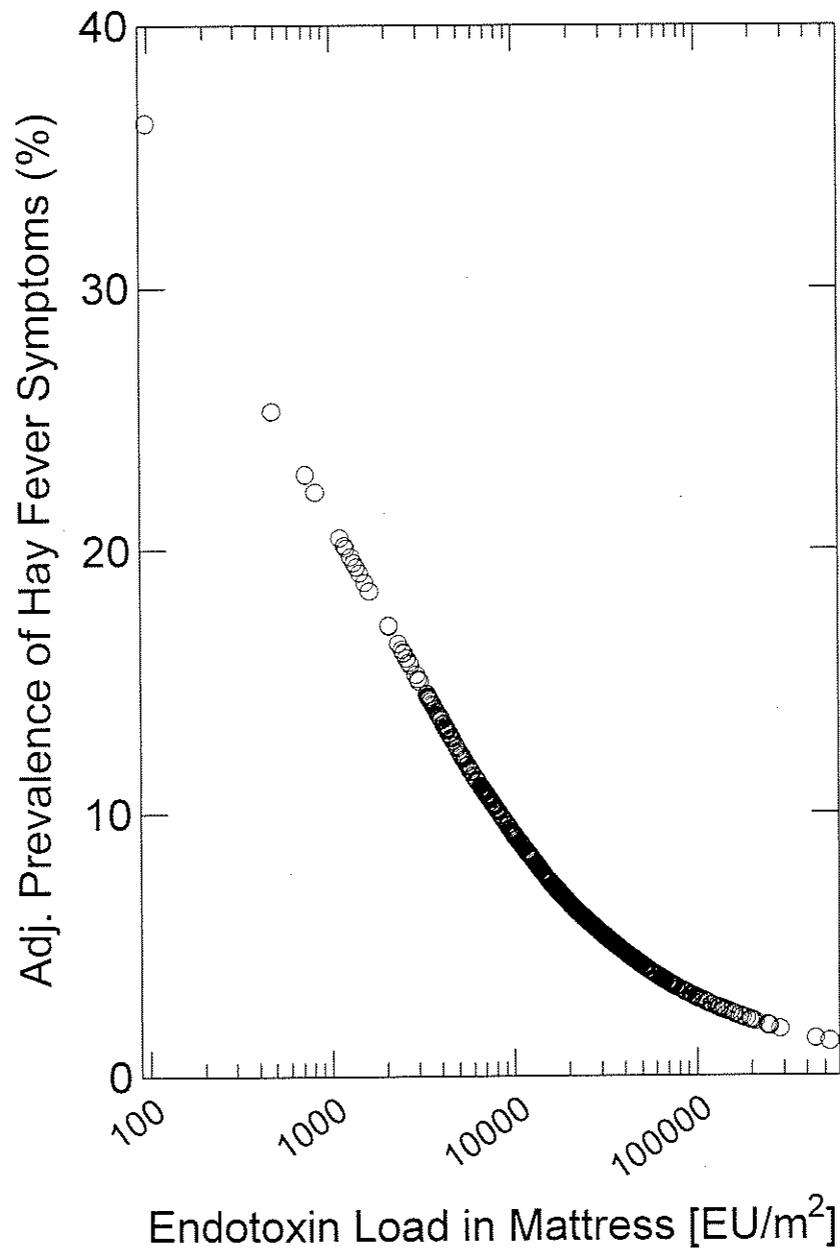


Abbildung 7 c): Atopische Sensibilisierung versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

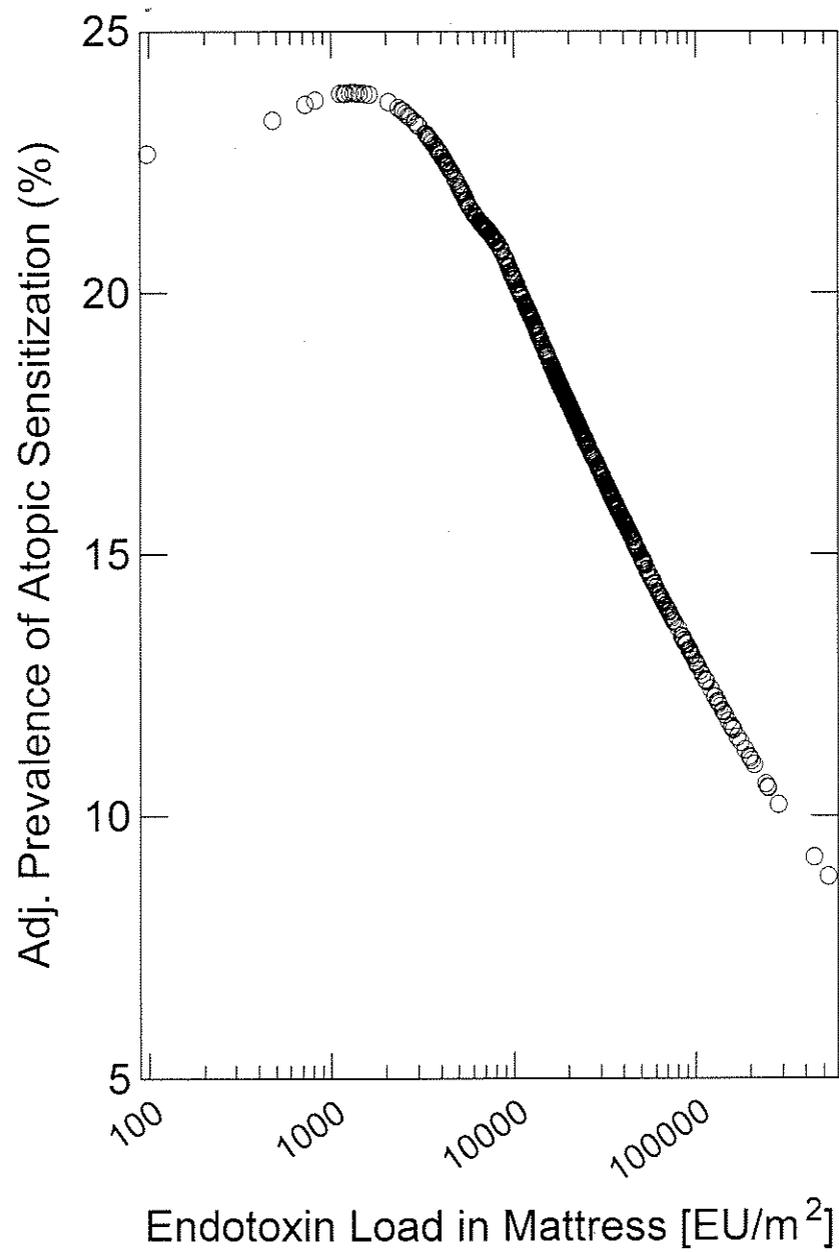


Abbildung 7 d): Atopisches Asthma versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

Abbildung 7 e): Nicht-atopisches Asthma versus Endotoxinkonzentration in der Matratze.

Fehler! Es ist nicht möglich, durch die Bearbeitung von Feldfunktionen Objekte zu erstellen.

Abbildung 7 f): Atopisches Giemen versus Endotoxinkonzentration in der Matratze

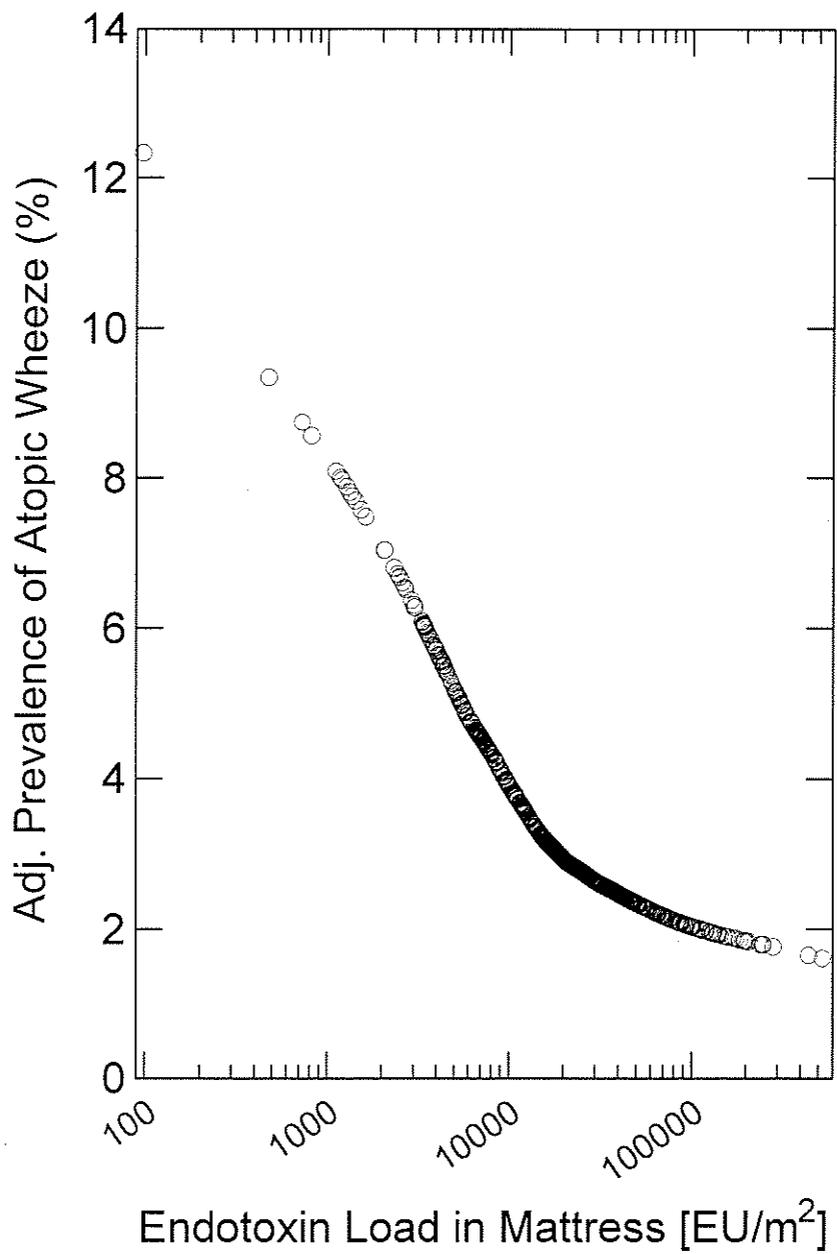
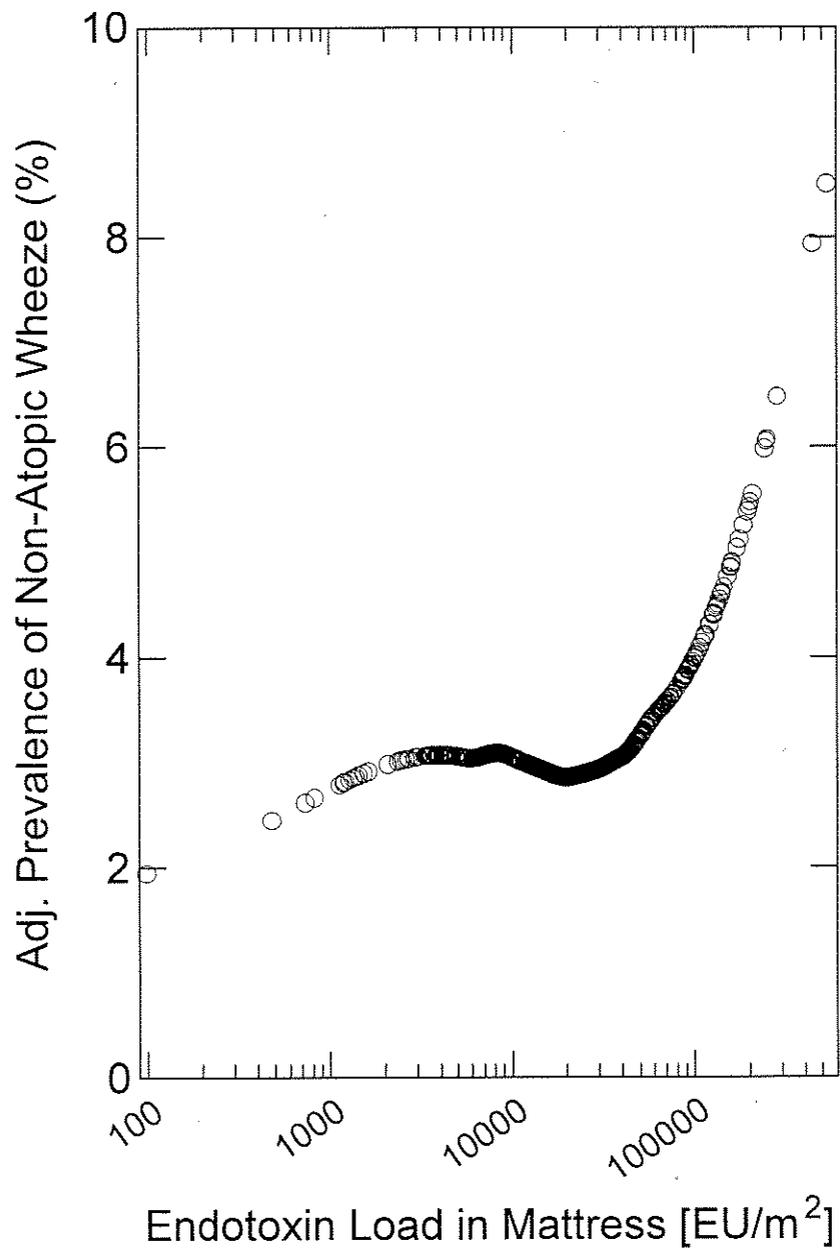


Abbildung 7 g): Nicht-atopisches Giemen versus Endotoxinkonzentration in der Matratze



6.9 Endotoxinexposition und Stallaufenthalt im ersten Lebensjahr

Wie aus der nachfolgenden Tabelle 6 ersichtlich wird, war die inverse Assoziation der Endotoxinexposition unabhängig von den protektiven Effekten der Stall- bzw. Bauernmilchexposition im ersten Lebensjahr. Dieser Ergebnisse deuten darauf hin, dass andere mikrobielle Produkte, die nicht den gram-negativen Bakterien zuzuschreiben, aber im Stall bzw. in der Rohmilch zu finden sind, ebenfalls einen starken protektiven Effekt auf die Entstehung atopischer Erkrankungen ausüben.

Tabelle 6):

	Stallaufenthalt bzw. Bauernmilchkonsum im 1. Lj. aOR (95% KI)	Endotoxinexposition im Schulalter in EU/m ² (3) aOR (95% KI)
Heuschnupfen, Diagnose	0,26* (0,13-0,52)	0,61* (0,40-0,95)
Heuschnupfen, Beschwerden	0,55* (0,31-0,97)	0,53* (0,36-0,77)
Atopie (SX1 ≥ 3.5 kU/L)	0,45* (0,30-0,68)	0,83 (0,63-1,09)
Atopisches Asthma	0,42* (0,18-0,96)	0,52* (0,30-0,90)
Nicht-atopisches Asthma	0,48 (0,16-1,41)	1,22 * (0,60-2,46)

(1) Adjustiert für Endotoxinexposition im Schulalter

(2) Adjustiert für Stallaufenthalt und Bauernmilchkonsum im ersten Lebensjahr

* p ≤ 0,05

6.10 Ergebnisse der Zytokinproduktion nach Zellstimulation

In Tabelle 7 sind die Mediane und interquartilen Spannen (interquartile ranges IQR) der einzelnen Zytokine der Bauernkinder denen der Nicht-Bauernkinder nach 24 stündiger LPS-Stimulation gegenübergestellt. Es zeigt sich, dass die Leukozyten der Bauernkinder im Vergleich zu denen der Nicht-Bauernkindern signifikant weniger IFN- γ und hochsignifikant weniger TNF- α produzieren. Da die IL-5 Messwerte sehr oft unterhalb der Nachweisgrenze lagen, konnte eine gültige Auswertung der IL-5 Konzentrationen nicht vorgenommen werden.

Tabelle 7): Zytokinproduktion Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach 24h LPS-Stimulation (*:p \leq 0,05, **:p \leq 0,01).

	Bauernkinder			Nicht-Bauernkinder		
	n	Median	IQR	n	Median	IQR
IFN- γ	273	268,9*	438,7	446	315,7*	550,0
IL-10	276	73,4	98,1	447	73,5	85,4
IL-12	179	17,8	19,4	326	17,2	28,5
TNF- α	277	600,0**	525,5	444	679,2**	627,1

In Abbildungen 8 a) – 8 d) ist die bereits in Tabelle 7 beschriebene Zytokinproduktion nach LPS-Stimulation und diesmal auch die Ergebnisse der SEB-Stimulation der Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder von IFN- γ , TNF- α , IL-12 und IL-10 in pg/ml dargestellt, standardisiert auf 10⁹ Lymphozyten/Liter. Abgebildet ist die interquartile Spanne IQR. Um eine Signifikanz der Unterschiede der Zytokinproduktion der Bauern- und der Nicht-Bauernkinder nachweisen zu können, wurde ein Wilcoxon Test angewandt. Nach 24 stündiger LPS-Stimulation (SEB 72h) waren die dargestellten Zytokinkonzentrationen messbar. Im Gegensatz dazu konnte weder nach 24 h noch nach 72 h in der Kontrolle mit Medium ohne Stimulans eine nachweisbare Zytokinproduktion gemessen werden.

Nach LPS-Stimulation produzierten die Zellen der Bauernkinder signifikant (p< 0,05) weniger IFN- γ als die der Nicht-Bauernkinder. Die IFN- γ Produktion wies hingegen nach SEB-

Stimulation keinen signifikanten Unterschied zwischen Bauern- und Nicht-Bauernkinder auf. Ferner produzierten die Bauernkinder nach LPS-Stimulation hochsignifikant ($p < 0,001$) weniger $\text{TNF-}\alpha$ als die Nicht-Bauernkinder. Die $\text{TNF-}\alpha$ Messwerte nach SEB-Stimulation wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen Bauernkindern und Nicht-Bauernkindern auf. Im Gegensatz zu der signifikant verminderten $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ Produktion der Bauernkinder auf LPS-Stimulation, konnte bei IL-10 und IL-12 nach LPS- und SEB-Stimulation kein signifikanter Unterschied zwischen den Bauern- und Nicht-Bauernkinder gefunden werden.

Abbildung 8 a): $\text{IFN-}\gamma$ Produktion der PBMCs, Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder, nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72 h).

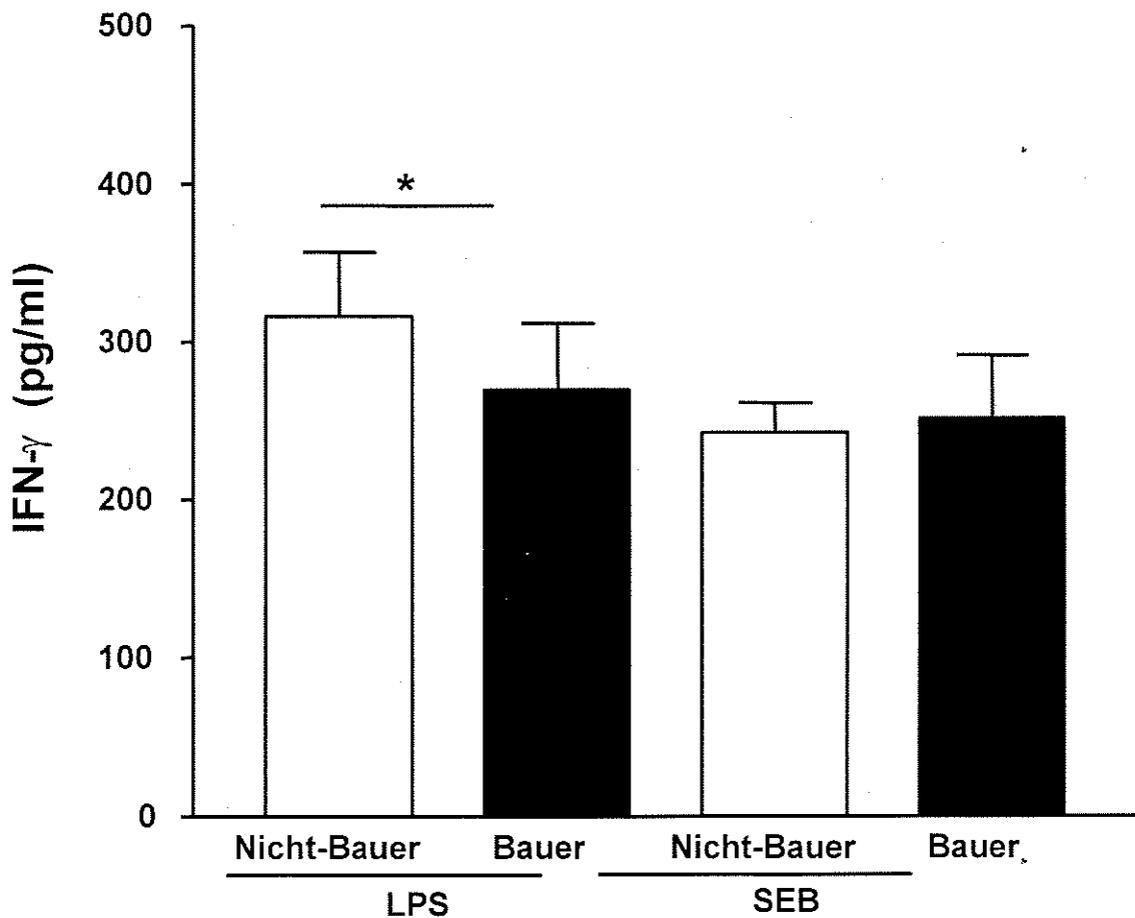


Abbildung 8 b): $\text{TNF-}\alpha$ Produktion der PBMCs Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72 h).

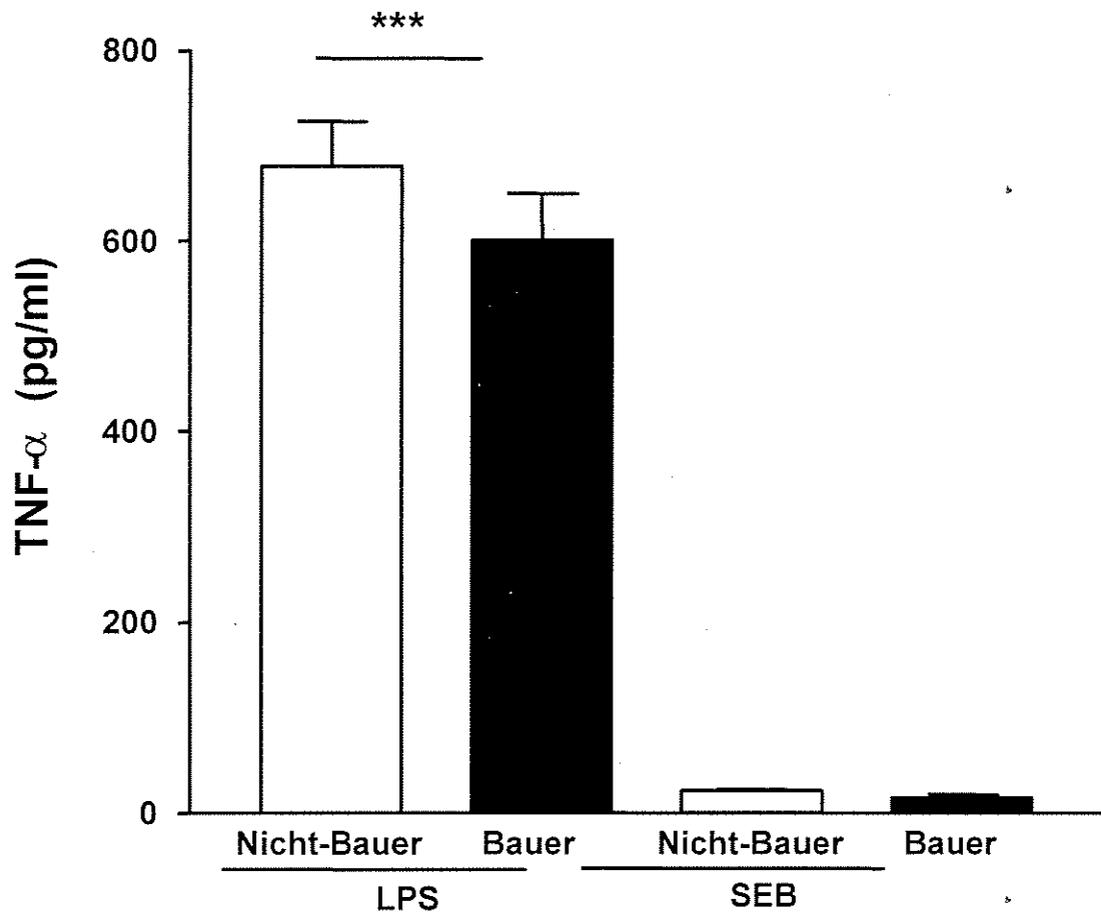


Abbildung 8 c): IL-12 Produktion der PBMCs Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72 h).

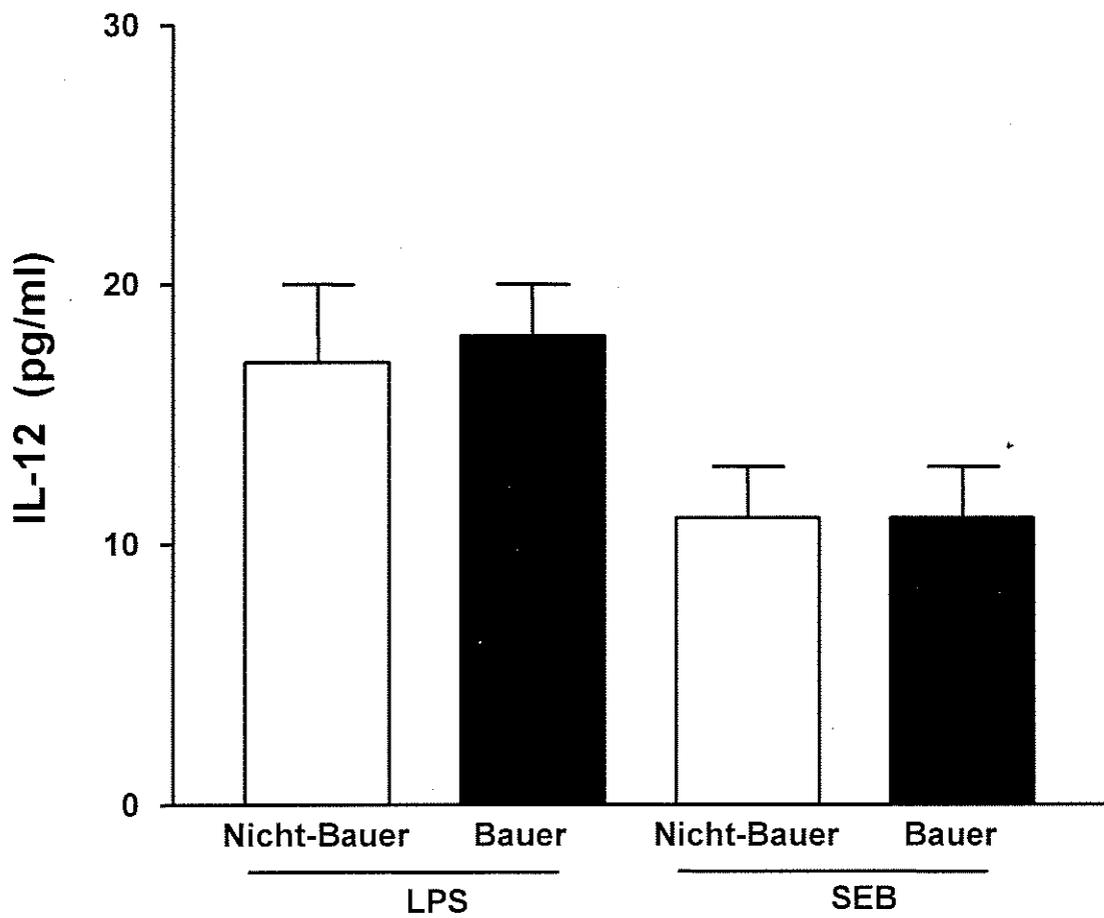
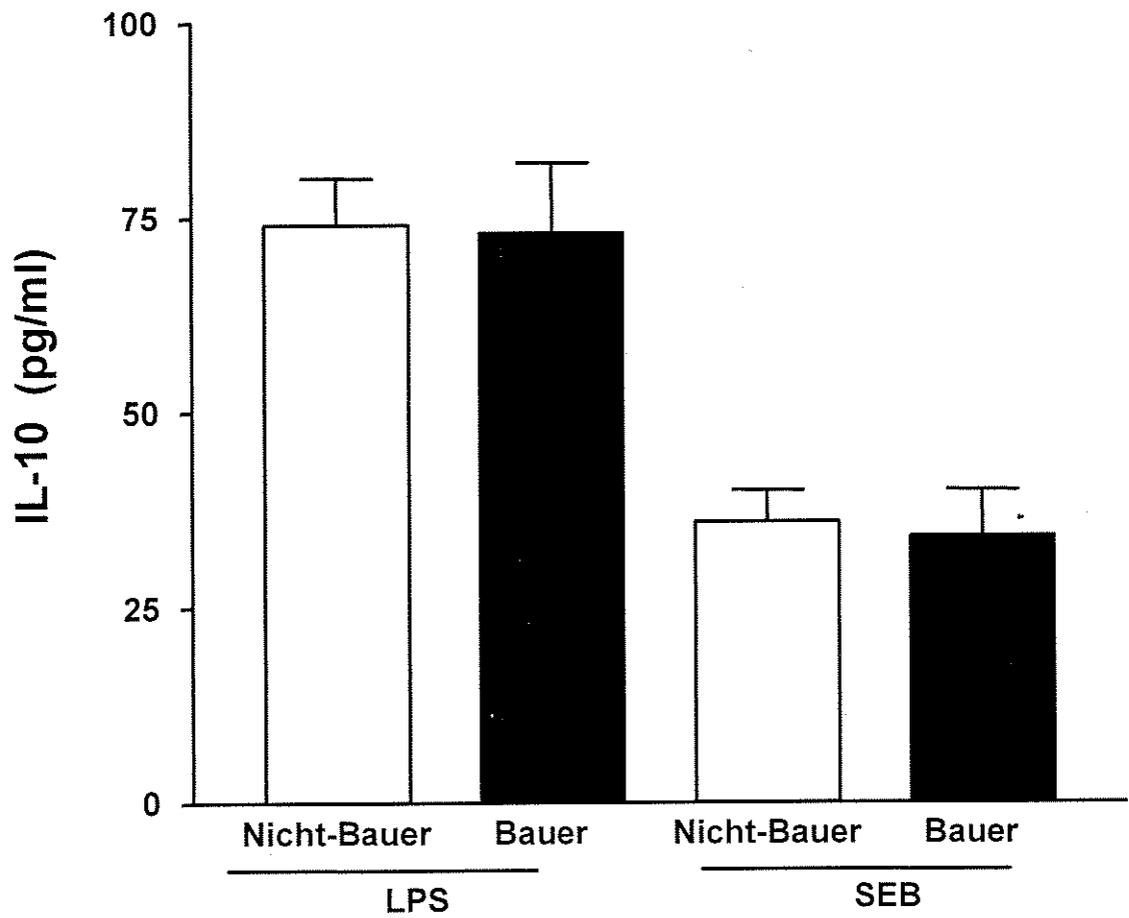


Abbildung 8d): IL-10 Produktion der PBMCs, Bauernkinder versus Nicht-Bauernkinder, nach LPS-Stimulation (24h) und SEB-Stimulation (72 h).

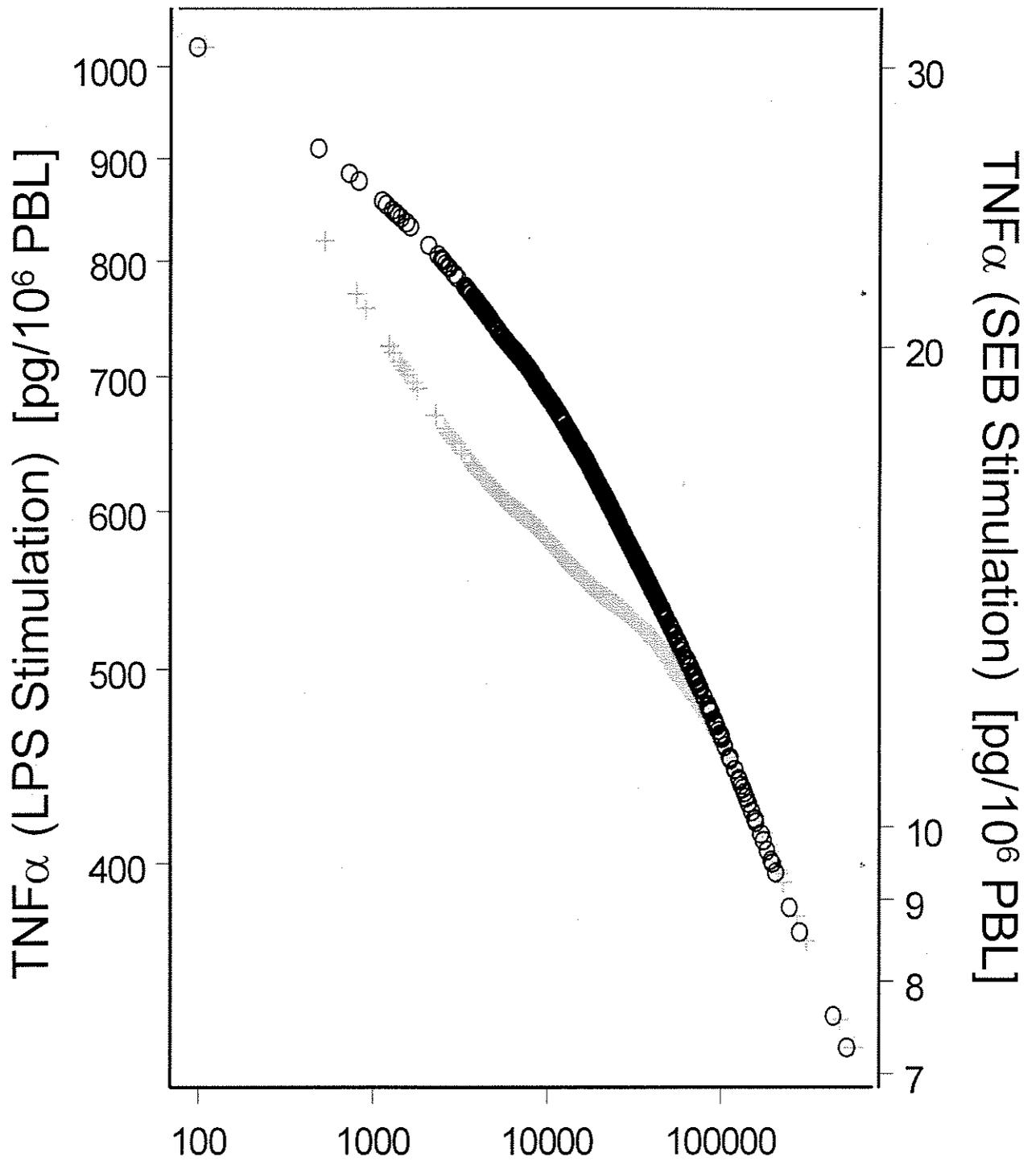


6.11 Zytokinproduktion versus Endotoxinbelastung

Es zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der Höhe der Endotoxinexposition und der Kapazität der peripheren Blutleukozyten, inflammatorische und regulatorische Zytokine nach Lipopolisaccharid (LPS)-Stimulation zu produzieren (Abbildungen 9 a-d). Die Beziehung

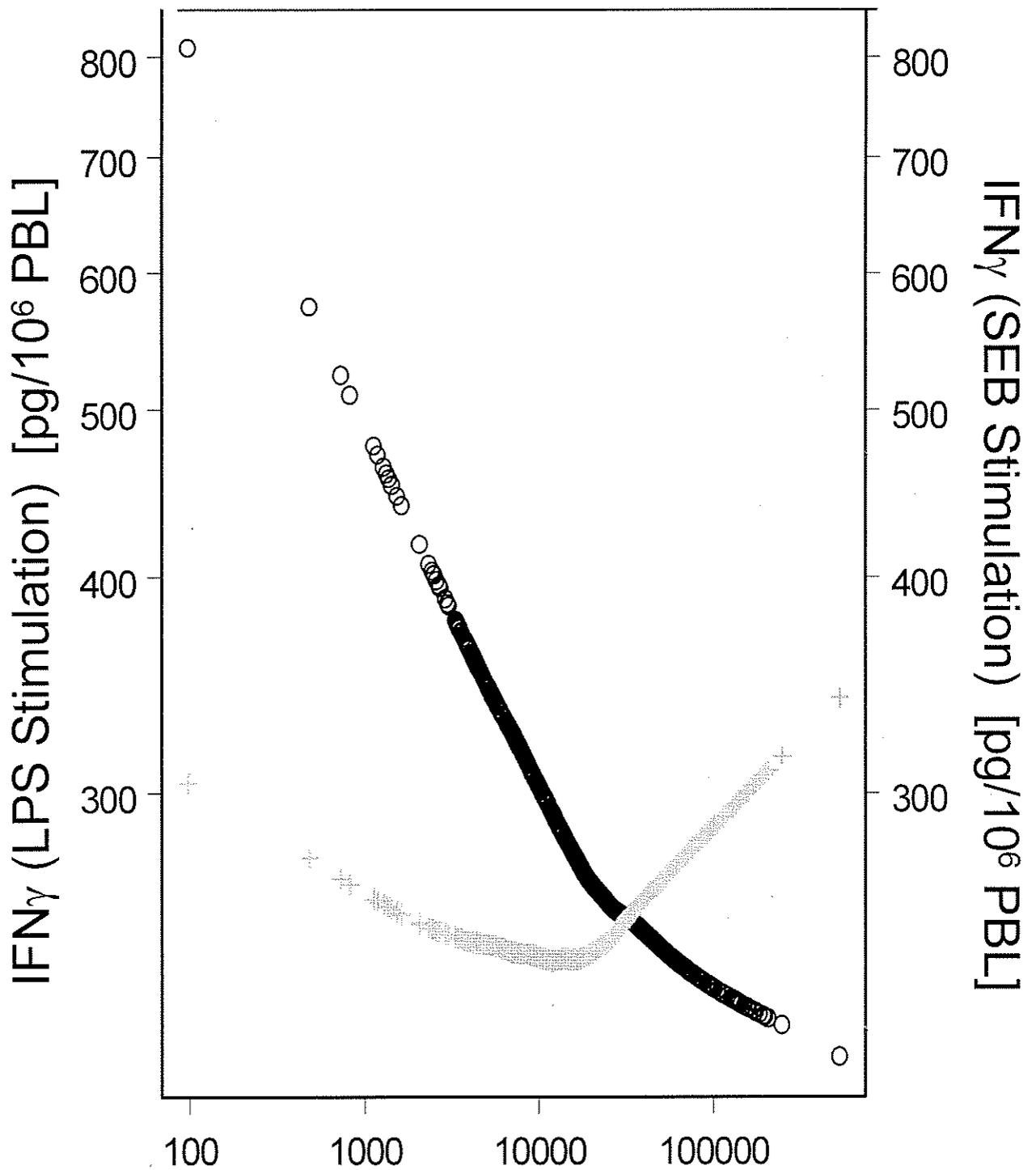
zwischen der Endotoxinexposition (EU/m^2) und $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, IL-10 und IL-12, ausgedrückt als means ratio, betrug 0,81 (95% CI; 0,74-0,89), 0,80 (95% CI; 0,70-0,92), 0,93 (95% CI; 0,81-1,07) und 0,87 (95% CI; 0,77-0,98). Die korrespondierenden Ergebnisse für Stimulation mit Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB) waren 1,05 (0,95-1,17), 0,97 (0,84-1,11), 0,96 (0,86-1,06) und 0,83 (0,74-0,93). Abbildung 9 zeigt die Kapazität, $\text{TNF-}\alpha$ (9 a), $\text{IFN-}\gamma$ (9 b), IL-12 (9 c), und IL-10 (9 d) zu produzieren ($\text{pg}/10^6$ PBL= peripheral blood leucocytes) nach LPS- bzw. SEB-Stimulation, geglättet gegen log Endotoxinbelastung der Matratze (EU/m^2), kontrolliert für Alter, Geschlecht, Studienregion, Familiengeschichte des Asthma und Heuschnupfen, Bildungsstand der Eltern und Anzahl der Geschwister. Es wurde ein Glättungsparameter von 0,9 für alle 4 Grafiken benutzt.

Abbildung 9 a): Kapazität, $\text{TNF-}\alpha$ nach LPS-Stimulation zu produzieren ($\text{pg}/10^6$ periphere Blutleukozyten), geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze (EU/m^2). Schwarz LPS, grau SEB.



Endotoxin Load in der Matratze [EU/m²]

Abbildung 9 b): Kapazität, IFN- γ nach LPS-Stimulation zu produzieren (pg/ 10⁶ periphere Blutleukozyten), geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze (EU/m²). Schwarz LPS, grau SEB.



Endotoxin Load in der Matratze [EU/m²]

Abbildung 9 c): Kapazität, IL-12 nach LPS-Stimulation zu produzieren (pg/ 10⁶ periphere Blutleukozyten), geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze (EU/m²). Schwarz LPS, grau SEB.

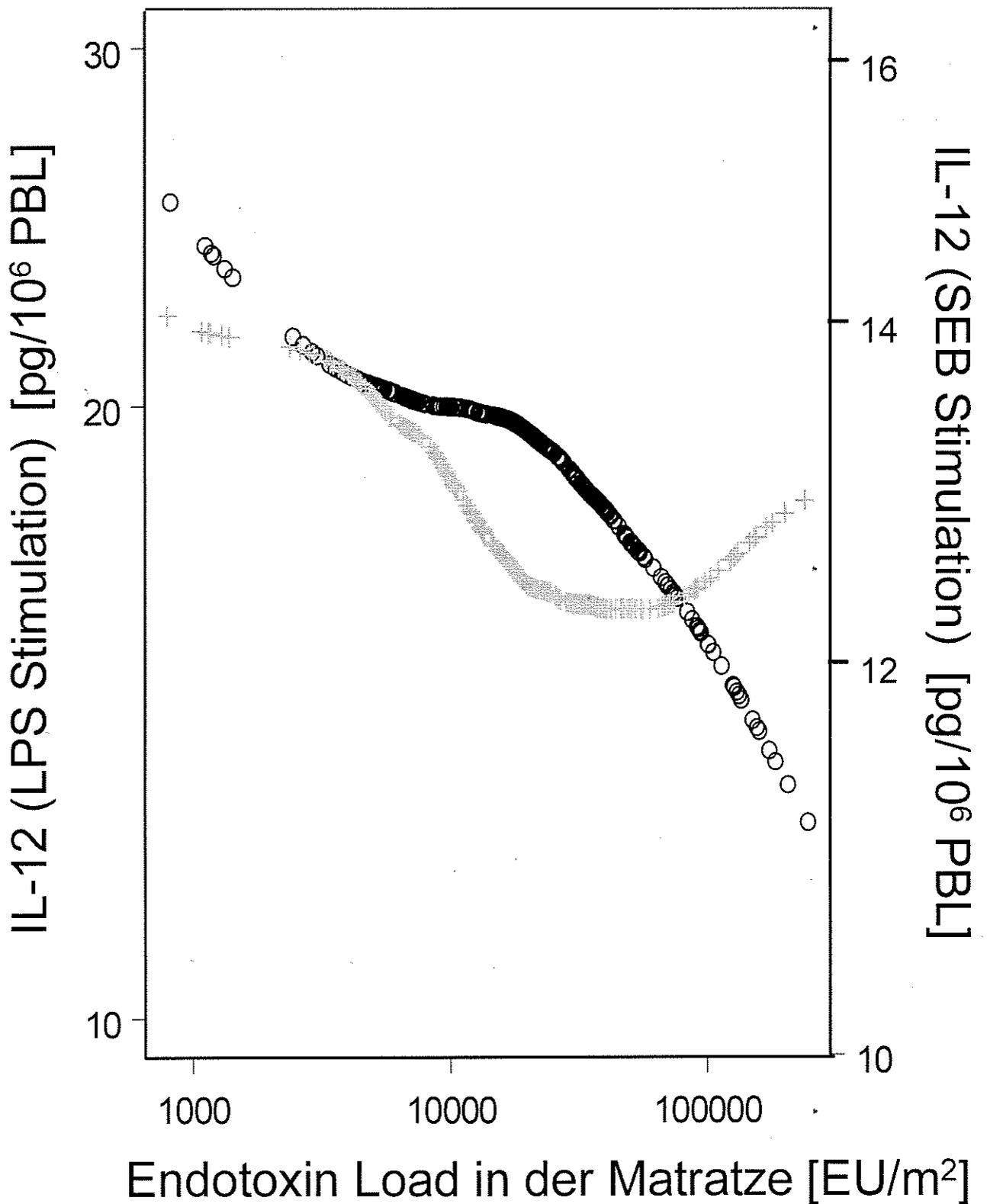
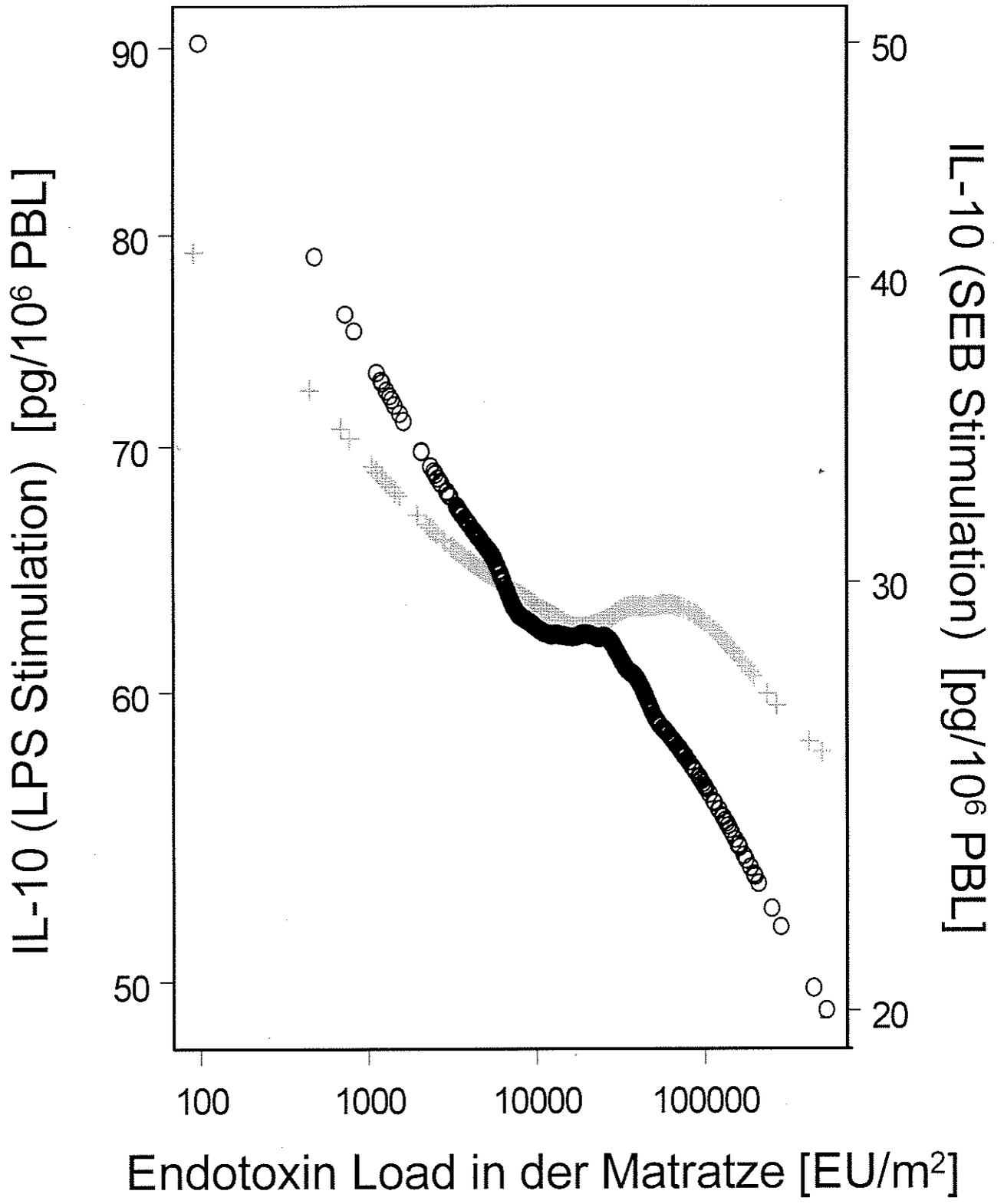


Abbildung 9 d): Kapazität IL-10 nach LPS-Stimulation zu produzieren (pg/ 10⁶ periphere Blutleukozyten) geglättet gegen die log Endotoxin Load der Matratze (EU/m²). Schwarz LPS, Grau SEB.



7 Diskussion:

Die hier präsentierten Untersuchungsergebnisse bestätigen, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind, eine wesentlich niedrigere Prävalenz von Heuschnupfen, Asthma bronchiale und atopischer Sensibilisierung aufweisen als Kinder, die nicht von einem Bauernhof stammen. Als wesentliche Erklärungsfaktoren des „Bauerneffekts“ konnten die frühkindliche Exposition gegenüber Kuhställen und der Konsum der Bauernmilch identifiziert werden. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse dieser Studie darauf hin, dass die Exposition mit mikrobiellen Produkten in der Umwelt, wie die in den Matratzen gemessenen Staub-Endotoxinwerte, das Risiko von Heuschnupfen, atopischer Sensibilisierung und atopischem Asthma im Kindesalter signifikant vermindert. Dieser protektive Effekt der Endotoxinexposition wurde sowohl bei den Bauern- als auch bei den Nicht-Bauernkindern beobachtet. Dies weist darauf hin, dass selbst relativ niedrige Expositionen, wie sie in der Umgebung von Nicht-Bauernkindern gefunden wurden, sich positiv gegen die Entwicklung von atopischen Erkrankungen im Kindesalter auswirken.

Den Konsum von Bauernmilch, die häufig nicht abgekocht wurde, und den Stallkontakt im 1. Lebensjahr interpretieren wir als vermehrte mikrobielle Exposition, der diese Kinder ausgesetzt sind. Es ist bekannt, dass in Ställen und Rohmilch eine Vielzahl von Keimen (z.B. E. coli, Lactobacillus, Stap. aureus) vorkommen. Stellvertretend für die gram-negativen Bakterien haben wir die Endotoxinkonzentration in den Matratzen der Kinder gemessen, da wir aus dieser Studie auch wissen, dass Endotoxin aus den Ställen in den Wohnraum der Kinder gelangt. Die Höhe der Endotoxinexposition zeigte dabei eine starke, inverse Assoziation mit atopischem Asthma, Heuschnupfen, Heuschnupfensymptomen und atopischer Sensibilisierung.

Die Mechanismen, die bewirken, dass die Exposition mit Endotoxin und anderen, vermutlich bakteriellen Antigenen im Stall, gegen die Entwicklung atopischer Immunreaktionen und Erkrankungen schützen kann, bleiben derzeit im Einzelnen unverstanden. Die Ergebnisse der LPS-Zytokinstimulation lieferten andere Ergebnisse, als wir aus Kenntnis der Literatur erwartet hatten. Die ursprüngliche These, dass die Endotoxinexposition bei den Bauernkindern ein Th-1 Zytokinprofil mit assoziiert erhöhtem Interferon- γ und Interleukin 12 induziert, konnte anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigt werden. Unsere Untersuchungsergebnisse legen vielmehr nahe, dass eine hohe Endotoxinexposition im Grundschulalter als Reaktion auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu einer merklichen Suppression der Zytokinproduktion führt.

Die Vollblutmethode der Zellstimulation in den LPS- vorbeschichteten Stimulationsröhrchen war für unsere Zwecke besonders geeignet, da das Procedere im Labor am Tag der Blutentnahme pro Blutprobe im Vergleich zu den Stimulationstechniken mit Zellseparation weniger Zeit in Anspruch nahm. Dadurch konnten die großen Probandenzahlen, die für unsere Zwecke benötigt wurden erst erreicht werden, und zwar aufgrund der Tatsache, dass die Zeitspanne zwischen Blutabnahme und Inkubation der Blutproben so kurz wie möglich gehalten werden konnte. Durch die Verwendung dieser Vollblutmethode konnten auch durch die Zellseparation bedingte Anreicherungen/ Verminderungen bzw. vorzeitige Aktivierung von Lymphozytensubpopulationen vermieden werden. Dass die Methode hinsichtlich der Zytokinproduktion nach LPS-Stimulation, verglichen mit anderen Stimulationsmethoden nach Zellseparation, die höchsten Zytokinmesswerte liefert, haben wir zuvor experimentell nachgewiesen. Der Nachteil dieser Vollblutzellstimulation ist jedoch, dass eine Zuordnung zwischen den stimulierten Zellpopulationen und den von ihnen produzierten Zytokinen ohne Zellseparation nicht vorgenommen werden kann. Für die von uns benötigten Zwecke und Fragenstellungen war diese Zuordnung jedoch nicht dringend erforderlich.

Aus In-vitro-Studien ist bekannt, dass nach einer Prästimulation mit LPS eine reduzierte Aktivierbarkeit der Zytokinproduktion auftritt. Diese Reaktion wird als „LPS-Toleranz“ bezeichnet (190). Endotoxintoleranz ist nicht LPS-spezifisch, sondern es sind Kreuzreaktionen mit anderen exogenen Stimulantien beschrieben. Außer für LPS (191-195) konnte für eine Vielzahl von Stimulantien gezeigt werden, dass sie einen LPS-toleranten Zustand induzieren können. Zu den Stimuli, von denen bekannt ist, dass sie die Reaktion auf eine folgende LPS Stimulation modifizieren können, gehören Peptidoglycan (196), Lipoarabinomannan (197, 198), Lipoteichonsäure (199), Mykobakterien (197, 198), Muramil Dipeptid (196) und 25-hydroxy-Cholesterol (200). Die beständigste und wohl am besten charakterisierte Veränderung der LPS-Toleranz ist die verminderte TNF- α -Produktion (201, 202, 203). Diese Verminderung der LPS-stimulierten TNF- α -Produktion ist ein solch charakteristisches Merkmal der Endotoxintoleranz, dass einige Forscher die TNF-Hemmung mit einem LPS-toleranten Zustand gleichsetzen. Ausserdem zeigen LPS-tolerante menschliche Zellen (Monozyten und dendritische Zellen) nach LPS-Stimulation eine verminderte Produktion von IL-10 (204, 205) und IL-12 (206). Eben diese inverse Korrelation der Zytokinproduktion von TNF- α , IFN- γ , IL-12 und IL-10 mit steigenden Endotoxinmesswerten im Staub der Matratzen konnten wir in unseren Ergebnissen beobachten.

Die Ergebnisse unserer Untersuchung deuten darauf hin, dass eine Herabregulierung in vivo als Folge einer Langzeitexposition mit in der Umwelt des Individuums vorkommendem Endotoxin eintreten kann. Es bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen, ob diese Herunterregulierung nur ein Begleitphänomen und Bioindikator der Endotoxinexposition ist, oder ob die verminderte Atopie-Rate kausal damit in Verbindung steht.

In letzter Zeit tauchte die Vorstellung auf, dass die angeborene Immunantwort in prägender Weise auf die erworbene Immunität einwirkt (207). Jüngst wurde eine unterschiedliche Expression des LPS-Rezeptors bei Bauernkindern im Vergleich zu Nicht-Bauernkindern beschrieben (208). Dies legt nahe, dass das angeborene Immunsystem auf die mikrobielle Belastung der bäuerlichen Umgebung reagiert. Obgleich wir nur die gegenwärtige Endotoxinexposition durch die einmaligen Messungen erfasst haben, ist es jedoch wahrscheinlich, dass sie auch die chronische Exposition dieser Kinder widerspiegelt. Infolgedessen mag es sein, dass eine Langzeitexposition mit hohen Endotoxinpegeln in der Umwelt die Entstehung von allergiebegünstigenden Immunreaktionen verhindert.

Interessanterweise konnte der protektive Effekt der Endotoxinexposition im Schulalter nur beim atopischen Asthma beobachtet werden, nicht jedoch für das nicht-atopische Asthma. Das Asthma bronchiale im Kindesalter ist ein komplexes Syndrom mit vielen Phänotypen, die sich, wie in vielen prospektiven Langzeitstudien gezeigt wurde, vom Säugling über das Kleinkind, Schulkind, Jugendlichen bis zum Erwachsenen entwickeln (213, 214, 215). Obwohl in vielen Fällen Asthma mit einer atopischen Sensibilisierung gegen eine Vielzahl von Allergenen assoziiert ist, kommen obstruktive Erkrankungen auch ohne eine gesteigerte IgE-Antwort vor. Sowohl der genetische Hintergrund, als auch Umweltfaktoren und deren gemeinsames Zusammenspiel führen wahrscheinlich zu den verschiedenen klinischen Manifestationsformen der obstruktiven Erkrankungen.

In klinischen (261) bzw. experimentellen (217) Studien konnte gezeigt werden, dass Endotoxin eine Übererregbarkeit der Atemwege bei gesunden, nicht atopischen Menschen und Tieren induziert, aber bei bereits sensibilisierten Tieren zu einer Abnahme der Atemwegempfindlichkeit führt. Tulic et al (217) exponierten dazu Ratten vernebeltem Lipopolysaccharid 1 Tag vor, und 1, 4, 6, 8 und 10 Tage nach intraperitonealer Sensibilisierung mit Ovalbumin. Diese Autoren haben gezeigt, dass eine Exposition mit Lipopolysaccharid, die bis zum 4. Tag nach der Sensibilisierung stattfand, protektiv gegen die Bildung spezifischer IgE-Antikörper, bronchialer Hyperreagibilität

und Entzündungsvorgänge in der broncheoalveolären Lavageflüssigkeit wirkte. Eine Inhalation von Lipopolysaccharid ab dem 4. Tag nach der Sensibilisierung hingegen hatte nachteilige Effekte und führte zu einer Zunahme der allergischen Reaktionen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine frühe Exposition gegenüber bakteriellen Komponenten den immunologischen Gesamtstatus eines Individuums mitbestimmen kann und es dadurch weniger anfällig für Asthma oder Heuschnupfen wird. Diese tierexperimentellen Befunde bestätigen zudem unsere Ergebnisse.

Interessanterweise konnte ein protektiver Effekt der Stall- bzw. Bauernmilchexposition im ersten Lebensjahr für das nicht-atopische Asthma festgestellt werden, Folglich ist es wahrscheinlich, dass nicht nur Art und Ausmaß der Exposition mit mikrobiellen Antigenen einen Einfluss auf die Bildung atopischer oder nicht-atopischer Ausprägungen hat, sondern auch der Zeitpunkt dieser Exposition mit darüber entscheidet, ob sie protektive oder schädliche Effekte hat.

Wir haben Endotoxin im Matratzenstaub gemessen, da die Kinder während des Schlafes eng mit der mikrobiellen Umgebung ihrer Betten in Kontakt kommen und zumindest für die Dauer des Schlafes dieser Konzentration ausgesetzt sind. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit der Endotoxinmessungen aus Betten höher als für Endotoxinmessungen des Bodenstaubes (220). In früheren Untersuchungen konnte ferner gezeigt werden, dass Endotoxinbelastungen im Matratzenstaub über längere Zeiträume nur gering variieren und innerhalb eines Zeitraumes von 6 Monaten keine signifikanten Veränderungen aufwiesen (212). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Umgebungskonzentrationen an Endotoxin eine Langzeitexposition gegenüber mikrobiellen Bestandteilen der Umwelt widerspiegeln. Das Querschnittsdesign dieser Studie limitiert jedoch die Möglichkeit, die genaue Expositionsdauer zu bestimmen. Diesbezüglich sind in Zukunft sicherlich weitere prospektive Untersuchungen nötig.

Aus der Vielzahl der mikrobiellen Antigene wurde in dieser Studie Endotoxin als Marker für gram-negative Bakterien gewählt. Andere bakterielle Bestandteile, wie z.B. die prokaryontische DNA (CpE Motive), oder Zellwandbestandteile von atypischen Mykobakterien und gram-positiven Bakterien wie die Lipoteichonsäure, die ähnliche immunstimulatorische Wirkungen aufweisen, wurden nicht berücksichtigt (221, 222). Die beobachteten protektiven Effekte, die mit der Endotoxinbelastung im Matratzenstaub assoziiert waren, spiegeln deshalb wahrscheinlich ein viel breiteres Spektrum an mikrobieller Belastung wider, als nur die Exposition gegenüber gram-negativen Bakterien.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten zusammenfassend darauf hin, dass durch die Exposition gegenüber mikrobiellen Produkten, wie sie im Stall oder in der Endotoxinexposition im Hausstaub zu finden ist, mit der Entwicklung einer Toleranz gegenüber ubiquitär vorkommenden Allergenen der natürlichen Umgebung assoziiert ist. Es erscheint wahrscheinlich, dass den Mechanismen, welche mit der Erkennung dieser mikrobiellen Produkte durch die angeborene Immunität in Verbindung stehen, eine Schlüsselrolle in der Entwicklung atopischer Erkrankungen zukommt. Es bleibt zu hoffen, dass diese Erkenntnisse zukünftig die Entwicklung neuer Strategien der Prävention dieser Erkrankungen ermöglichen.

8 Ausblick:

Bis zum Ende der Förderperiode konnten nicht sämtliche erhobenen Daten ausgewertet und publiziert werden. Zwei wesentliche Publikationen, die aus diesem geförderten Projekt stammen, sind als Anlagen 7 und 8 beigefügt. Ein weiteres Manuskript, welches kürzlich zur Publikation eingereicht wurde, wird ebenfalls als Anlage 9 beigefügt. Derzeit wird weiter an der Auswertung der Allergenexpositionsdaten, der Zytokindaten und der Ergebnisse der Ernährungsprotokolle gearbeitet und wir rechnen damit, dass im nächsten Jahr weitere Manuskripte zu Ergebnissen dieser Studie eingereicht werden können.

9 Literatur

1. Matricardi PM, Franzinelli F, Franco A, Caprio G, Murru F, Cioffi D, Ferrigno L, Palermo A, Ciccarelli N, Rosmini F. Sibship size, birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:439-44.
2. Williams H, Strachan D, Hay R. Childhood eczema: disease of the advantaged? *Br Med J* 1994;308:1132-5.
3. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Br Med J* 1989;299: 1259-60.
4. Strachan DP, Taylor EM, Carpenter G. Family structure, neonatal infection, and hay fever in adolescence. *Arch Dis Child* 1996;74:422-6.
5. Räsänen M, Laitinen T, Kaprio J, Koskenvuo M, Laitinen LA. Hay fever, asthma and number of older siblings - a twin study. *Clin Exp Allergy* 1997;27:515-8.
6. Jarvis D, Chinn S, Luczynska C, Burney P. The association of family size with atopy and atopic disease. *Clin Exp Allergy* 1997;27:240-5.
7. Olesen AB, Ellingsen AR, Olesen H, Juul S, Thestrup-Pedersen K. Atopic dermatitis and birth factors: historical follow up by record linkage. *Br Med J* 1997;314:1003-8.
8. Golding J, Peters T. The epidemiology of childhood eczema: I. A population based study of associations. *Paed Perinat Epidemiol* 1987;1:67-79.
9. Taylor B, Wadsworth M, Golding J, Butler N. Breast feeding, eczema, asthma and hay fever. *J Epidemiol Community Health* 1983;37:95-9.
10. von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Reitmeir P, Thiemann HH. Skin test reactivity and number of siblings. *Br Med J*, 1994;308:692-5.
11. Strachan DP, Harkins LS, Johnston IDA, Anderson HR. Childhood antecedents of allergic sensitization in young British adults. *J Allergy Clin Immunol* 1997;99:6-12.

12. Nowak D, Heinrich J, Jörres R, Wassmer G, Berger J, Beck E, Boczor S, Claussen M, Wichmann HE, Magnussen H. Prevalence of respiratory symptoms, bronchial hyperresponsiveness and atopy among adults: West and East Germany. *Eur Respir J* 1996;9:2541-52.
13. Forastiere F, Agabiti N, Corbo GM, Dell'Orco V, Porta D, Pistelli R, Levenstein S, Perucci CA. Socioeconomic status, number of siblings, and respiratory infections in early life as determinants of atopy in children. *Epidemiology* 1997;8:566-70.
14. Matricardi PM, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini R, Rapicetta M, Chionne P, Stroffolini T, Pasquini P, D'Amelio R. Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *Br Med J* 1997;314:999-1003.
15. Matricardi PM, Franzinelli F, franco A, Caprio G, Murru F, Cioffi D, Ferrigno L, Palermo A, Ciccarelli N, Rosmini F. Sibship size, birth order, and atopy in 11,371 Italian young men. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101:439-44.
16. von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Roell G, Thiemann HH. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149:358-64.
17. Krämer U, Heinrich J, Wjst M, Wichmann H-E. Age of entry to day nursery and allergy in later childhood. *Lancet* 1999;353:450-4.
18. Braback L, Breborowicz A, Julge K, Knutsson A, Riikjarv MA, Vasar M, Bjorksten B. Risk factors for respiratory symptoms and atopic sensitisation in the Baltic area. *Arch Dis Child* 1995; 72:487-93.
19. Riedler J, Eder W, Oberfeld G, Schreuer M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitisation. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:194-200

20. Braun-Fahrlander Ch, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC, Wüthrich B & the SCARPOL Team. Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clin Exp Allergy* 1999;29:28-34.
21. von Mutius E, Illi S, Nicolai T, Martinez FD. Relation of indoor heating with asthma, allergic sensitization, and bronchial responsiveness in South Bavarian children. *Br Med J* 1996; 312:1448-50.
22. Nowak D, Garz S, Schottky A. Zur Bedeutung von Endotoxinen für obstruktive Atemwegserkrankungen im Bereich der Landwirtschaft. *Arbeitsmedizin, Sozialmedizin, Umweltmedizin* 1998;6:233-40.
23. Hailmann E, Lichtenstein HS, Wurfel M, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994;179:269-77.
24. Schumann RR. Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol* 1992;143:11-5.
25. Hilkens CMU, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML.
Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 1997;90:1920-6.
26. Boeing H, Bohlscheid-Thomas S, Voss S, Schneeweiss S, Wahrendorf J.
The relative validity of vitamin intakes derived from a food frequency questionnaire compared to 24-hour recalls and biological measurements: Results from the EPIC Pilot Study in Germany. *Int J Epi* 1997, 26(Suppl.1): S82-90
27. Bohlscheid-Thomas S, Hoting I, Boeing H, Wahrendorf J.
Reproducibility and relative group intake in a food frequency questionnaire developed for the German Part of the EPIC project. *Int J Epi* 1997, 26(Suppl.1): S59-70

28. Voss S, Kroke A, Klipstein-Grobusch K, Boeing H.

Is macronutrient composition of dietary intake data affected by underreporting?

Results from the EPIC-Potsdam study. *Eur J Clin Nutr* 1998, 52:119-126.

29. von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S,

Waser M, Nowak D. Exposure to endotoxin or other bacterial components might

protect against the development of atopy. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1230-34.p

10 Anhang

- Anlage 1 von Mutius E, Braun-Fahrländer C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak . Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. Clin Exp Allergy 2000; 30:1230-1234
- Anlage 2 Fragebogen zu allergischen Erkrankungen im Kindesalter
- Anlage 3 Fragebogen zu Ernährungsgewohnheiten
- Anlage 4 a Fragebogen Stalltiere und Aufenthalt
- Anlage 4 b Fragebogen Impfungen
- Anlage 5 Staubprobenahme Protokoll
- Anlage 6 Milchabnahmeprotokoll
- Anlage 7 Lauener Roger P, Birchler T, Adamski J, Braun-Fahrländer C, Bufe A, Herz U, von Mutius E, Nowak D, Riedler J, Waser M, Sennhauser Felix H, and the ALEX study Group. Expression of CD14 and Toll-like receptor 2 in farmers' and non-farmers' Children. The Lancet 2002; 360:465-466
- Anlage 8 Braun-Fahrländer C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener R P, Schierl R, Renz H, Nowak D and von Mutius E for the Allergy and Endotoxin Study Team. N Engl J Med 2002; 347:869-877
- Anlage 9 Waser M, Schierl R, von Mutius E, Maisch S, Carr D, Riedler J, Eder W, Scheurer M, Nowak D, Braun-Fahrländer C, and the ALEX Study Team. Submitted version 27.11.2002

