

1990:

31. **Ewa Menckel:**  
Intervention and Cooperation. Occupational Health Services and Prevention of Occupational Injuries in Sweden.
32. **Gunnar Johanson:**  
NEG and NIOSH Basis for an Occupational Health Standard: Propylene Glycol Ethers and Their Acetates.
33. **Age Haugen:**  
Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation. 91. N-Nitrosoförbindelser og kreft.
34. **Bengt Sjögren, Gunnar Aronsson, Bo Dahliner, Christer Hogstedt, Åsa Kilbom, Birgitta Kolmodin-Hedman, Gunnar Rosén och Peter Westerholm:**  
Exempel på metoder för företagshälsovården.
35. **Vesa Riihimäki:**  
NEG and DEC Basis for an Occupational Health Standard: Ethyl Acetate.
36. **Anders Kjellberg:**  
Inte bara hörselskador. Psykologiska effekter av buller i arbetsmiljön.
37. **Agneta Löf, Christina Brohede, Elisabeth Gullstrand, Karin Lindström, Jan Sollenberg, Kent Wrangskog, Mats Hagberg och Birgitta Kolmodin-Hedman:**  
Andningsskyddens effektivitet vid styrenexponering på en plastbåtsindustri.
38. **Gun-Britt Berglund, Lennart Lundgren, Lizbet Skare och Gunnel Sundström:**  
Analys av kvarts i lungvävnad.
39. **Carola Lidén:**  
Yrkeshudsjukdomar av filmkemikalier. Särskilt kontaktallergi och lichenoid reaktion av färgframkallningsämnen.
40. **Jan-Olof Levin (ed):**  
Principer och metoder för provtagning och analys av ämnen upptagna på listan över hygieniska gränsvärden.
41. **Ulf Landström:**  
Vakenhet, sömnlighet och insomningsrisker under fordonskörning.
42. **Tom Hagström:**  
Ungdomars livsstilar och förhållningssätt till arbete.
43. **Anders Jansson:**  
Local exhaust ventilation and aerosol behaviour in industrial workplace air.
44. **Ingvar Lundberg, Annika Gustavsson, Margareta Högberg och Gun Nise:**  
Alkohol diagnoser och andra neuropsykiatriska diagnoser hos byggnadsmålare jämfört med byggnadssnickare.
45. **Anton A. E. Wibowo:**  
DEC and SCG Basis for an Occupational Health Standard. Talc dusts.

46. **Bodil Persson:**  
NIOH and NIOSH Basis for an Occupational Health Standard. Chlorocresol.
47. **Kristina Kemmlert, Margareta Dallner Örelius, Åsa Kilbom och Francesco Gambareale:**  
Treårsuppföljning av 195 arbetsskadeanmälningar av belastningskaraktär.
48. **Helena Keskinen:**  
Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation. 92. Organiska syraanhydrider.
49. **Harri Vainio:**  
Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation. 93. Styren.

1991:

1. **S. Krantz, J. W. Cherrie, T. Schneider, I. Öhberg and O. Kamstrup:**  
Modelling of past exposure to MMMF in the European rock/slag wool industry.
2. **Brita Beije and Per Lundberg (Eds):**  
Criteria Documents from the Nordic Expert Group 1990.
3. **Tomas Lindh och Lars-Inge Andersson:**  
Elektriska och magnetiska fält i elkraftindustri.
4. **Marianne Byström, Ulf Landström och Anders Kjellberg:**  
Effekterna av ljudets frekvens och arbetets karaktär på störningsgraden under bullerexponering – studier av rena toner.
5. **Göran M. Hägg:**  
Zero crossing rate as an index of electromyographic spectral alterations and its applications to ergonomics.
6. **Jan Ahlin och Gunnela Westlander:**  
Kontorslokaler och kontorsarbete – två perspektiv på kontoret som arbetsplats.
7. **Ed. Per Lundberg:**  
Vetenskapligt Underlag för Hygieniska Gränsvärden 11.
8. **Ed. Per Lundberg:**  
Scientific Basis for Swedish Occupational Standards XI.
9. **Göran Pershagen och Marie Vahter:**  
Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation. 94. Organisk arsenik.
10. **Gunh. Mellström:**  
Protective gloves of polymeric materials. Experimental permeation testing and clinical study of side effects.
11. **Ulf Landström, Anders Kjellberg, Per Löfstedt och Lena Söderberg:**  
Ventilationsbuller på kontor. Ljudkaraktäristik, exponeringsnivåer och besvärsopplevelser.
12. **Ewa Menckel:**  
Olycksfall. Om forskning och forskningsförmedling vid Arbetsmiljöinstitutet 1987–1990.

## Nordiska Expertgruppen för Gränsvärdesdokumentation

### 99. Mikroorganismer

Per Malmberg

## ARBETE OCH HÄLSA

Redaktör: Irma Åstrand

Redaktionskommitté: Anders Kjellberg, Åsa Kilbom, Nils Stjernberg, Staffan Krantz och Olof Vesterberg.

© Arbetsmiljöinstitutet och författarna.

Arbetsmiljöinstitutet, 171 84 Solna

# Förord

*Vid Arbetsmiljöinstitutet arbetar drygt 300 forskare med arbetslivets miljö. Forskningen leds av 30 professorer. Institutet bedriver i stor utsträckning tillämpad forskning, men vissa problemområden kräver också riktad grundforskning.*

*Institutets vetenskapliga kompetens finns inom sex olika ämnesområden: fysiologi, kemi, medicin, psykologi, teknik och toxicologi. Denna breda kompetens gör att olika problem kan angripas tvärvetenskapligt.*

*Institutet svarar för utbildning av företagsläkare, företagssköterskor, skyddsingenjörer, företagssjukgymnaster och beteendevetare inom företagshälsövården.*

*Information om arbetsmiljöforskning är en annan viktig uppgift för institutet.*

Inom Nordiska Ministerrådets projekt för dokumentation av yrkeshygieniska gränsvärden har bildats en expertgrupp för att leda arbetet. Den består för närvarande av:

- Helgi Gudbergsson Heilsuverndarstödin, Reykjavik
- Petter Kristensen Statens Arbeidsmiljøinstitutt, Oslo
- Per Lundberg (ordf) Arbetsmiljöinstitutet, Solna
- Vesa Riihimäki Institutet för arbetshygien, Helsingfors
- Adolf Schaich Fries Arbejdsmiljøinstituttet, København

Målsättningen för arbetet är att ge ett vetenskapligt underlag inför diskussion om yrkeshygieniskt gränsvärde. Underlaget syftar till att från publicerad vetenskaplig litteratur komma fram till ett dos-respons-/dos-effekt-förhållande och en kritisk effekt, så långt detta är möjligt. Det är däremot inte expertgruppens uppgift att ge direkta förslag till gränsvärden.

Det insamlade materialet värderas och ett dokumentförslag utarbetas av författare som föreslås av expertgruppen. Den nationelle ledamoten fungerar som referent. Förslaget diskuteras av expertgruppen och bearbetas därefter av författaren innan det blir antaget.

Redaktionell granskning sker vid gruppens sekretariat vid Arbetsmiljöinstitutet i Solna. Vetenskaplig sekreterare är Brita Beije.

Endast artiklar som bedömts vara pålitliga och av betydelse för just denna diskussion åberopas i detta dokument.

Biologiska halter är angivna i mol/l eller mg/kg, lufthalter i mg/m<sup>3</sup>. Om halterna i de refererade arbetena ej är uttryckta i dessa sorter är de såvitt möjligt omräknade med angivelse av den ursprungliga sorten inom parentes.

Värderingen av det insamlade materialet och sammanställningen av detta dokument har utförts av professor Per Malmberg, Arbetsmiljöinstitutet, 171 84 Solna.

Dokumentförslaget har vid expertgruppens möte 1991-05-07 antagits som dess dokument.

# Innehåll

1. Introduktion	1
2. Avgränsning av ämnet	1
3. Yrken med höggradig exponering för mikroorganismer	1
4. Typer av mikroorganismer. Cellväggens strukturer	2
5. Toxiner från mikroorganismer	2
5.1 Mykotoxiner	4
5.2 LPS/endotoxin, peptidoglykan, $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan and fmlp	4
6. Försvarsmekanismer	5
7. Skador som orsakas av inandning av mikroorganismer	6
7.1 Allmänna mekanismer	6
7.2 Specifika mekanismer	7
7.3 Sjukdomar/symptom hos människa	9
8. Fysikaliska/kemiska data	10
8.1 Sporer/bakterier	10
8.2 LPS/endotoxin	11
8.3 Peptidoglykan	12
8.4 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan	13
9. Metoder för att samla, karakterisera och räkna mikroorganismer	13
9.1 Insamlingsmetoder, strategi	13
9.2 Karakterisering, kvantifiering	14
9.3 Metoder för analys av LPS, peptidoglykan and $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan	14
10. Omgivningshalter	15
10.1 Faktorer som ökar exponering för mikroorganismer/endotoxin	15
10.2 Mikroorganismer	16
10.3 LPS aktivitet	17
11. Dos-respons	17
12. Diskussion	19
13. Sammanfattning	21
14. Referenser	22

Lista på förkortningar och korta beskrivningar av några termer som används i denna rapport.

#### Termer med anknytning till mikroorganismer

Gram-positiv	Bakterier klassas efter Grams färgningsmetod. Gram-positiva bakterier har en cellvägg som huvudsakligen består av peptidoglykan. Gram-negativa har ett tunt peptidoglykanskikt och ett yttre lager som är rikt på lipopolysackarid.
Peptidoglykan	Komponent i cellvägg på bakterier bäst utvecklade i Gram-positiva bakterier. I regel uppbyggt av repeterande enheter av N-acetylglukosamin-N-acetylmuramin, tvärbundna med korta peptidkedjor. Har inflammatoriska och adjuvans-egenskaper.
Glukan	Komponent i cellvägg på mögelsporer. Består av linjära kedjor av $\beta$ -D-glukos med 1-3 bindningar (tvärbundna i 1-6 position). Har inflammatoriska och adjuvans-egenskaper.
Endotoxin	Toxisk komponent i cellvägg på Gram-negativa bakterier som består av LPS
LPS	<i>Lipopolysackarid</i> —Komponent i cellvägg på Gram-negativa bakterier med huvuddelen av endotoxinets toxiska effekter.
Lipid A	Aktiva komponent i LPS
LAL	<i>Limulus amoebocyte lysate assay</i> —Metod att mäta endotoxin.
fmfp	<i>formyl-metionyl-leucyl-peptid</i> —Bakteriell peptid med för bakteriepeptider unik N-terminal sekvens. Har inflammatorisk aktivitet.
Lektin	Glykopeptider (i regel från växter) som binder till sockerkomponenter på andra molekyler.

#### Termer med anknytning till människans reaktioner på mikroorganismer

Allergisk alveolit	Restriktiv lungsjukdom som orsakas av immunreaktion mot inandade mikroorganismer eller antigen från andra källor.
Adjuvans ODTs	Ökar immunsvar på antigen <i>Organic Dust Toxic Syndrome</i> —En toxisk reaktion med feber orsakad av inandning av vissa typer av organiskt damm.
Komplement	Proteiner som samverkar till upptäckt och försvar mot främmande ämnen via icke-immunologiska eller immunologiska mekanismer.
Opsonisering	Främmande partiklar kläs med antikroppar eller komplement vilket underlättar igenkänning och upptag av fagocyterande celler.
Fagocytos	Många inflammatoriska celler kan "äta upp" – fagocytera – främmande partiklar.
Cytokiner	Ämnen som utsöndras av immunceller, inflammatoriska och andra celler för att kontrollera inflammation, immunreaktioner, tillväxt och sårhäkning bland annat.
LTC-4	<i>Leukotrien C4</i> —Ämne från aktiverade inflammatoriska celler som är bronksammandragande och ger läckage av blodkärl.
IL-1	<i>Interleukin-1</i> —se TNF för förklaring.
TNF	<i>Tumörnekrotisk faktor</i> —IL-1 och TNF är cytokiner med hormonliknande effekter som orsakar feber och akutfasreaktion.
FEV <sub>1</sub>	Forcerat expiratoriskt flöde 1 sekund.

## 1. Introduktion

Mikroorganismer är en förutsättning för högre livsformer. De växer på hud och slemhinnor och krävs för tarmarnas normala funktion. Man kan finna dem nästan överallt på jorden och vi andas in stora mängder av mikroorganismer som finns i omgivande luft. Mikroorganismer kan växa i extrema omgivningar. Vissa trivs vid temperaturer på 80-90 °C och vid pH som är mindre än 2 i varma svavelkällor av vulkaniskt ursprung, andra kan föröka sig nära fryspunkten i arktiska områden. Högre organismer har utvecklat försvarssystem som möjliggör samexistens, men de är ständigt hotade av mikroorganismer som kan överlista världens försvar och åstadkomma infektioner. Skador kan också inträffa utan infektion, som en följd av aktivering av världens försvarsmekanismer.

## 2. Avgränsning av ämnet

Denna rapport tar upp sjukdomar som orsakats av inandade mikroorganismer som inte givit upphov till infektion. Således kommenteras inte yrkesmässig exponering som leder till infektion eller som medför spridning av farliga bakterier från patienter, döda vävnader, diagnostiska laboratorier eller djur. Spridning av genetiskt manipulerade mikroorganismer till omgivningen är också ett ämne som ligger utanför denna rapport.

## 3. Yrken med höggradig exponering för mikroorganismer

Bönder exponeras för höga koncentrationer av mikroorganismer. Svin- höns- och mjölkproducerande lantbrukare har olika exponeringar och sjukdomsproblem (26, 74, 136). Lantbrukare och arbetare som sysslar med produktion, lagring och transport av spannmål samt jäsning av korn i bryggerier riskerar lungsjukdom på grund av inandade mikroorganismer (9, 11, 50). Arbetare som exponeras för träprodukter som bränsleflis och kork, som kan mögla, och arbetare som sysslar med med svampodling eller kompostering riskerar att exponeras för höga halter av mögelsporer (4, 53, 59, 140). Vid beredning av bomull, hampa och lin sker exponering för mikroorganismer och fragment av mikroorganismer, vilket kan skapa hälsoproblem (54, 107).

Inandning av mikroorganismer kan också ske i form av aerosoler från smutsigt vatten i renhållningsverk (72, 120), från skärvätskor eller från luftfuktare i till exempel tryckerier (13, 48).

Damm med höga sporhalter har rapporterats från museer (60). Man har föreslagit att mikroorganismer och fragment av mikroorganismer kan spela roll för de besvär som rapporterats från "sjuka hus", men hittills finns mycket lite belägg för detta.

#### 4. Typer av mikroorganismer. Cellväggens strukturer

Mikroorganismer kan delas in i eukaryoter, som svampar (jäst och mögelsvampar) och prokaryoter, som bakterier. Eukaryoter har ett membran som omger det genetiska materialet (cellkärna), men hos prokaryoter är det genetiska materialet spritt i cytoplasman. Svampar är flercelliga organismer förgrenade i "nät"liknande strukturer (syncytium) som kan bli mycket stora. De kan producera konidier (sporer) som kan spridas långa sträckor i luften. Aktinomycter är bakterier som liknar svampar eftersom de växer i syncytia och kan producera stora mängder med sporer. Sporena är mycket motståndskraftiga. Vid preparering inför elektronmikroskopi används ofta vacuum, vilket medför att flertalet bakterier och jästsvampar kollapsar, men svampsporer bevaras.

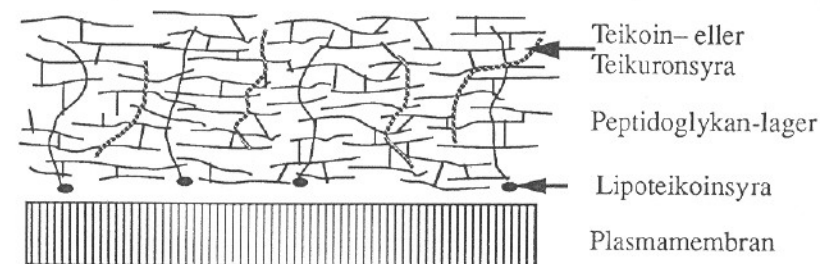
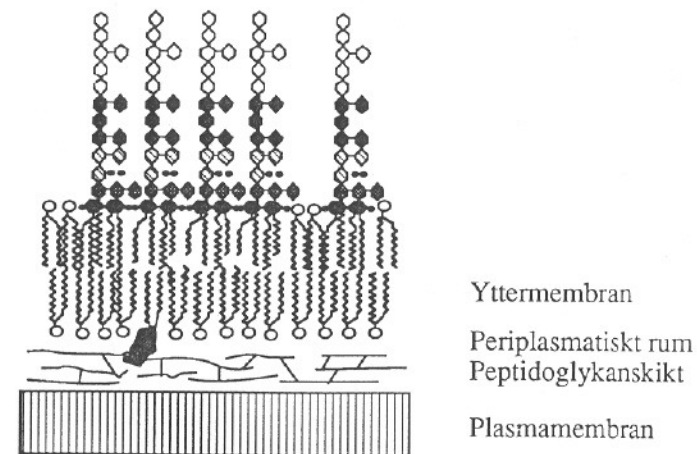
Bakterier kan klassificeras med hjälp av Gram-färgningsmetoden. Bakterier som är Gram-positiva har i cellväggen ett tredimensionellt lager av peptidoglykan, uppbyggt av disackarider tvärbundna med korta peptidkedjor (se sektion 8.3 och figur 1 och 3). Gram-negativa bakterier har ett monolager av peptidoglykan. Dessutom har Gram-negativa bakterier ytterligare tre polymerer utanför peptidoglykanlagret, nämligen lipoprotein, yttermembran och lipopolysackarid (LPS, se sektion 8.2 och figur 1 och 2). Aktinomycter är Gram-positiva bakterier avlägset besläktade med mykobakterier som orsakar tuberkulos hos människan. Vissa bakterier har en yttre kapsel av kolhydrater.

Svamparnas cellvägg består av en rigid kapsel uppbyggd av socker arrangerat i ett nätverk med många förgreningar. Dessutom finns det lösliga komponenter, ofta mannoproteiner och kolhydrater (en starkt förgrenad polymannos), som kan extraheras från cellväggen (16). De strukturella elementen byggs ofta av linjära kedjor av glukos sammanfogade i  $\beta$ -länkar med många korsbindningar. Många svampar har kedjor med poly- $\beta$ -D-glukos med 1 $\rightarrow$ 3 bindningar (tvärbunda i 1 $\rightarrow$ 6 positioner) som kallas glukaner. Andra har 1 $\rightarrow$ 4 bindningar (cellulosa) och åter andra består av poly- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetylglukosamin (chitin). Svampar saknar peptidoglykaner och LPS i sina cellväggar.

Många svampar kan avge luktande ämnen som kan skapa sanitära problem. Metaboliten 2-isopropyl-3-metoxypyrazine från aktinomycteten streptomycetes (39) har en så låg luktröskel som 0,002 ppb (122).

#### 5. Toxiner från mikroorganismer

Många mikroorganismer har beståndsdelar, eller kan utsöndra ämnen, som är toxiska för andra organismer (endo- och exotoxiner). Vissa toxiner används för medicinskt bruk, t. ex. antibiotika och cyclosporin. Det senare används för att minska immunsvaret mot transplanterade organ. Några toxiner kan anses vara medel för hämning eller förstöring av konkurrerande mikroorganismer. Andra toxiner har till funktion att öka förmågan att motstå försvarsmekanismer hos högre organismer.



Figur 1. Cellvägg hos Gram-negativa (ovan) och Gram-positiva bakterier (nedan). Baserad på figur från Sonesson (126), i sin tur baserad på Hammond et al (44) och Rietschel et al (102).

Vissa toxiska effekter beror på att vanligt förekommande strukturella element på mikroorganismerna aktiverar försvarssystem i högre organismer och framkallar en inflammatorisk reaktion. Exempel på strukturer som kan framkalla en försvarsreaktion är lipopolysackarider (LPS eller "endotoxin") hos Gram-negativa bakterier,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan hos många svampar och peptidoglykan hos bakterier.

##### 5.1 Mykotoxiner

Många svampar producerar mykotoxiner (56), vilka kan orsaka sjukdom hos boskap som matats med möjligt foder. Man har även diskuterat om mykotoxin kan orsaka sjukdom hos människor som förtärt eller andats in möjligt material. Vid inandning är toxinmängderna mycket små i jämförelse med de kvantiteter man

exponeras för i samband med förtäring av möjlig föda. En dags arbete i kraftigt kontaminerad luft medför således inandning av storleksordningen µg mikroorganismer.

Svampmyceliet dominerar i det material man äter och sporer dominerar i det man andas in. Sporer kan, jämfört med mycelium, ha högre koncentrationer av vissa mykotoxiner (som Aurasperone C från *Aspergillus (A.) niger*) och lägre av andra mykotoxiner (som aflatoxin från en mutant av *A. parasiticus*) (93). Aflatoxin är ett stark cancerogen för vissa laboratoriedjur och har antagits kunna medföra risker hos människor som andas in damm från möjlig majs eller jordnötter (12, 30, 46). Man har dock nyligen ifrågasatt om aflatoxin är cancerogent hos människa i dessa miljöer (132). Mykotoxinerna verruculogen och fumitremorgen C från vissa *Aspergillus* och *Penicillium* stammar kan orsaka tremor och man har föreslagit att de skulle kunna orsaka tremor i samband med akuta feberreaktioner (65). Visserligen har man visat att några mögelkulturer som isolerats från sågverk kan producera tremorgener, men man har inte visat att de inandade doserna i dessa miljöer är tillräckligt höga för att orsaka symptom. Ochratoxin A som är nefrotoxiskt, hepatotoxiskt och ett cancerogen har demonstrerats i lagrad spannmål och skulle kunna vara en fara för människa som äter föda baserad på möjlig spannmål, men knappast efter inandning av damm från möjlig spannmål (1).

Tricothecen T-2-toxin från fältsvampen *Fusarium*, Patulin och Gliatoxin från *Aspergillus* och *Penicillium* påverkar inflammationsceller så att de får sämre förmåga att bekämpa mikroorganismer (130).

## 5.2 LPS/endotoxin, peptidoglykaner, β-(1→3)-D-glukan och fmlp

Det mest undersökta toxinet från mikroorganismer är LPS (lipopolysackarid) från Gram-negativa bakterier. Lipopolysackarider består av en hydrofil polysackarid som sticker ut från cellväggen och en lipiddel (lipid A) som är inbäddad i det yttre lipidlagret på cellväggen. Lipid A orsakar de flesta, men inte alla, toxiska effekter hos LPS (87). Andra effekter, som komplementaktivering och immunmodulering, kan framkallas av lipidfria extrakt från Gram-negativa celler och från andra ämnen än LPS, vilka kan finnas i en oren LPS preparation (87). Sådana grova preparationer kallas endotoxin, vilket alltså avser ett mindre väldefinierat extrakt med fler biologiska effekter än Lipid A ensamt.

Peptidoglykaner, β-(1→3)-D-glukan och fmlp-liknande peptider (som beskrivs i sektion 7.2 och 7.3), liksom endotoxin, finns i cellväggen hos olika mikroorganismer och har starka biologiska effekter. Dessa effekter orsakas av aktivering av receptorer på inflammatoriska celler som troligen har utvecklats för att identifiera mikroorganismer och aktivera de försvarsmekanismer som krävs för att skydda sig mot dessa.

## 6. Försvarsmekanismer

**Fagocytos:** Plantor har enzymer som kan bryta ned mikroorganismernas cellväggar samt lektiner som binder till kolhydrater på mikroorganismerna och åstadkommer en lokal reaktion som hämmar invasiv växt. Vissa lektiner (som fytohemagglutinin) är också mitogener och används för att få humana immunceller att dela sig in vitro. Hos däggdjur är immunsystemet ofta engagerat i försvaret mot mikroorganismer. Rygggradslösa djur har inte ett fullt utvecklat immunsystem med antikroppar och lymfocyter men de har celler som liknar människans makrofager som kan "svälja" och bryta ned mikroorganismer (123). I människans lungor finns omkring  $5 \cdot 10^9$  makrofager (22). Flertalet finns på ytan i lungornas alveoler (lungblåsor) där gasutbytet äger rum. Makrofager har receptorer som känner igen vanliga cellstrukturer hos mikroorganismer. De inkluderar LPS, peptidoglykan fragment och β-(1→3)-D-glukan. Dessutom finns det receptorer som kan känna igen enkla sockerarter i cellväggarna på mikroorganismer, t. ex. mannos-fukos receptorn (131).

Partiklarna binds först till cellmembranet. Därefter invaginerar cellmembranet och bildar en blåsa inuti cellen (vacuol). Nästa steg är att vacuolen smälter samman med andra vacuoler som innehåller enzymer, som lysozym, vilka kan bryta ner mikroorganismer inuti de sekundära vacuolerna. Efter maximal exponering kan varje alveolär makrofag förtära i genomsnitt 5-10 sporer och maximalt upp till 20 sporer (37). Processen kallas fagocytos.

**Komplementsystemet** är också en betydelsefull faktor som kan känna igen mikroorganismer (105). Det består av ett 20-tal proteiner som samspelar i ett komplicerat mönster så att de täcker ytan på främmande partiklar och avsköndrar kemotaktiska ämnen. Dessa attraherar makrofager och andra inflammatoriska celler. De alveolära makrofagerna har receptorer som känner igen komplementklädda ytor vilket underlättar bindning och upptag av sådana partiklar. Komplement kan också under vissa omständigheter punktera cellmembranet i främmande celler.

**Immun-igenkänning:** Hos högre djur deltar immunsystemet i försvaret mot inandade mikroorganismer. B-lymfocyter producerar antikroppar som riktas mot många olika komponenter i cellväggen på de främmande mikroorganismerna. Främmande partiklar som är klädda med antikroppar känns igen av makrofager, vilka har receptorer som binder till den fria delen av antikropparna (Fc-receptorer). Partiklar som är klädda med komplement eller antikroppar kallas "opsoniserade". Det finns belägg för att komponenter i cellväggar på mikroorganismer också kan öka det cellulära immunförsvaret (88,133,142) samt inducera bildning av "naturliga mördar celler" (118).

**Adjuvansfunktion hos mikroorganismer:** Vid många vaccinationsprotokoll och i experimentella modeller för bildning av antikroppar, används Freunds kompletta adjuvans för att förstärka reaktionen. Den aktiva komponenten är en emulsion av mykobakterier i olja. Mykobakterierna kan ersättas av peptidoglykanfragment och det minsta fragmentet som har adjuvans effekt är muramyl-dipeptiden N-acetyl-

muramyl-L-alanyl-D-isoglutamin (2). Också LPS (82) och  $\beta$ -(1→3)-D-glukan (88, 133) har adjuvanseffekt.

**Motståndsförmåga hos sporer:** Många svampsporer kan försvara sig mot fagocyter (62, 70, 103, 104). Sporer av typ *Aspergillus fumigatus* binds till makrofager i den tidiga fasen av fagocytos, men den följande fasen när partikeln ska internaliseras hämmas av en faktor som produceras av sporer. Många sporer kan hämma den fagocyterande cellens bildning av fria syreradikaler (69). Tre till fyra timmar efter det att sporer har fäst vid makrofager kan man se sporbemängda makrofager lämna alveolarrummet och vandra in i vävnaden. Därefter börjar sporer svälla och bilda mycelknoppar som förebådar tillväxt. I denna fas är sporen känslig för oxidanter och neutrofil-kation-proteiner från polymorfonukleära fagocyter, som rekryteras från blod och ackumuleras där det finns mikroorganismer under tillväxt (69). Risken att drabbas av infektion med svampen *Aspergillus* hos människor och i djurmodeller med svampsjukdom ökar starkt vid defekt funktion hos de neutrofila granulocyterna (70). Levande (viabla) sporer kan finnas i lungorna under veckor efter experimentell inandning av sporer hos djur (66) och de kan odlas från lungvävnadsprov hos människor två dagar efter exponering för stora mängder mögeldamm (34).

## 7. Skador som orsakas av inandning av mikroorganismer

### 7.1 Allmänna mekanismer

**Fagocytos, aktiveringen av inflammatoriska celler:** Receptorerna för LPS, peptidoglykan och  $\beta$ -(1→3)-D-glukan används inte bara för fagocytos av mikroorganismer. De aktiverar också de fagocyterande cellerna, vilket leder till lokal inflammation och systemeffekter på grund av utsvämning av hormonliknande ämnen, cytokiner (58) och andra inflammatoriska mediatorer. Specifik bindning till dessa receptorer ger olika effekter, även om vissa är gemensamma. Antikroppar kan bilda komplex med lösliga antigen från mikroorganismer och dessa komplex kan aktivera komplement. Fragment som produceras genom aktivering av komplement och ämnen som utsöndras av aktiverade makrofager tillkallar andra inflammatoriska celler från blodet.

**Inflammation:** Aktiverade inflammatoriska celler kan ge skador genom fria syreradikaler, enzymer, toxiska proteiner och andra lagrade eller nyproducerade ämnen som utsöndras vid aktivering för att förstöra invaderande celler. Den inflammatoriska reaktionen krävs för försvaret mot mikroorganismer och för läkning av skador, men kan bli överdriven och åstadkomma överdriven skada i vissa situationer.

**Fibros:** En förlängd och intensiv inflammation på grund av inandade mikroorganismer kan leda till fibros med irreversibel skada. Denna process kräver samverkan mellan olika inflammatoriska celltyper. Makrofager är högradigt aktiverade,

möjligen som en följd av gamma-interferon, utsöndrat av aktiverade T-lymfocyter (82). Faktorer som kan påverka reaktionen är dosen och durationen av exponering för adjuvans och antigen.

### 7.2 Specifika mekanismer

**Inandning av sporer:** Upprepad inandning av stora doser mögeldamm orsakar inflammation i luftvägar och lungblåsor hos människor. Denna inflammation utmärks av lymfocytos och ökat antal mastceller (7). Det initiala svaret efter en kraftig exponering kan domineras av neutrofiler i bronkoalveolärt lavage (67).

Hos försöksdjur kan intratrakeal tillförsel av sporer från *Aspergillus fumigatus* resultera i invasiv tillväxt av svampen, ackumulering av neutrofiler och nekros i lungan där man kan påvisa svampmycel. Några arter av svampen tycks vara mer toxiska än andra. Man kan finna levande sporer i lungorna ännu tre veckor efter exponeringen. Tre veckor efter enstaka exponering ser man en kronisk granulomatös förändring i lungan med makrofager och jätteceller (66). Marsvin som, dagligen, exponeras för damm från mögligt hö under några veckor har initialt ökat antal makrofager och neutrofiler och efter tre veckor sker en kraftig ökning av antalet lymfocyter (36).

**Inandning av endotoxin:** Efter inandning av endotoxin aktiveras alveolarmakrofager som blir adheranta och utsöndrar neutrofil kemotaktisk faktor (139) och "platelet activating factor" (109). Detta följs av ett kraftigt inflöde av granulocyter, först till interstitiet (maximum 4-12 timmar) och därefter till luftvägarna (139). Efter upprepade exponering normaliseras granulocytosen (36). Utsöndring av "platelet activating factor" minskar också efter upprepade exponering och det dröjer upp till 72 timmar innan man helt återvinner förmågan att utsöndra "platelet activating factor". Elastasnivån ökar i lunglavagevätska från råttor och den bronkiella reaktiviteten ökar ungefär samtidigt som granulocyterna ansamlas i interstitiet, dvs innan de uppträder i alveolerna (96). Intravenös infusion av endotoxin ökar den bronkiella reaktiviteten hos lamm (51).

Inandning av LPS ökar också prostaglandin E2 och tromboxan B2, men inte prostaglandin F2 i perifert blod. Vidare sker en kraftig sekvestrering av granulocyter och blodplättar i lungornas kapillärer, cell infiltration till interstitiet samt kapillärläckage till interstitiet, men inte till alveolerna. Endotelceller uppvisar skador med ökat antal pinocytotiska vesicler (15).

När endotoxin binds till sina receptorer aktiveras fagocyterande celler, vilka producerar fria syreradikaler, "platelet activating factor", leukotriener, interleukin-1, tumörnekrotisk faktor och andra cytokiner (82). Interleukin-1 och tumörnekrotisk faktor kan orsaka allmänsymptom som feber. LPS potentierar också effekter av andra cellaktiverare. LPS kan aktivera komplement. Efter intravenös injektion (10) eller inhalation av en aerosol av LPS (15) krävs närvaro av komplement för vissa, men inte alla, LPS effekter. Särskilt sekvestrering av neutrofiler och blodplättar i lungkapillärer kräver komplement, men inte den interstitiella ansamlingen av

inflammatoriska celler. Effekt av parenteral tillförsel av endotoxin verkar kräva närvaro av neutrofila granulocyter (10).

Inandning av glukos, peptidoglykan och fmlp liknande peptider: Mycket lite är känt om effekter av inandning av dessa ämnen. De har välkända in-vitro effekter på inflammatoriska celler och glukos och peptidoglykan har starka immunmodulerande effekter efter parenteral administrering. Zymosan är ett extrakt av cellväggar från jästsvampar som används vid bakning. Det är en, sedan länge, välkänd partikulär aktivator av fagocyterande celler. Det består av  $\beta$ -(1→3)-D-glukos och ett mannosprotein. Effekterna beror på glukoskomponenten;  $\beta$ -(1→3)-D-glukos är en effektiv komplementaktivator, men effekterna på inflammatoriska celler kan ses även i frånvaro av komplement och andra opsoniner. Dessa effekter beror troligen på interaktion med en glukosreceptor och inkluderar produktion av leukotriener och syreradikaler, samt tumörnekrotisk faktor. Acylerade glukosfragment är nästan lika potenta som LPS att aktivera de alveolära makrofagerna till produktion av tumörnekrotisk faktor och interleukin-1 (23, 40, 73, 118, 123, 124, 131).  $\beta$ -(1→3)-D-glukos är en potent immunstimulerare. Till och med oral administration av  $\beta$ -(1→3)-D-glukos har kraftiga immunmodulerande effekter (133).

Peptidoglykan: Peptidoglykanfragment kan också fungera som starka adjuvant och potentiella immunreaktioner (2). Om peptidoglykanfragment skyddas mot degrading in vivo kan tillförsel av sådant material resultera i kronisk inflammation och artrit (121).

N-formyl-metionyl-leucyl-fenylalanin (fmlp) liknande peptider: Bakterier producerar en unik, amino-terminal sekvens när de initierar protein syntes. Dessa peptider börjar med sekvensen N-formyl-metionyl-, innan resten av serien fortsätter. Denna speciella peptidsekvens identifieras av receptorer på fagocyter. Peptiderna är kraftigt kemotaktiska och kan locka makrofager till bakterien (14). Fmlp-liknande peptider kan också aktivera bildning av fria syreradikaler som kan döda bakterier (6). Den mycket potenta peptiden fmlp är ett viktigt redskap i studiet av fagocyter.

### 7.3 Sjukdomar/symptom hos människa

Det finns många sjukdomar/symptom som anses orsakade av inandade mikroorganismer. Dessa inkluderar

- 1) Allergisk alveolit
- 2) Febrila reaktioner (Organic dust toxic syndrome, ODTS)
- 3) Kroniska inflammatoriska förändringar i luftvägarna med tryckkänsla i bröstet, hosta och "måndags besvär"
- 4) "Mukös membran irritation"
- 5) Allergisk astma och rhinit

Allergisk alveolit orsakas av inandning av svamp eller aktinomycetsporer eller av damm som innehåller fågelträck. Den senare sjukdomen förekommer huvudsakligen i hemmiljö, och förefaller vara ovanlig bland personer som sköter höns (83).

Allergisk alveolit av mögeldamm ses vanligen efter hög och upprepad exponering (98) och är vanligast i yrken där mögeldammexponering kan vara mycket hög, som i lantbruksarbete, i samband med hantering av möglig bränsleflis (59) eller i justerwerk på sågar där virkestorken är defekt (5). Sjukdomen har rapporterats från skiftande miljöer (119) och många olika typer av mikroorganismer har ansetts orsaka sjukdomen, inkluderande Gram-negativa bakterier (29). Om man tillämpar strikta kriterier för diagnosen förefaller incidensen vara ganska låg (2-4 per år per 10 000 skandinaviska bönder) (75, 134). Många bönder har tecken på immunstimulering efter inandning av mikroorganismer, men har normal lungfunktion och god prognos (21, 76). Allergisk alveolit är en allvarlig restriktiv lungsjukdom med ett långdraget förlopp och leder ofta till en permanent nedsättning av lungfunktionen (20, 84).

Febrila reaktioner karakteriseras av feber och frossa, ibland muskel- och ledsmärta samt sjukdomskänsla som liknar allmänsymptom vid influensa (34, 77, 99). Febrilreaktioner är 30 till 50 gånger vanligare än allergisk alveolit i lantbruksmiljö (75) och inträffar vanligen efter höggradig exponering för svamp- och aktinomycetsporer (34, 76, 77). Toxiska symptom uppträder också i omgivningar med låggradig exponering för svampsporor och låg prevalens av allergisk alveolit, som i kardrum i bomullsfabriker (106), i tryckerier där man använder luftfuktare som inte har rengjorts (33, 48, 112) och i svinhus (26). Toxiska reaktioner förefaller inte förutsätta sensibilisering mot dammet.

Efter en toxisk reaktion finns en kraftig ökning av neutrofila granulocyter i lavagevätska från lungorna (67) och man kan finna en övergående lätt sänkning av lungfunktionen (77). Symptomen kan också uppträda efter en inandning av ren LPS (17, 18, 78, 109). Det är inte känt om peptidoglykaner eller  $\beta$ -(1→3)-D-glukos kan orsaka liknande symptom efter inandning.

Kroniskt inflammatoriska förändringar i luftvägarna med symptomen tryck i bröstet och hosta kännetecknar sjukdomen byssinos, som man ser hos arbetare i bomullsindustrin. Vid denna sjukdom förekommer obstruktiv nedsättning av lungfunktionen över arbetsskift (107, 116). Lantbrukare har också ökad frekvens kronisk hosta med upphostning. Dessa symptom har rapporterats från mjölkproducerande bönder (74), i svinhus (26) och hos personer som exponeras för spannmålsdamm (50). Symptomen kan delvis bero på exponering för mikroorganismer (107, 110), men på grund av den komplexa sammansättningen av dammet är det svårt att dra definitiva slutsatser om betydelsen av mikroorganismer eller komponenter från mikroorganismer som LPS, peptidoglykan och glukos. Endast ett fåtal studier över bronkiell reaktivitet har rapporterats och resultaten är oklara (52, 111). Det är svårt att identifiera orsaker till eventuell hyperreaktivitet, men inandning av stora doser LPS kan medföra lätt ökad bronkiell reaktivitet som troligen är övergående (95, 108).

Allergisk astma och därmed bronkiell hyperreaktivitet har också rapporterats från många omgivningar där det finns mycket mögeldamm, men dessa allergier orsakas av lagringskvalster eller av påsddjur, inklusive häst och ko, snarare än av mikroorganismer (135, 138).



**Mukös membran irritation.** Från många olika miljöer, inklusive "sjuka hus", har man rapporterat symptom som irritation i ögon och besvär från de övre luftvägarna (125). Orsaken är inte känd och kan vara ett resultat av en summering av låtta stimuli från många källor. Det finns mycket lite data som kan belysa en eventuell betydelse av mikrobiella toxiner.

**Allergisk astma och rhinit.** Svampsporer som *Alternaria* och *Cladosporium* är vanligt förekommande i omgivningsluft och kan orsaka eller försvåra allergisk astma och rhinit, men troligen bara hos < 1% av alla med klinisk allergi. Rhinit är den vanligaste formen av allergi mot svamp (71). Astma och rhinit har också rapporterats efter exponering för svampen *Didymella exitialis* i en lantliga miljö (45) och *Wallemia sebi* i husdamm (117).

## 8. Fysikaliska/kemiska data

### 8.1 Sporer/bakterier

Svampsporer förekommer i storlekar mellan 2-100 µm, men är normalt mellan 2 – 8 µm, medan aktinomyccer och bakterier i regel är 0,5-1,5 µm. Sporer och bakterier kan vara enstaka eller aggregerade i strängar eller klumpar. I luftprov från lantbruksmiljö var de flesta sporaggregat av respirabel storlek att döma av aggregatens diameter (57). Den aerodynamiska storleken på sporaggregat har inte undersökts. Aktinomyccer är ofta i stor utsträckning aggregerade (31, 57).

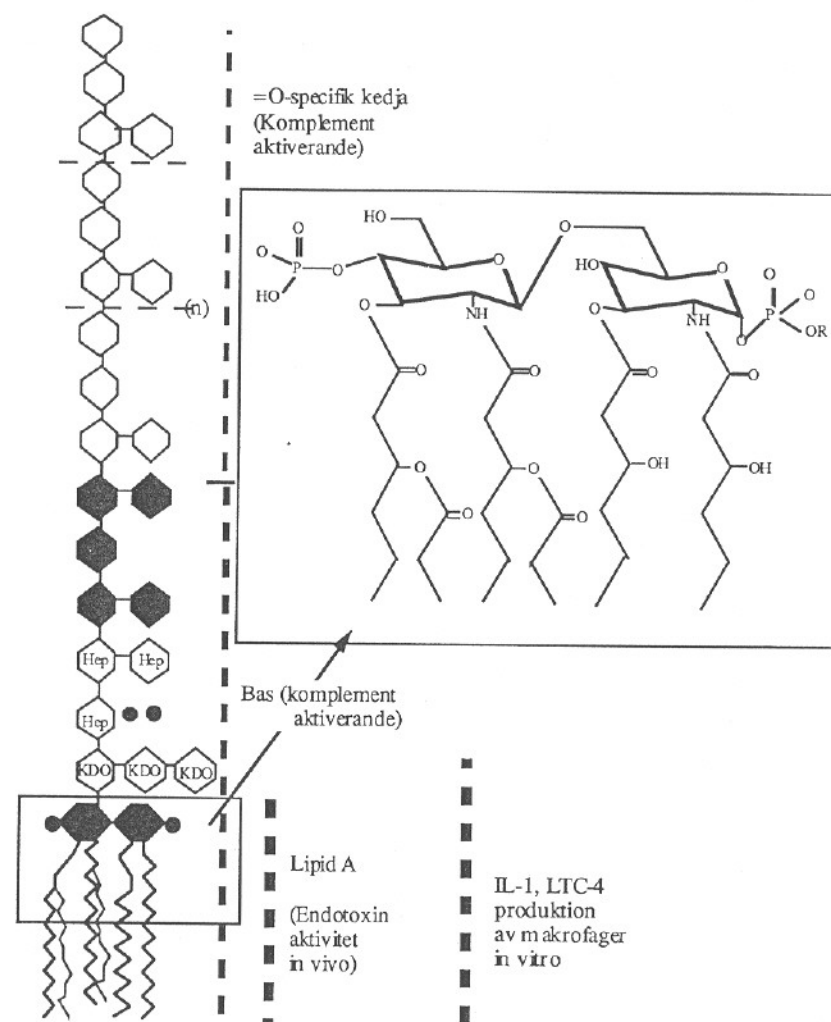
### 8.2 LPS/endotoxin

Den yttre delen av den hydrofila polysackariden i LPS visar stor variabilitet men den inre delen varierar föga. De två innersta sackariderna består normalt av komponenter som bara finns i LPS (L-glycero-D-manno-heptose och 2-keto-3-deoxy-octonsyra, KDO). KDO är ketosidiskt bunden till disackariden i Lipid A och verkar vara obligatorisk i LPS (figur 2).

Den lipofila delen av LPS (Lipid A) hos enterobakterier består av en disackarid (β-1,6 bunden N-acetyl-D-glukosamin, fosforylerad). Till disackariden binds normalt fyra fettsyror, som kan vara förgrenade. Strukturella avvikelser från detta mönster föreligger hos andra Gram-negativa stammar. Fettsyrorerna är 3-hydroxysubstituerade och den vanligaste är 3-hydroxymyristin syra (126). Dessa finns inte i Gram-positiva bakterier eller i svampar och har använts som kemiska markörer för Gram-negativa bakterier (127, 129).

Endotoxinreceptorn på fagocyterade celler reagerar med fri Lipid A i membran och i små membranfragment som avskräps från cellväggen i gram-negativa bakterier (86). Merparten av Lipid A i intakta cellmembran är inte tillgängligt för endotoxinreceptorn och bidrar inte till effekter som orsakas av inandning av gram-negativa bakterier (108). Den minsta beståndsdel som är toxiskt verkande hos Lipid A är den fosforylerade disackariden och hydroxyl och acyloxyacyl grupper i ett

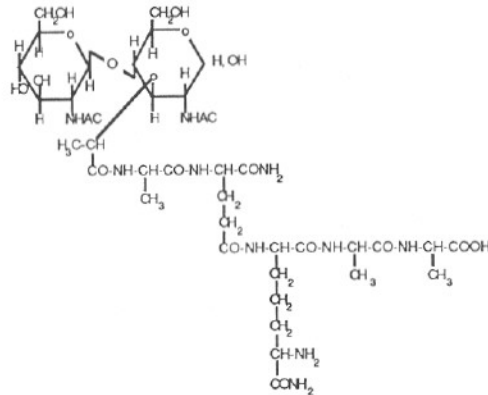
bestämt strukturellt mönster (101). Sammansättning och toxicitet hos lipopolysackarider från olika källor varierar. Några avvikande typer av LPS förefaller inte framkalla typiska endotoxineffekter.



Figur 2. Endotoxin enligt Sonesson (126) baserad på Rietschel (102). Infällt visas lipid A komponenten i *Escherichia coli*, med de två fosforylerade N-acetyl-D-glukosaminsöckren.

### 8.3 Peptidoglykan

Peptidoglykan finns i cellväggen hos alla bakterier och alltså också hos aktinomycceter. De byggs normalt upp av repeterande N-acetylglukosamin-N-acetylmuraminsyra och är tvärbunda via korta peptidfragment. Hos Gram-negativa bakterier är diaminopimelinsyra (DAP) den vanligaste tvärbindande aminosyran. Hos Gram-positiva bakterier är lysin vanligare vid förgreningarna (126). En disackarid-pentapeptid som man får genom enzymatisk nedbrytning av peptidoglykan (figur 3) har immun-modulerande och tumoricida effekter, medan disackariden är inert (137).



Figur 3 Disackarid-pentapeptid GlcNAc-L-Ala-D-isoglutaminyl-meso-diaminopimelyl-D-Ala-D-Ala från *Brevibacterium divaricatum*.

### 8.4 $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukan

Effekten av glukantpartiklar på fagocyterande celler kan inhiberas av poly- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glukossträngar med minst 7 glukosenheter. Vid fagocytos av glukantpartiklar uppkommer troligen kontakt med mer än en glukantreceptor på makrofagen och den deformation som orsakas av kontakten kan tänkas bidra till effekterna. Kravet på 7 glukosenheter för igenkänning och effekt gör att receptorn avviker från andra socker-receptorer som till exempel känner igen en galaktosrest i glykoproteiner (23, 40).

## 9. Metoder för att samla, karakterisera och räkna mikroorganismer i luftprover

### 9.1 Insamlingsmetoder, strategi

Många metoder används för att kvantifiera och karakterisera mikroorganismer i luftprover. Sporer kan samlas på filter, med impinger, cycloner, "slit samplers" och kaskadimpaktorer. Mikroorganismer kan karakteriseras efter morfologi med ljus- (41), fluorescens- (94) eller elektronmikroskop (32, 47, 57) eller genom odling vid olika temperaturer och på olika media.

Insamlingsstrategin beror på de frågor man ställer. Många Gram-negativa bakterier är känsliga för uttorkning och Gram-negativa bakterier kan dö på membran filter under insamlingen. Om man vill studera Gram-negativa bakterier med odling är därför impinger eller impaktorer att föredra. I omgivningar där man hanterar möjligt material dominerar normalt sporer från svampar och aktinomycceter. De är motståndskraftiga mot intorkning och särskilt i omgivningar med mycket höga sporkoncentrationer rekommenderas filter insamlare.

Traditionella inpaktionssamlare där infångningsplattorna också används för odling har många nackdelar. De blir lätt överlastade (61) och tillåter bara ett medium för odling av mikroorganismerna. Impaktionsmetoden kan modifieras genom att insamlingsgelen görs löslig följt av inkubering av infångade sporer på olika medier (8). Filterkassetter kan transporteras med post utan nämnvärda förluster av sporer från filterna, under förutsättning att dessa inte är överbelastade (31).

Polykarbonatfilter används ofta eftersom de ger en god bakgrund vid mikroskopi.

Hantering av möjligt material leder ofta till extrema exponeringar som kan utgöra huvuddelen av en dagsdos, även om det aktuella arbetsmomentet är kortvarigt (10 minuter). Det är därför viktigt att man försöker lokalisera och reproducera den situation som åstadkommer sådana maximala exponeringar ("värsta fallet" strategi). Detta innebär att den som är ansvarig för mätningarna bör ha ingående kunskaper om faktorer som påverkar mögeltillväxt, eftersom till exempel lantbrukare kan ha svårigheter att bedöma vilken aktivitet som ger högsta exponeringen (61). Dammolnet som skapas vid hantering av möjligt material påverkas av många lokala omständigheter. Därför kan bara insamling med personburen utrustning i representativa situationer ge acceptabla uppskattningar av den personliga exponeringen.

### 9.2 Karakterisering, kvantifiering

Kvantifiering av mikroorganismer kan avse "kolonibildande enheter" (cfu) vid odling, totala sporhalten eller sporinnehållande partiklar mätta med mikroskopi (31, 57).

Svampsporer kan mätas direkt på insamlingsfiltret med optisk mikroskopi eller med svepelektronmikroskopi. Särskilt med den senare metoden kan man också få en viss karakteristik av sporer. Metoderna är också lämpade för att studera aggregat av sporer (31, 57). En nackdel med elektronmikroskopi är att bakterier

(andra än aktinomyceter) och jästsvampar ofta kollapsar vid preparationen inför mikroskopin. Mikroorganismer kan extraheras från insamlingsfiltret, färgas med fluorescent färgämne (acridinorange), återfiltreras och analyseras i fluorescensmikroskop (94). Med denna metod är det lättare att upptäcka små aktinomyceter och bakterier än med optisk mikroskopi, särskilt om bakterierna har fastnat på andra partiklar. Å andra sidan kan extraktionsproceduren medföra förluster och sporaggregat kan brytas upp (31).

Mikroorganismer som extraheras från filter, impinger, cycloner eller som impakteras på geler kan också karakteriseras med odling. Många olika typer av media krävs för att få de viktigaste typerna av mikroorganismer att tillväxa. Osmofila svampsporer kräver medier med låg vattenaktivitet (61). Medierna inkuberas ofta dels vid rumstemperatur och dels vid höjd temperatur (45-55 °C).

### 9.3 Metoder för analys av LPS, peptidoglykaner och $\beta$ -(1→3)-D-glukan

Den ursprungliga metoden för analys av LPS beskrevs 1964 (68). Den baserades på koagulation av ett extrakt från blodkroppar hos *Limulus polyphemus* (dolksvans hästsko krabba) i närvaro av endotoxin. *Limulus* amebocyte lysate (LAL) metoden har ersatt pyrogentest på kaniner för att påvisa föroreningar i infusionslösningar. Endotoxin analyseras med LAL metoden som mäter lipid A aktivitet snarare än endotoxin. Metoden är mycket känslig och senare tids kromogena versioner (38) kräver extrem spädning av dammprover för att få läsbara resultat. Testet kräver kännedom om olika faktorer som kan påverka utfallet som inhibitorer, aggregation och adsorptionsfenomen (38, 97). Den baseras på en biologisk princip och olika extrakt kan ge olika resultat. Därför krävs en intern standard. Det finns olika typer av sådana interna standarder.

LAL metoden ansågs ursprungligen vara mycket specifik. Peptidoglykaner kan påverka resultatet men bara i koncentrationer som är  $10^3$ - $10^4$  gånger högre än LPS (79). Ett av enzymsystemen i vissa *limulus* extrakt är känsliga för nanogram-mängder av glukaner (81). Det enzym som reagerar med glukän kan avlägsnas och genom att analysera prov med den ursprungliga och den modifierade LAL metoden kan man få ett indirekt mått på glukankoncentrationen (35).

Av detta följer att prover som domineras av andra mikroorganismer än Gram-negativa bakterier kan ge falskt höga LPS värden med den ursprungliga LAL metoden. Man har beskrivit kemiska metoder att identifiera komponenter som är unika för olika klasser av mikroorganismer (80, 126). Således kan 3-hydroxy fett-syror från LPS halogeneras och mätas med gas kromatografi och masspektrometri eller med tvådimensionell kromatografi med elektroninfångningsmetod.

Kemiska metoder resulterar i ungefär tio gånger högre LPS halter än LAL metoden vid analys av Gram-negativa bakterier (108, 127). Detta kan förklaras av att kemiska metoder mäter all Lipid A i bakterien medan LAL metoden förmodligen bara reagerar med fri Lipid A. Genom att direkt analysera filter med damm och

extrakt från filter har man fått data som tyder på att damm som innehåller LPS extraheras ofullständig med standard proceduren.

Man kan också analysera peptidoglykaner med gaskromatografi genom att använda D-alanin eller diaminopimelinsyra som markörer (127). Metoderna för kemisk analys av LPS och peptidoglykan kräver ytterligare verifiering innan de kan anses ha fått allmän acceptans. Glukan är en polyglukos och kan inte analyseras med de kemiska metoder som beskrivits ovan. Den LAL-baserade enzymatiska metoden kräver också ytterligare studium.

## 10. Omgivningshalter

### 10.1 Faktorer som ökar exponering för mikroorganismer och endotoxin

När ett finfördelat organiskt material, som bränsleflis och spannmål, lagras fuktigt med tillgång till luftens syre kan en kompostreaktion inträffa. Detta leder till mycket kraftig tillväxt av mikroorganismer och medför en ökad temperatur. Processen underlättas av varm fuktig omgivningsluft och om komposthögen är tillräckligt stor för att fungera som en värmeisolator. Material som genomgått en kompostreaktion innehåller höga halter termotoleranta eller termofila mikroorganismer (63). Många är sporbildande och sporproduktionen ökar vanligen när komposten så småningom torkar upp. När man hanterar sådant torkat mögligt material fylls luften av sporer (64). Luftburet damm domineras av mögel och aktinomycetsporer, medan hyffragment och andra bakterier förekommer i lägre halter (57). Gram-negativa bakterier är vanliga i fuktiga omgivningar, och föredrar fritt vatten. De utgör en liten andel av mikroorganismerna i damm från material som har genomgått en kompostreaktion. Bakterier, både Gram-positiva och Gram-negativa, finns i höga halter i till exempel lantbruksmiljöer där det finns intorkad avföring.

### 10.2 Mikroorganismer

Mikroorganismer i olika miljöer. Mikroorganismer som *Cladosporium*, *Alternaria* och *Fusarium* växer saprofytiskt på levande växter (fältflora) och är de vanligast förekommande svampsporer i normal omgivningsluft (63, 85).

De vanligaste svampsporer i lantbruksmiljö kommer från lagerskadesvampar som hör till de närliggande *Aspergillus* och *Penicillium* släktena. De vanligaste aktinomyceterna är *Streptomyces* spp., *Teramoaktinomyces vulgaris* och *Faenia rectivirgula* (tidigare benämnd *Micropolyspora faeni*) (31, 57, 61). I luftprov från spannmållsilon är svamp- och aktinomycetsammansättningen likartad (85). I sågverk är svampar som *Rhizopus rhizopodiformis* och *Paecilomyces variotii* vanligare (31, 32). Ofta dominerar en eller två sportyper i ett prov (57). Svamparna *Aspergillus umbrosus* och *Aspergillus fumigatus* samt aktinomyceterna

*Thermoactinomyces vulgaris* och *Faenia rectivirgula* (47) utpekade ibland som särskilt benägna att orsaka allergisk alveolit (90).

I till exempel höns- och svinhus kommer många mikroorganismer från djurens och fåglarnas avföring. I avföring är Gram-positiva bakterier som cocci, sporbildande bacilli och corynebakterier vanliga, samt Gram-negativa enterobakterier.

I bomullsdamm och spannmålsdamm från material som inte är möjligt är Gram-negativa bakterier vanligt förekommande och kan utgöra majoriteten av mikroorganismerna (27, 115). Gram-negativa bakterier är ofta vidhäftande och kan finnas på stora icke-respirabla partiklar av organiskt ursprung. Bakterien *Enterobacter agglomerans* (syn: *Erwinia herbicola*) har föreslagits som en möjlig orsak till sjukdom, eftersom den är rik på endotoxin och vanligt förekommande, särskilt i spannmålsdamm (28).

**Halter av mikroorganismer i luften:** Mycket höga sporhalter har uppmätts i i luftprover från omgivningar där möjligt material hanteras (57, 63, 64, 76).

Koncentrationen kan överskrida  $10^{10}$  sporer per  $m^3$  luft (57). Aerosoler från möjligt material domineras av sporer från svampar och aktinomyceter (63).

I en studie från Finland var luftkoncentrationen av svamp- och aktinomycet-sporer högre under arbete med hö, strå eller spannmål hos lantbrukare som hade fått allergisk alveolit än i referensjordbruk. Nivåerna var  $10^4$ - $10^7$  cfu/ $m^3$  (impaktor) och skillnaden var signifikant för *Thermoactinomyces* (*T*) *vulgaris*, *Faenia rectivirgula* och *Aspergillus umbrosus* (61).

Luften i flertalet ladugårdar, i svin- och höns hus innehåller mellan  $10^4$  till  $10^8$  mikroorganismer/ $m^3$  (25, 28). Det är mycket mer än utomhus eller i andra inomhusmiljöer, inklusive "sjuka hus" där mögel påvisats. Således brukar luft i "sjuka hus" innehålla mellan  $10^1$  och  $10^4$  cfu/ $m^3$  (49). Totalhalten mikroorganismer i ett kontor kan vara 10 till 100 gånger högre än cfu innehållet, och är vanligen mellan  $10^4$  och  $10^5$  sporer/ $m^3$  (G. Blomquist, personligt meddelande).

### 10.3 LPS aktivitet

LPS aktivitet i luftprov har rapporterats från många omgivningar. Dessa inkluderar svinhus, spannmålsilo, silo för våt "anaerob" lagring av lantbruksprodukter, ladugårdar, höns hus, lokaler med felaktiga luftfuktare, reningsverk, etc. Den uppmätta LPS aktiviteten kan komma från cellrester snarare än från Gram-negativa celler, eftersom dessa lätt torkar ut och dör. I en undersökning från en silos fanns den största delen av endotoxinaktiviteten (>75%) tillsammans med partiklar som hade aerodynamisk diameter  $\geq 9 \mu m$  (92). Tabell 1 ger en lista på resultat från olika undersökningar.

Tabell 1.

	Endotoxin $\mu g/m^3$ medel (SD) [range]	antal mät- platser(prov)	referens
Spannmålsilo	{0-0,008}	7	(24)
Silo, tömning av möjligt toppskikt	{0,1-8,8}	5	(92)
Hönsslakteri	{0,6-0,9} <sup>a</sup>	2	(91)
Hönsslakteri	{0,03-0,8} <sup>b</sup>	3(61)	(128)
Hönshus	0,3 {0,1-0,5}	7(14)	(19)
Hönshus, tömning av burar	1,09 (0,8)	11	(136)
Hönshus, div. aktivitet	{0,13-0,45} <sup>c</sup>	4(14)	(136)
Svinhus	0,12 {0,04-0,28}	8(18)	(19)
Svinhus	0,13 (0,002){0,02-0,4} <sup>d</sup>	166	(3)
Svinhus	0,24 (0,2){0,02-1,1}	28	(25)
Svinhus	{0,02-1,9}	8	(43)
Tryckeri, problem med luftfuktare	{0,01-0,04}	3	(112)
Bomullsspinneri, kardrum	0,46(0,00) <sup>e</sup>	10	(113)
Bomullsspinneri, spinnerum	0,20(0,17) <sup>e</sup>	18	(113)

<sup>a</sup>Tio dagars vägt medelvärde över arbetsdag från två platser. <sup>b</sup>Geometriskt medelvärde från tre olika platser, max värde 2,8  $\mu g$ . <sup>c</sup>medelvärde från 4 platser. <sup>d</sup>Geometriskt medelvärde (GSD). <sup>e</sup>Vertical elutriator.

## 11. Dos-respons

**Allmänna synpunkter:** Man måste tillföra mycket högre dos av mikroorganismer eller LPS via andningsvägarna för att få samma skadeverkan som när det tillförs parenteralt. Andra faktorer, som tobaksrök, kan förändra svaret. Många dos-respons bedömningar har gjorts från omgivningar med blandad exponering och resultaten är därför svåra att generalisera. Hela eller partikulära fragment av mikroorganismer är en mer relevant exponering än ren LPS, vilken sannolikt behandlas in vivo på ett annat sätt än partikelbunden LPS.

Det kan inte uteslutas att viabiliteten av till exempel *Aspergillus fumigatus* sporer påverkar reaktionen och det finns tecken på att individuella stammar kan ha olika effekter. I en första analys kan man skilja mellan exponering för svampar, aktinomyceter, andra Gram-positiva bakterier samt de Gram-negativa bakteriernas endotoxin.

**Endotoxin:** Effekter av endotoxin har studerats i djur- och humanförsök, dels genom inandning av LPS eller hela bakterier och dels genom att utvärdera fysiologiska reaktioner i olika omgivningar med höga halter endotoxin.

Inandning av 12  $\mu g$  LPS (18) eller 40  $\mu g$  LPS (55) orsakade ingen förändring i FEV<sub>1</sub> och ingen feberreaktion hos friska individer, medan FEV<sub>1</sub> sjönk efter inandning av 80  $\mu g$  (18). Det finns tecken på att personer med inflammatoriska förändringar i luftvägarna kan vara mer känsliga för endotoxin exponering. Patienter med kronisk bronkit hade således symptom vid en lägre dos (40  $\mu g$ ) än friska personer (18). FEV<sub>1</sub> sjönk mellan 5-11% hos astmatiker efter inandning av 22  $\mu g$  LPS, men denna dos orsakade ingen förändring hos friska personer. LPS ökade den bronkiella reaktiviteten hos astmatiker och en lätt men inte signifikant sänkning

inträffade hos friska personer. Förändring av FEV<sub>1</sub> observerades 45 minuter efter inandning av LPS och fortsatte i minst 5 timmar (78).

Personer som inte tidigare exponerats för endotoxin fick inandas 20 µg nebuliserad LPS (från *Enterobacter agglomerans*). Detta förändrade inte FEV<sub>1</sub>, men efter 30 µg noterades en lätt (-1,4%) icke signifikant sänkning av FEV<sub>1</sub> och efter 200 µg sjönk FEV<sub>1</sub> signifikant (-8%). Inandning av hela Gram-negativa bakterier, motsvarande 300 µg LPS enligt kemisk analys (30 µg enligt LAL), gav en något mindre sänkning av FEV<sub>1</sub> (-6%). Den "biologiska dosen" av gram-negativa bakterier ansågs därför motsvara omkring 100 µg av LPS, dvs tre gånger mer än det uppmätta LAL värdet. Vid dosen 30 µg LPS upplever 20-30% av försökspersonerna feberreaktioner, luftvägsirritation och/eller tryckkänsla i bröstet. Efter att ha exponerats för 300 µg LPS, i form av hela celler, upplevde 40-80% liknande besvär (108).

LPS är bundet till cellmembran i omgivningsdamm, vilket medför att man underskattar den totala mängden LPS med LAL testet. Den biologiskt verksamma LPS aktiviteten kan antas vara tre gånger högre än den aktivitet som mättes med LAL-testet enligt de experiment som redovisades ovan (108). I ett experimentellt kardrum i ett bomullsspinneri uppmättes en omgivningshalt på 1,5 µg LPS enligt LAL, vilket under 4 timmars exponering medförde 5% sänkning av FEV<sub>1</sub> (42). Man uppskattade den inandade "biologiska dosen" LPS till 14 µg genom att multiplicera uppmätt LPS med tre och antagandes 50% deposition av nebuliserad dos i lungan. Detta värde kan jämföras med den dos nebuliserad ren LPS som krävs för en motsvarande förändring i FEV<sub>1</sub>. Således krävdes en "biologisk dos" på 28 µg för att åstadkomma motsvarande förändring av FEV<sub>1</sub> efter inandning av ren LPS. Dosen beräknades med korrektion för 30% förlust i nebulisator och med antagandet att 50% av återstoden deponerades i luftvägar/lungor. Den inandade endotoxindosen i kardrummet var alltså hälften av den dos ren LPS som krävdes för samma förändring i FEV<sub>1</sub>. Endotoxinhalt, men inte totaldammhalt, i luft korrelerade med förändringar i FEV<sub>1</sub> över arbetsskift i kardrummet (17, 114). I en sammanställning av flera undersökningar från USA fann man en signifikant relation mellan endotoxinkoncentration i luft (i området 0-0,8 µg) och FEV<sub>1</sub> förändring (i området +0,5 till -9,1 %) (17). Enligt denna rapport krävdes lägre exponering för endotoxin i bomulsdamm för en given påverkan på FEV<sub>1</sub> än i de svenska studierna.

I en dos-effektundersökning från svinhus fanns en korrelation mellan endotoxinhalt och förändring av FEV<sub>1</sub> under ett arbetsskift. Endotoxinhalterna växlade mellan 0,1-1,1 µg/m<sup>3</sup> och FEV<sub>1</sub> förändringen mellan +4 till -6%. Eftersom dammet innehåller mycket Gram-positiva bakterier i denna omgivning kan endotoxinhalten enligt LAL vara falskt hög på grund av inverkan av peptidoglykaner och glukaner (127). LPS bestämningar i luftprov med höga halter svampsporer har också givit värden som kan vara falskt höga på grund av ämnen som interfererar med LAL metoden (100).

Svamp- och aktinomycesporer. Det finns relativt lite information om dos-respons mellan exponering för svamp- eller aktinomycesporer och toxiska symptom

respektive allergisk alveolit. Lantbrukare med allergisk alveolit är ofta exponerade för mellan 10<sup>9</sup> sporer per dag under flera veckor. Inandning av 10<sup>10</sup> sporer under en dag orsakar akuta symptom. Detta motsvaras av storleksordningen 10<sup>9</sup> eller mer sporer per kubikmeter luft.

Råttor som tillförs 10<sup>9</sup> sporer från *Aspergillus fumigatus* intratrakealt visade hög mortalitet 48 timmar efter tillförseln. Det fanns tecken på invasiv växt, ansamling av neutrofila granulocyter och nekros. Tre veckor efter exponeringen uppkom kroniska granulomatösa förändringar med makrofager och jätteceller hos överlevande råttor (66). En dos på 10<sup>5</sup> - 10<sup>6</sup> sporer intratrakealt påverkade inte lungfunktionen hos kortison behandlad mus (141). Marsvin som exponerats fyra timmar per dag, fem dagar i veckan under flera veckor för en aerosol med 10<sup>8</sup> till 10<sup>9</sup> sporer/m<sup>3</sup> fick en lymfocytär granulomatös lungsjukdom som påminner om allergisk alveolit. Kortare exponeringstider (40 minuter) eller lägre aerosolkoncentrationer (10<sup>6</sup> sporer/m<sup>3</sup>) gav inte upphov till sådana förändringar (36).

## 12. Diskussion

Kunskaperna är ofullständiga om de mekanismer som medför att inandning av mikroorganismer ger icke-infektiös inflammatorisk lungsjukdom. Man kan skilja på ett akut inflammationstillstånd och en mera långvarig immunmedierad sjukdom (allergisk alveolit). Dessa tillstånd kan på sätt och vis betraktas som följder av en normal försvarsreaktion mot en extrem exponering för potentiellt skadliga mikroorganismer. Dessa sjukdomar är därför till sin natur helt olika allergisk astma eller rhinit där den sjuke ofta är extremt överkänslig mot vanligt förekommande och fullständigt harmlösa ämnen. De akuta symptomen vid toxisk eller allergisk alveolit medieras sannolikt av basala försvarsmekanismer mot olika klasser av mikroorganismer. Dessa försvarsmekanismer förutsätter inte immunigenkänning, utan verkar via aktivering av receptorer mot vissa gemensamma strukturer på mikroorganismer eller genom icke-specifik komplementaktivering. Man känner bäst till interaktionen mellan LPS och dess receptor på makrofager och man har visat att inandning av LPS i höga doser ger de typiska symptomen för toxiska reaktioner mot damm hos människor. Man har dock inte visat att endotoxin är den enda, eller ens den viktigaste orsaken, till akuta symptom i alla omgivningar där toxiska reaktioner har observerats. Man kan spekulera om β-(1→3)-D-glukan och peptidoglykan kan spela en roll för toxiska reaktioner vid inandning av organiskt damm. Eftersom det inte finns information från provokationsstudier hos människa och det saknas accepterade metoder att mäta halten av dessa ämnen i luft, får slutsatser om dessa ämnens eventuella roll dock anstå tills vidare.

Man har spekulerat mycket kring de antigena egenskaperna i damm som orsakar allergisk alveolit. Det är kanske av större intresse att diskutera förekomst av ämnen med adjuvanseffekter i dammet. Glukan, peptidoglykan och i viss mån även endotoxin har starka adjuvanseffekter som skulle kunna spela roll för immunstimulering efter inandning av mögeldamm. Eftersom det finns så många

frågetecken kring vilka komponenter i organiskt damm som spelar roll för sjukdom är det svårt att ge förslag om mätstrategi. Man kan således idag inte med säkerhet fastslå om det spelar någon roll om mikroorganismerna lever eller inte. Man vet inte om vissa arter av svampar eller bakterier är mera sjukdomsframkallande än andra. Betydelsen av LPS, peptidoglykan och  $\beta$ -(1→3)-D-glukan, ensamma eller i kombination, som riskfaktorer för toxiska och immunmedierade sjukdomar måste ytterligare belysas. Det är angeläget att minska exponeringen för mikroorganismer på många arbetsplatser där exponeringen idag är alltför hög. En enkelt indikator på effekten av förbyggande åtgärder, är att mäta den totala sporhalten eller LPS-aktiviteten beroende på vilken omgivning det är frågan om. Särskilt inom bomullsindustrin finns goda argument för att mäta LPS aktivitet snarare än dammhalt. LPS och total sporhalt är troligen bättre riskindikatorer än totaldamm i lantbruket, men för närvarande kan man inte ange vilken roll dessa ämnen spelar för olika sjukdomar i lantbruksmiljön. Med tanke på att metoden att mäta LPS kan påverkas av andra ämnen som finns i hög koncentration i lantbruket, krävs ytterligare metodkontroll innan LAL-metoden kan rekommenderas i sådana omgivningar.

Olika försök har visat att inandning av flera tiotals mikrogram LPS ger sjukdomssymptom. Omgivningsprov verkar ha en biologisk LPS-aktivitet som kan vara tre gånger högre än uppmätt LPS mängd. Om man andas in damm med en LPS koncentration på ett  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  eller mer under en arbetsdag riskerar man därför att utveckla symptom som orsakats av inandad endotoxin. Den lägsta nivå som ger symptom hos känsliga personer är rimligen lägre. En kortvarig exponering (cirka 10 minuter) för sporkoncentrationer som överstiger  $10^9/\text{m}^3$  medför klar risk för toxiska symptom, men det är inte känt om detta gäller alla slags mikroorganismer.

## Sammanfattning

P. Malmberg. 99. Mikroorganismer. Nordisk expertgrupp för gränsvärdesdokumentation. Arbete och Hälsa 1991:44 pp 1-29.

Inandning av mikroorganismer kan via immunologiska och icke-immunologiska försvarsmekanismer orsaka sjukdomar som allergisk alveolit, feber reaktioner (organic dust toxic syndrom, ODTS), kroniskt inflammatoriska förändringar i luftvägarna, mukös membran irritation, allergisk astma och rhinit. Inflammatoriska celler har receptorer som reagerar mot vanligt förekommande komponenter i cellväggar på mikroorganismer som endotoxin, peptidoglykan och "fmlp-liknande" peptider på bakterier samt  $\beta$ -(1→3)-D-glukan på svampsporor. Detta ger en "toxisk" inflammatorisk reaktion. Upprepad intensiv exponering kan ge allergisk alveolit pg av överdriven immunstimulering. En eller båda av dessa reaktioner har rapporterats från bomullsindustri, olika lantbruksmiljöer, inklusive svin- och hönsproduktion, i samband med hantering av spannmål, vissa träprodukter, arbete med komposter och från kontor med orena luftfuktare.

Nyckelord: mikroorganismer, endotoxin, febril reaktioner, allergisk alveolit, gränsvärde.

## Summary

P. Malmberg. 99. Microorganisms. Nordic Expert Group for Documentation of exposure limits. *Arbete och Hälsa* 1991;44 pp 1-29

Inhalation of microorganisms may cause non-infectious symptoms and diseases by activation of non-immune defence mechanisms and by causing immune responses. The symptoms include allergic alveolitis, febrile reactions (organic dust toxic syndrome, ODTS), chronic inflammatory changes in airways with chest oppression, cough and "monday exacerbation of symptoms", "mucous membrane irritation", allergic asthma and rhinitis. Inflammatory cells have receptors which recognize and respond to common components on microorganisms, such as endotoxin, peptidoglycan and "fmnp-like" peptides on bacteria and  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-glucan on fungal spores. This results in a "toxic" inflammatory reaction which has been reported from many work environments and upon repeated intense exposure the reaction is compounded by immune-reactions causing allergic alveolitis. One or both of these reactions have been reported from the cotton industry, various aspects of farming, including swine and poultry production, from grain handling, some types of wood handling, composting and from offices with unclean humidifiers.

Keywords: microorganisms, endotoxin, febrile reactions, allergic alveolitis, occupational exposure limit.

## Referenser

- 1 Abramson D, Sinha RN, Mills JT. Mycotoxin formation in moist 2-row and 6-row barley during granary storage. *Mycopathologia* 97 (1987) 179-85.
- 2 Adam A, Ellouz F, Ciorbaru R, Petit JF, Lederer E. Peptidoglycan adjuvants: minimal structure required for activity. *Z Immunitätsforsch* 149 (1975) 341-8.
- 3 Attwood P, Brouwer R, Ruigewaard P, Versloot P, de Wit R, Heederik D, Boleij J. A study of the relationship between airborne contaminants and environmental factors in Dutch swine confinement buildings. *Am Ind Hyg Assoc J* 48 (1987) 745-51.
- 4 Avila R, Lacey J. The role of penicillium frequentans in suberosis (Respiratory disease in workers in the cork industry). *Clin Allergy* 4 (1974) 109-17.
- 5 Belin L. Clinical and immunological data on "wood trimmer's disease in Sweden. *Eur J Respir Dis (Suppl)* 107 (1980) 169-76.
- 6 Bellavite P. The superoxide-forming enzymatic system of phagocytes. *Free Radical Biology and Medicine* 4 (1988) 225-61.
- 7 Bjermer L, Engström-Laurent A, Lundgren R, Rosenhall L, Hällgren R. Bronchoalveolar mastocytosis in farmer's lung is related to the disease activity. *Arch Intern Med* 148 (1988) 1362-5.
- 8 Blomquist KG, Ström GB, Strömquist L-H. Sampling of high concentrations of airborne fungi. *Scand J Work Environ Health* 10 (1984) 109-13.
- 9 Blyth W, Grant IW, Blackadder ES, Greenberg M. Fungal antigens as a source of sensitization and respiratory disease in Scottish maltworkers. *Clin Allergy* 7 (1977) 549-62.
- 10 Bringham KL, Meyrick B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* 133 (1986) 913-927.
- 11 Brown MA. NIOH and NIOSH basis for an occupational health standard: grain dust. Health hazards of storing, handling and shipping grain. *Arbete och Hälsa* 14 (1988) 1-63.
- 12 Burg W, Shotwell O, Saltzman B. Measurements of airborne aflatoxins during the handling of contaminated corn. *Am Ind Hyg Assoc J* 42 (1981) 1-11.
- 13 Burge S, Robertson A. Asthma, humidifiers and 'office worker's lung'. *Occup Health (Lond)* 38 (1986) 82-85.
- 14 Burrell R. Immunomodulation by bacterial endotoxin. *Crit Rev Microbiol* 17 (1990) 189-208.
- 15 Burrell R, Lantz RC, Hinton DE. Mediators of pulmonary injury induced by inhalation of bacterial endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 137 (1988) 100-5.
- 16 Cabib E, Bowers B, Sburlati A, Silverman SJ. Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol Sci* 5 (1988) 370-5.
- 17 Castellan RM, Olenchock SA, Kinsley KB, Hankinson JL. Inhaled endotoxin and decreased spirometric values. An exposure-response relation for cotton dust. *N Engl J Med* 317 (1987) 605-10.
- 18 Cavagna G, Foa V, Vigliani E. Effects in man and rabbits of inhalation of cotton dust or extracts and purified endotoxins. *Brit J Ind Med* 26 (1969) 849-54.
- 19 Clark S, Rylander R, Larsson L. Airborne bacteria, endotoxin and fungi in dust in poultry and swine confinement buildings. *Am Ind Hyg Assoc J* 44 (1983) 537-41.
- 20 Cormier Y, Bélanger J. Long-term physiologic outcome after acute farmer's lung. *Chest* 87 (1985) 796-800.
- 21 Cormier Y, Bélanger J, Laviolette M. Persistent bronchoalveolar lymphocytosis in asymptomatic farmers. *Am Rev Respir Dis* 133 (1986) 843-7.

- 22 Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER. Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 125 (1982) 332-7.
- 23 Czop JK, Valiante NM, Janusz MJ. Phagocytosis of particulate activators of the human alternative complement pathway through monocyte beta-glucan receptors. *Prog Clin Biol Res* 297 (1989) 287-96.
- 24 DeLucca AJ, Palmgren MS. Seasonal variation in aerobic bacterial populations and endotoxin concentrations in grain dusts. *Am Ind Hyg Assoc J* 48 (2) (1987) 106-10.
- 25 Donham K, Haglind P, Peterson Y, Rylander R, Belin L. Environmental and health studies of farm workers in Swedish swine confinement buildings. *Br J Ind Med* 46 (1989) 31-7.
- 26 Donham KJ. Health effects from work in Swine confinement buildings. *Am J Ind Med* 17 (1990) 17-26.
- 27 Dutkiewicz J. Exposure to dust-borne bacteria in agriculture. 1. Environmental studies. *Arch Environ Health* 33 (1978) 250-9.
- 28 Dutkiewicz J. Bacteria in farming environment. *Eur J Respir Dis (suppl)* (1987) 71-88.
- 29 Dutkiewicz J, Kus L, Dutkiewicz E, Warren CP. Hypersensitivity pneumonitis in grain farmers due to sensitization to *Erwinia herbicola*. *Ann Allergy* 54 (1985) 65-8.
- 30 Dvorackova I. Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *Br Med J* 3 (1976) 691.
- 31 Eduard W, Lacey J, Karlsson K, Palmgren U, Ström G, Blomquist G. Evaluation of methods for enumerating microorganisms in filter samples from highly contaminated occupational environments. *Am Ind Hyg Assoc* 51 (1990) 427-36.
- 32 Eduard W, Sandven P, Johansen BV, Bruun R. Identification and quantification of mould spores by scanning electron microscopy: Analysis of filter samples collected in Norwegian saw mills. In Dodgson J (Eds). *Inhaled Particles VI*, Pergamon Press, Oxford 1988. 447-55.
- 33 Edwards JH. Humidifier fever. *R Soc Health J* 102 (1982) 7-8.
- 34 Emanuel DA, Wenzel FJ, Lawton BR. Pulmonary mycotoxicosis. *Chest* 67 (1975) 293-7.
- 35 Endo S, Inoue Y, Amano K, Yamada A, Fujii N, Nakamura A, Nagasawa T, Kikuchi M, Taki K, Hoshi S, Inada K, Suzuki M, Yoshida M. Perchloric acid, toxicolor, endospey and miconazole in the early diagnosis and treatment of fungemia. *Clin Ther* 12 (1990) 48-53.
- 36 Fogelmark B, Rylander R, Lacey J. Experimental allergic alveolitis after inhalation of mouldy hay. *J Clin Lab Immunol* 30 (1989) 81-5.
- 37 Ford S, Friedman L. Experimental study of the pathogenicity of aspergilli for mice. *J Bacteriol* 94 (1967) 928-33.
- 38 Friberger P. The design of a reliable endotoxin test. In ten Cate J, Büller H, Sturk A, Levin J (Eds). *Bacterial endotoxins: Structure, biochemical significance and detection with the Limulus amoebocyte lysate test*, Alan R Liss Inc, New York 1985. 139-49.
- 39 Gerber NN. Three highly odorous metabolites from an actinomycete: 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine, methylisoborneol, and geosmin. *J Chem Ecol* 3 (1977) 475-82.
- 40 Goldman R. Characteristics of the beta-glucan receptor of murine macrophages. *Exp Cell Res* 174 (1988) 481-90.
- 41 Gregory PH, Lacey ME. Mycological examination of dust from mouldy hay associated with farmer's lung disease. *J Gen Microbiol* 30 (1963) 75-88.
- 42 Haglind P, Rylander R. Exposure to cotton dust in an experimental cardroom. *Br J Ind Med* 41 (1984) 340-45.
- 43 Haglind P, Rylander R. Occupational exposure and lung function measurements among workers in swine confinement buildings. *J Occup Med* 29 (1987) 904-7.
- 44 Hammond SM, Labert PA, Rycroft AN. *The bacterial cell surface*. Croom Helm, London 1984.
- 45 Harries MG, Lacey J, Tee RD, Cayley GR, Newman Taylor AJ. *Didymella exitialis* and late summer asthma. *Lancet* May 11 (1985) 1063-6.
- 46 Hayes RB, Van Nieuwenhuize JP, Raatgever JW, Ten Kate FJW. Aflatoxin exposures in the industrial setting: an epidemiological study of mortality. *Food Chem Toxicol* 22 (1984) 39-43.
- 47 Heikkilä P, Salmi T, Kotimaa M. Identification and counting of fungal spores by scanning electron microscopy. *Scand J Work Environ Health* 14 suppl 1 (1988) 66-7.
- 48 Hendrick DJ. Contaminated humidifiers and the lung (editorial). *Thorax* 40 (1985) 244-7.
- 49 Holmberg K. Hälsoorisker vid exponering i mögelskadade byggnader. *Läkartidningen* 81 (38) (1984) 3327-33.
- 50 Hurst TS, Dosman JA. Characterization of health effects of grain dust exposures. *Am J Ind Med* 17 (1990) 27-32.
- 51 Hutchinson A, Hinson J, Brigham K, Snapper J. Effects of endotoxin on airway responsiveness to aerosol histamine in sheep. *J Appl Physiol* 54 (1983) 1463-8.
- 52 Iversen M, Dahl R, Juel Jensen E, Korsgaard J, Hallas T. Lung function and bronchial reactivity in farmers. *Thorax* 44 (1989) 645-9.
- 53 Jackson E, Welch KM. Mushroom worker's lung. *Thorax* 25 (1970) 25-30.
- 54 Jamison JP, Langlands JH, Lowry RC. Ventilatory impairment from pre-harvest retted flax. *Br J Ind Med* 43 (1986) 809-13.
- 55 Jamison JP, Lowry RC. Bronchial challenge of normal subjects with the endotoxin of *Enterobacter agglomerans* isolated from cotton dust. *Br J Ind Med* 43 (1986) 327-31.
- 56 Jelinek CF, Pohland AE, Wood GE. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an update. *J Assoc Off Anal Chem* 72 (1989) 223-30.
- 57 Karlsson K, Malmberg P. Characterization of exposure to molds and actinomycetes in agricultural dusts using scanning electron microscopy, fluorescence microscopy and culture. *Scand J Work Environ Health* 15 (1989) 353-9.
- 58 Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 141 (1990) 765-88.
- 59 Kolmodin-Hedman B, Blomquist G, Löfgren F. Chipped wood as a source of mould exposure. *Eur J Respir Dis (suppl)* 154 (1987) 44-51.
- 60 Kolmodin-Hedman B, Blomquist G, Sikström E. Mould exposure in museum personnel. *Int Arch Occup Environ Health* 57 (1986) 321-3.
- 61 Kotimaa MH, Husman KH, Terho EO, Mustonen MH. Airborne molds and actinomycetes in the work environment of farmer's lung patients in Finland. *Scand J Work Environ Health* 10 (1984) 115-9.
- 62 Kurup VP. Interaction of aspergillus fumigatus spores and pulmonary alveolar macrophages of rabbits. *Immunobiology* 166 (1984) 53-61.
- 63 Lacey J. The microflora of grain dusts. In Dosman J, Cotton D (Eds). *Occupational pulmonary disease. Focus on grain dust and health*, Academic Press, New York 1980. 417-440.
- 64 Lacey J, Lacey ME. Spore concentrations in the air of farm buildings. *Trans Brit Mycol Soc* 47 (1964) 547-52.
- 65 Land CJ, Hult K, Fuchs R, Hagelberg S, Lundström H. Tremorgenic mycotoxins from aspergillus fumigatus as a possible occupational health problem in sawmills. *Appl Environ Microbiol* 53 (1987) 787-90.
- 66 Land DJ, Sostaric B, Fuchs R, Lundström H, Hult K. Intratracheal exposure of rats to *Aspergillus fumigatus* spores isolated from sawmills in Sweden. *Appl Environ Microbiol* 55 (1989) 2856-60.
- 67 Lecours R, Laviolette M, Cormier Y. Bronchoalveolar lavage in pulmonary mycotoxicosis (organic dust toxic syndrome). *Thorax* 41 (1986) 924-6.
- 68 Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp* 115 (1964) 265.



- 69 Levitz SM, Diamond RD. Mechanisms of resistance of *aspergillus fumigatus* conidia to killing by neutrophils in vitro. *J Infect Dis* 152 (1985) 33-42.
- 70 Levitz SM, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI, Diamond RD. In vitro killing of spores and hyphae of *aspergillus fumigatus* and *rhizopus oryzae* by rabbit neutrophil cationic peptides and bronchoalveolar macrophages. *J Infect Dis* 154 (1986) 483-9.
- 71 Loidolt D, Gailhofer G, Pongratz M, Ludvan M, Ginter G. Interdisziplinäre betrachtung zum thema "pilzsporeallergie". *Allergologie* 12 (1989) 427-31.
- 72 Lundholm M, Rylander R. Work related symptoms among sewage workers. *Brit J Ind Med* 40 (1983) 325-9.
- 73 Mahauthaman R, Howell CJ, Spur BW, Youlten LJ, Clark TJ, Lessof MH, Lee TH. The generation and cellular distribution of leukotriene C4 in human eosinophils stimulated by unopsonized zymosan and glucan particles. *J Allergy Clin Immunol* 81 (1988) 696-705.
- 74 Malmberg P. Health effects of organic dust exposure in dairy farmers. *Am J Ind Med* 17 (1990) 7-15.
- 75 Malmberg P, Rask-Andersen A, Höglund S, Kolmodin-Hedman B, Read Guernsey J. Incidence of organic dust toxic syndrome and allergic alveolitis in Swedish farmers. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87 (1988) 47-54.
- 76 Malmberg P, Rask-Andersen A, Palmgren U, Höglund S, Kolmodin-Hedman B, Stålenheim G. Exposure to microorganisms, febrile and airway-obstructive symptoms, immune status and lung function of Swedish farmers. *Scand J Work Environ Health* 11 (1985) 287-93.
- 77 May JJ, Stallones L, Darrow D, Pratt DS. Organic dust toxicity (pulmonary mycotoxicosis) associated with silo unloading. *Thorax* 41 (1986) 919-23.
- 78 Michel O, Duchateau J, Sergysels R. Effect of inhaled endotoxin on bronchial reactivity in asthmatic and normal subjects. *J Appl Physiol* 66 (1989) 1059-64.
- 79 Mikami T, Nagase T, Matsumoto T, Suzuki S, Suzuki M. Gelation of *Limulus* Amoebocyte lysate by simple polysaccharides. *Microbiol Immunol* 26 (1982) 403-9.
- 80 Morgan S, Fox A, Gilbert J. Profiling, structural characterization, and trace detection of chemical markers from microorganisms by gas chromatography-mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 9 (1989) 57-69.
- 81 Morita T, Tanaka S, Nakamura T, Iwanaga S. A new (1-3)- $\beta$ -D-glucan-mediated coagulation pathway found in *Limulus* amoebocytes. *FEBS Lett* 129 (1981) 318-21.
- 82 Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 38 (1987) 417-32.
- 83 Müller S, Bergmann K-C, Kramer H, Wuthe H. Sensitization, clinical symptoms, and lung function disturbances among poultry farm workers in the German Democratic Republic. *Am J Indust Med* 10 (1986) 281-2.
- 84 Mönkäre S. Clinical aspects of farmer's lung: airway reactivity, treatment and prognosis. *Eur J Respir Dis :Suppl* 137 (1984) 1-68.
- 85 NIOSH. Microbial flora and fauna of respirable grain dust from grain elevators. Cincinnati, Ohio 1986a.
- 86 Nowotny A. Shedding bacteria. *Biomembranes* 11 (1983) 1-20.
- 87 Nowotny A. Review of the molecular requirements of endotoxic actions. *Rev Infect Dis* 9 (Suppl 5) (1987) S503-S511.
- 88 Obaid KA, Ahmad S, Khan HM, Mahdi AA, Khanna R. Protective effect of *L. donovani* antigens using glucan as an adjuvant. *Int J Immunopharmacol* 11 (1989) 229-35.
- 89 Obayashi T. A new endotoxin-specific assay. *Adv Exp Med Biol* 256 (1990) 215-22.
- 90 Ojanen TH, Terho EO, Mäntyjärvi RA. Comparison of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus umbrosus* antigens in serological tests of farmer's lung. *Allergy* 37 (1982) 297-301.
- 91 Olenchok S, Lenhart S, JC M. Occupational exposure to airborne endotoxins during poultry processing. *J Toxicol Environ Health* 9 (1982) 339-49.
- 92 Olenchok SA, May JJ, Pratt DS, Morey PR. Occupational exposures to airborne endotoxins in agriculture. *Prog Clin Biol Res* 231 (1987) 475-87.
- 93 Palmgren MS, Lee LS. Separation of mycotoxin-containing sources in grain dust and determination of their mycotoxin potential. *Environ Health Perspect* 66 (1986) 105-8.
- 94 Palmgren U, Ström G, Blomquist G, Malmberg P. Collection of airborne micro-organisms on Nuclepore filters, estimation and analysis- CAMNEA method. *J Appl Bacteriol* 61 (1986) 401-6.
- 95 Pauwels R, Peleman P, Van Der Straeten ME. Airway inflammation and non-allergic bronchial responsiveness. *Eur J Respir Dis* 144 (1986) 137-62.
- 96 Pauwels RA, Kips JC, Peleman RA, Van Der Straeten ME. The effect of endotoxin inhalation on airway responsiveness and cellular influx in rats. *Am Rev Respir Dis* 141 (1990) 540-5.
- 97 Pfeiffer M, Weiss A. Removal of LAL-test interfering low molecular weight substances by ultrafiltration. In Watson S, Levin J, Novitsky T (Eds). *Detection of bacterial endotoxins with the Limulus amoebocyte lysate test*, Alan R Liss Inc, New York (1987). 251-62.
- 98 Rask-Andersen A. Pulmonary reactions to inhalation of mould dust in farmers with special reference to fever and allergic alveolitis. *Akademisk avhandling*. Uppsala, 1988.
- 99 Rask-Andersen A, Malmberg P. The organic dust toxic syndrome in Swedish farmers: Symptoms, clinical findings and exposure in 98 cases. *Am J Ind Med* 17 (1990) 116-7.
- 100 Rask-Andersen A, Malmberg P, Lundholm M. Endotoxin levels in farming: Absence of symptoms in spite of high exposure levels. *Brit J Ind Med* 46 (1989) 412-6.
- 101 Rietschel ET, Brade L, Brandenburg K, Flad H-D, De Jong-Leuveninck J, Kawahara K, Lindner B, Loppnow H, Lüderitz T, Schade U, Seydel U, Sidoreczyk A, Tacke A, Zähringer U, Brade H. Chemical structure and biologic activity of bacterial and synthetic lipid A. *Rev Infect Dis* 9 (1987) S527-S536.
- 102 Rietschel ET, Brade L, Schade U, Seydel U, Zähringer U, Kusumoto S, Brade H. Bacterial endotoxins: properties and structure of biologically active domains. In Schrinner E, Richmond MH, Siebert G, Schwarz U (Eds). *Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host*, VCH publishers, Weinheim (1988). 1-41.
- 103 Robertson MD, Seaton A, Milne LJ, Raeburn JA. Resistance of spores of *aspergillus fumigatus* to ingestion by phagocytic cells. *Thorax* 42 (1987) 466-72.
- 104 Robertson MD, Seaton A, Milne LJR, Raeburn JA. Suppression of host defences by *Aspergillus fumigatus*. *Thorax* 42 (1987) 19-25.
- 105 Ross GD. Opsonization and membrane complement receptors. In Ross GD (Eds). *Immunobiology of the complement system. An introduction for Research and clinical medicine*, Vol 87. Academic press inc, London 1986. 87-114.
- 106 Rylander R. The role of endotoxin for reactions after exposure to cotton dust. *Am J Ind Med* 12 (6) (1987) 687-97.
- 107 Rylander R. Health effects of cotton dust exposures. *Am J Ind Med* 17 (1990) 39-45.
- 108 Rylander R, Bake B, Fischer JJ, Helander IM. Pulmonary function and symptoms after inhalation of endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 140 (1989) 981-6.
- 109 Rylander R, Beijer L. Inhalation of endotoxin stimulates alveolar macrophage production of platelet-activating factor. *Am Rev Respir Dis* 135 (1987) 83-86.
- 110 Rylander R, Donham KJ, Hjort C, Brower R, Heederik D. Effects of exposure to dust in swine confinement buildings - a working group report. *Scand J Work Environ Health* 15 (1989) 309-12.
- 111 Rylander R, Essle N, Donham KJ. Bronchial hyperreactivity among pig and dairy farmers. *Am J Ind Med* 17 (1990) 66-9.

- 112 Rylander R, Haglind P. Airborne endotoxins and humidifier disease. *Clin Allergy* 14 (1984) 109-12.
- 113 Rylander R, Haglind P, Butcher BT. Reactions during work shift among cotton mill workers. *Chest* 84 (1983) 403-7.
- 114 Rylander R, Haglind P, Lundholm M. Endotoxin in cotton dust and respiratory function decrement among cotton workers in an experimental cardroom. *Am Rev Respir Dis* 131 (1985) 209-13.
- 115 Rylander R, Lundholm M. Bacterial contamination of cotton dust and effects on the lung. *Br J Ind Med* 35 (1978) 204-7.
- 116 Rylander R, Schilling RSF, Pickering CAC, Rooke GB, Dempsey AM, Jacobs RR. Effects after acute and chronic exposure to cotton dust: the Manchester criteria. *Br J Ind Med* 44 (1987) 577-9.
- 117 Sakamoto T, Urisu A, Yamada M, Matsuda Y, Tanaka K, Torii S. Studies on osmophilic fungus *Wallemia sebi* as in allergen evaluated by skin prick test and radioallergosorbent test. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 90 (1989) 368-72.
- 118 Scaringi L, Marconi P, Bocconeri M, Tissi L, Bistoni F, Cassone A. Cell wall components of *Candida albicans* as immunomodulators: induction of natural killer and macrophage-mediated peritoneal cell cytotoxicity in mice by mannoprotein and glucan fractions. *J Gen Microbiol* (1988)
- 119 Schatz M, Patterson R. Hypersensitivity pneumonitis--general considerations. *Clin Rev Allergy* 1 (1983) 451-67.
- 120 Schira JC, Snella MC, Chapon JL. Demonstration of gram-negative bacteria and endotoxins in the air surrounding a sewage treatment plant: effect of contaminated aerosols on the health status of the staff. *Schweiz Med Wochenschr* 117 (1987) 354-8.
- 121 Schwab JH, Stimpson SA, Bristol LA. Pathogenesis of inflammatory arthritis induced by bacterial peptidoglycan-polysaccharide polymers and lipopolysaccharide. In Schinner E (Eds). Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim., Weinheim 1988. 99-112.
- 122 Seifert RM, Buttery RG, Guadagni DG, Black DR, Harris JG. Synthesis of some 2-methoxy-3-alkylpyrazines with strong bell pepper-like odors. *J Agric Food Chem* 18 (1970) 246-9.
- 123 Seljelid R. Macrophage activation. *Scand J Rheumatol Suppl* 76 (1988) 67-72.
- 124 Sherwood ER, Williams DL, McNamee RB, Jones EL, Browder IW, Di Luzio NR. Enhancement of interleukin-1 and interleukin-2 production by soluble glucan. *Int J Immunopharmacol* 9 (1987) 261-7.
- 125 Skov P, Valbjørn O, Pedersen BV. Influence of indoor climate on the sick building syndrome in an office environment. *Scand J Work Health* 16 (1990) 363-71.
- 126 Sonesson A. Gas chromatographic methods for the analysis of bacterial lipopolysaccharides. Akademisk avhandling. Lunds Universitet, 1990.
- 127 Sonesson A, Larsson L, Fox A, Westerdahl G, Odham G. Determination of environmental levels of peptidoglycan and lipopolysaccharide using gas chromatography with negative-ion chemical-ionization mass spectrometry utilizing bacterial amino acid and hydroxy fatty acids as biomarkers. *Journal of Chromatography* 431 (1988) 1-15.
- 128 Sonesson A, Larsson L, Schütz A, Hagmar L, Hallberg T. Comparison of the limulus amoebocyte lysate test and gas chromatography-mass spectrometry for measuring lipopolysaccharides (endotoxins) in airborne dust from poultry-processing industries. *Appl Environ Microbiol* 56 (1990) 1271-8.
- 129 Sonesson A, Larsson L, Westerdahl G, Odham G. Determination of endotoxins by gas chromatography: evaluation of electron-capture and negative-ion chemical-ionization mass spectrometric detection of halogenated derivatives of B-hydroxymyristic acid. *Journal of Chromatography* 417 (1987) 11-25.
- 130 Sorenson WG, Gerberick GF, Lewis DM, Castranova V. Toxicity of mycotoxins for the rat pulmonary macrophage in vitro. *Environ Health Perspect* 66 (1986) 45-53.
- 131 Stewart J, Weir DM. Carbohydrates as recognition molecules in macrophage activities. *J Clin Lab Immunol* 28 (1989) 103-8.
- 132 Stoloff L. Aflatoxin is not a probably human carcinogen: the published evidence is sufficient. *Regul Toxicol Pharmacol* 10 (1989) 272-83.
- 133 Suzuki I, Hashimoto K, Ohno N, Tanaka H, Yadomae T. Immunomodulation by orally administered beta-glucan in mice. *Int J Immunopharmacol* 11 (1989) 761-9.
- 134 Terho EO, Heinonen OP, Lammi S. Incidence of farmer's lung leading to hospitalization and its relation to meteorological observations in Finland. *Acta Med Scand* 213 (1983) 295-8.
- 135 Terho EO, Husman K, Vohlonen I, Rautalahti M, Tukiainen H. Allergy to storage mites or cow dander as a cause of rhinitis among Finnish dairy farmers. *Allergy* 40 (1985) 23-6.
- 136 Thelin A, Tegler O, Rylander R. Lung reactions during poultry handling related to dust and bacterial endotoxin levels. *Eur J Respir Dis* 65 (1984) 266-71.
- 137 Tomasic. Peptidoglycan monomer originating from *Brevibacterium divaricatum* - its metabolism and biological activities in the host. In Schinner E (Eds). Surface structures of microorganisms and their interactions with the mammalian host, VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim., Weinheim 1988. 113-21.
- 138 van Hage-Hamsten M, Johansson SGO, Zetterström O. Predominance of mite allergy over allergy to pollens and animal danders in a farming population. *Clin Allergy* 17 (1987) 417-23.
- 139 Venaille T, Snella MC, Holt PG, Rylander R. Cell recruitment into lung wall and airways of conventional and pathogen-free guinea pigs after inhalation of endotoxin. *Am Rev Respir Dis* 139 (1989) 1356-60.
- 140 Vincken W, Roels P. Hypersensitivity pneumonitis due to *Aspergillus fumigatus* in compost. *Thorax* 39 (1984) 74-75.
- 141 Walzl HL, Ackerbauer H, Meingassner JG, Mieth H. Histopathology of organ lesions in mice after an intravenous or intratracheal or intrarenal infection with *aspergillus fumigatus*. *Mykosen* 30 (1987) 10-18.
- 142 Williams DL, Yaeger RG, Pretus HA, Browder IW, McNamee RB, Jones EL. Immunization against *Trypanosoma cruzi*: adjuvant effect of glucan. *Int J Immunopharmacol* 11 (1989) 403-10.

Insänt för publicering 1991-11-13