

Farmerlungen-Antigene in Deutschland

Farmer's Lung Antigens in Germany

Autoren

J. Sennekamp¹, M. Joest¹, I. Sander², S. Engelhart³, M. Raulf-Heimsoth²

Institute

Die Institutsangaben sind am Ende des Beitrags gelistet.

eingereicht 15. 12. 2011
akzeptiert nach Revision
16. 1. 2012

Bibliografie

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1291676>
Online-Publikation: 4.4.2012
Pneumologie 2012; 66: 297–301
© Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0934-8387

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med.
Joachim Sennekamp
Lungen- und Allergiezentrum
Bonn in Malteser Trägerschaft
Weberstr. 118
53113 Bonn
joachim.sennekamp@malteser.org

Zusammenfassung

Es gibt serologische Hinweise, dass außer den bisher in Deutschland bekannten häufigen Farmerlungen-Antigenen *Saccharopolyspora rectivirgula* (*Micropolyspora faeni*), *Thermoactinomyces vulgaris* und *Aspergillus fumigatus* auch die Antigene *Absidia* (*Lichtheimia*) *corymbifera*, *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*) und *Streptomyces albus* als Verursacher der Farmerlunge in Betracht kommen. In dieser Studie untersuchen wir die Seren von 64 Landwirten mit Verdacht auf Farmerlunge auf weitere Schimmelpilze: *Wallemia sebi*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor* und *Eurotium amstelodami* und stellen fest, dass diese Schimmelpilze in Deutschland keine häufigen Farmerlungen-Antigene sind.

Einführung

Seit den 70er-Jahren werden in Deutschland zur serologischen Diagnostik der Farmerlunge Thermoactinomyceten und Aspergilli eingesetzt [1–3]. Insbesondere gegen die Antigene von *Saccharopolyspora rectivirgula* (früher *Micropolyspora faeni*), *Thermoactinomyces vulgaris* und *Aspergillus fumigatus* richten sich die IgG-Antikörper von Patienten mit Farmerlunge.

Da wir immer wieder Patienten mit Verdacht auf Farmerlunge begegnen, bei welchen der serologische Nachweis dieser klassischen Antikörper nicht erfolgreich ist und auch in der Literatur [4–7] solche Patienten beschrieben werden, untersuchten wir weitere Antigene und fanden IgG-Antikörper gegen *Absidia corymbifera*, *Erwinia herbicola*, *Thermoactinomyces sacchari*, *Thermoactinomyces dichotomicus* und *Streptomyces albus* bei Landwirten mit Verdacht auf Farmerlunge [8, 9]. In anderen Ländern wie Frankreich, Finnland, Polen und den USA konnte gezeigt werden, dass auch diese Bakterien und Schimmelpilze in der Lage sind, eine Farmerlunge hervorzurufen [10–19].

Abstract

Recent studies suggest that besides the long-known farmer's lung antigen sources *Saccharopolyspora rectivirgula* (*Micropolyspora faeni*), *Thermoactinomyces vulgaris*, and *Aspergillus fumigatus*, additionally the mold *Absidia* (*Lichtheimia*) *corymbifera* as well as the bacteria *Erwinia herbicola* (*Pantoea agglomerans*) and *Streptomyces albus* may cause farmer's lung in Germany. In this study the sera of 64 farmers with a suspicion of farmer's lung were examined for the following further antigens: *Wallemia sebi*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor*, and *Eurotium amstelodami*. Our results indicate that these molds are not frequent causes of farmer's lung in Germany.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Farmerlungen- und Kontrollseren der vorangegangenen Studien [8, 9] auf weitere Antigene, mit denen Landwirte bei ihrer Arbeit Kontakt haben könnten. Es wurden IgG-Antikörper gegen *Wallemia sebi*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor* und *Eurotium amstelodami* getestet, da diese Schimmelpilze im Arbeitsbereich von Landwirten vorkommen [14–16, 20–23].

Wallemia sebi wurde in Frankreich und in Finnland [14–16] sowie in Schweden [20] in landwirtschaftlichen Bioaerosolen nachgewiesen. Mehrere Farmerlungen-Patienten hatten IgG-Antikörper gegen Antigene dieses Schimmelpilzes in ihrem Serum, jedoch bestand keine gute Korrelation zwischen serologischem Befund und den Symptomen der Farmerlunge [10, 14–16].

Cladosporium spp. kommen unter anderem im Getreide vor [8]. Für *Cladosporium* ist grundsätzlich erwiesen, dass es eine exogen-allergische Alveolitis (EAA) hervorrufen kann [24].

Der ubiquitäre *Aspergillus versicolor* kommt besonders häufig in Innenräumen mit Feuchtschäden vor [23]. Die Landwirte dürften vorwiegend

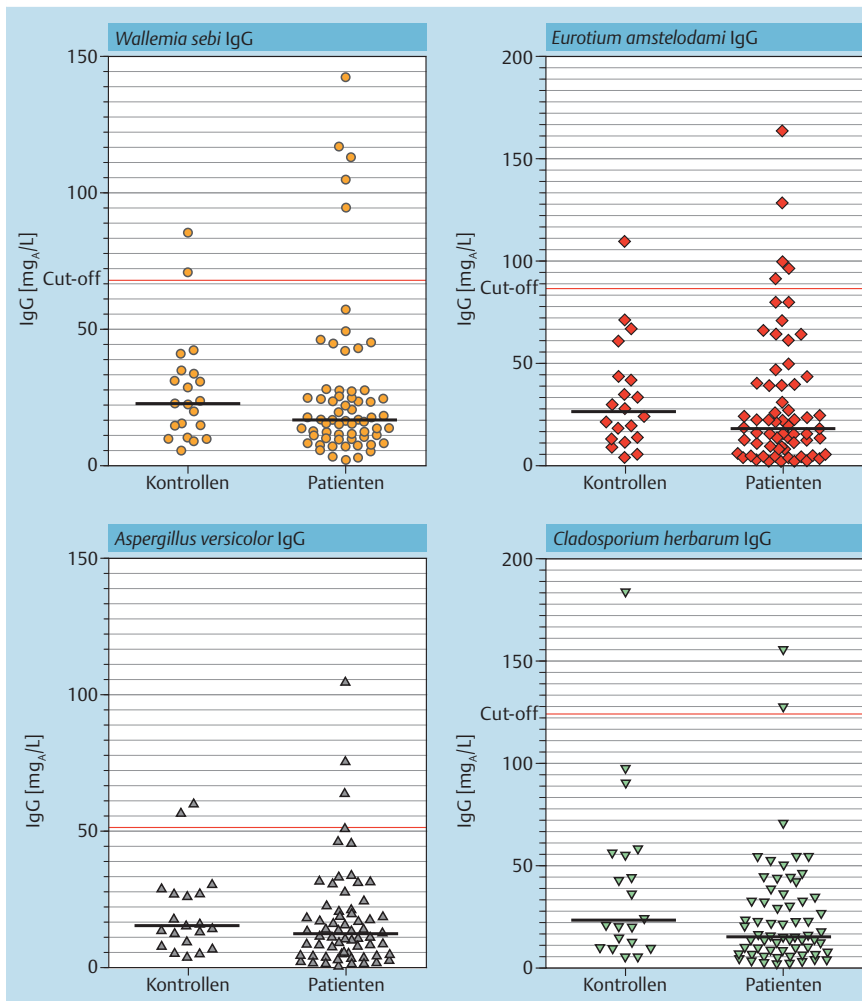


Abb. 1 Darstellung der quantitativ gemessenen IgG-Antikörper bei den Personen mit Verdacht auf Farmerlunge im Vergleich zu den Kontrollpersonen bei den 4 Schimmelpilz-Antigenen.

in Ställen, in Lager- und Geräteräumen und ihrer Wohnung mit diesem Schimmelpilz Kontakt haben.

Eurotium amstelodami als Schimmelpilz der *Aspergillus glaucus*-Gruppe gedeiht besonders gut in sehr feuchtem Heu. Der Keim ist in einer Höhe von 700–900 Metern häufiger im Heu zu finden als in Höhen über 900 Metern oder unterhalb von 500 Metern. In Frankreich und Finnland wurde eine Assoziation mit der Farmerlunge gefunden [14–16,25].

Sollten IgG-Antikörper gegen diese Schimmelpilze gehäuft bei unseren Landwirten mit Verdacht auf Farmerlunge vorkommen, wäre dies ein erster Hinweis darauf, dass diese Antigene als weitere Verursacher der Farmerlunge in Deutschland in Betracht kämen.

Patienten und Kontrollpersonen

Wir untersuchten 64 Serumproben von Patienten, die mit Verdacht auf Farmerlunge in das allergologisch-immunologische Labor des Lungen- und Allergie-zentrums Bonn eingesandt worden waren. Die Seren kamen aus allen Teilen Deutschlands, überwiegend aus pneumologischen Kliniken und Praxen. Alle Seren waren zuvor im Rahmen anderer Studien mittels IgG-ELISA auf die Antigene *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris* und *Aspergillus fumigatus* untersucht worden. 30 Seren waren auch auf *Absidia corymbifera*, *Streptomyces albus*, *Erwinia*

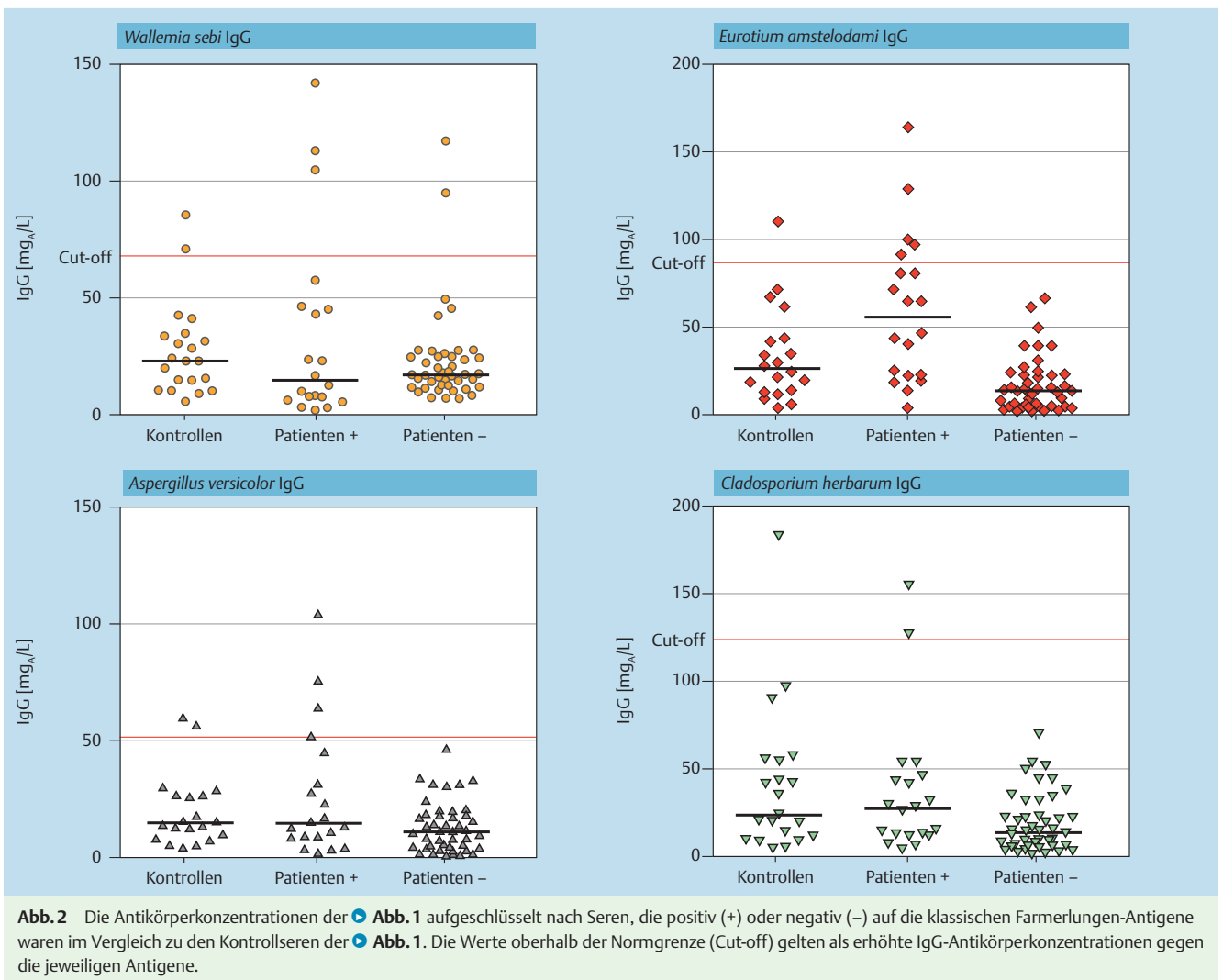
herbicola, *Thermoactinomyces sacchari* und *Thermoactinomyces dichotomicus* im IgG-ELISA untersucht worden [8,9].

Die Seren 1–20 enthielten gegen mindestens eines dieser Farmerlungen-Antigene im ELISA-IgG-Antikörper, während die Seren 21–64 keine solchen Antikörper enthielten.

Als Kontrollseren wurden 20 Seren von gesunden Personen ohne bekannten Kontakt zu landwirtschaftlichen oder Schimmelpilz-Antigenen eingesetzt.

Untersuchungstechnik

Die 64 Seren von Patienten mit Verdacht auf Farmerlunge und die 20 Kontrollseren wurden im IPA Bochum mittels des CAP FEIA (Phadia, Freiburg) auf IgG-Antikörper gegen die Schimmelpilze *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor*, *Walleimia sebi* und *Eurotium amstelodami* untersucht [26, 27]. Für *Cladosporium herbarum* wurden Allergen-ImmunoCAPs (gm2) von Phadia (Freiburg) eingesetzt, von den übrigen Schimmelpilzen wurden Extrakte hergestellt, diese biotinyliert und an Streptavidin-ImmunoCAPs gekoppelt [28]. Das Ausgangsmaterial für *Aspergillus versicolor* wurde von Allergon (Ängelholm, Schweden) bezogen. *Walleimia sebi* (Stamm 5329) und *Eurotium amstelodami* (Stamm 62629) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen und auf Platten mit proteinfreiem Czapek-Dox-Agar (Oxoid, Wesel) kultiviert. Für diese osmophilen Schimmelpilze enthielt das



Medium zusätzlich 40% Saccharose. *E. amstelodami* und *W. sebi* wurden nach 14 Tagen bzw. sechs Wochen Kultivierung durch Abkratzen der Oberflächen mit einem Skalpell geerntet. Das Material wurde drei Minuten auf Eis homogenisiert und bei 20000 × g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert, mit einer Dialysemembran mit einem Cut-off von 3,5 kDa dialysiert und gefriergetrocknet.

Anhand der IgG-Werte der 20 gesunden Kontrollpersonen wurde ebenso, wie bei Joest 2010 [9] beschrieben, der Normbereich für diese Antigene ermittelt. Als Grenzwert (Cut-off) zur Beurteilung erhöhter IgG-Konzentrationen wurde zum Mittelwert die zweifache Standardabweichung addiert.

Der Vergleich der IgG-Werte zwischen Landwirten bzw. in der Landwirtschaft Tätigen mit Verdacht auf Farmerlunge und den Kontrollen wurde mit dem Mann-Whitney-Test und dem Programm Graphpad Prism (Version 5.03 für Windows; GraphPad Software, San Diego, USA, www.graphpad.com) durchgeführt. P-Werte <0,05 galten als statistisch signifikant.

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt die IgG-Werte der Farmerlungenpatienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten und den Kontrollen.

In **Abb. 2** sind die IgG-Antikörper gegen dieselben Antigene der **Abb. 1** dargestellt, aufgeschlüsselt nach positivem (+) oder negativem Befund (-) auf die klassischen Farmerlungen-Antigene. Man erkennt, dass die Landwirte ohne Antikörper gegen die klassischen Farmerlungen-Antigene auch keine erhöhten Antikörper gegen *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor* und *Eurotium amstelodami* haben. Bei *Wallemia sebi* hingegen wiesen zwei Landwirte ohne Antikörper gegen die klassischen Antigene IgG-Antikörper gegen *Wallemia sebi* auf.

In **Tab. 1** sind die positiven Ergebnisse für die 22 Personen, die IgG-Antikörper aufweisen, einzeln aufgeführt, um erkennen zu können, in welcher Konstellation die IgG-Antikörper untereinander assoziiert sind. 42 weitere untersuchte Seren enthielten keine IgG-Antikörper gegen diese 7 untersuchten Mikroorganismen. Erhöhte IgG-Antikörperkonzentrationen gegen *Wallemia sebi* kommen insgesamt bei 23% der untersuchten Landwirte mit klassischer Sensibilisierung vor, Antikörper gegen *Cladosporium herbarum* bei 9%, gegen *Aspergillus versicolor* bei 18% und gegen *Eurotium amstelodami* bei 23%.

Im Vergleich zu den IgG-Antikörpern gegen die klassischen Farmerlungen-Antigene (*Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris* und *Aspergillus fumigatus*) sowie den von Joest nachgewiesenen Antikörpern gegen *Absidia corymbifera*, *Erwinia herbicola*, *Thermoactinomyces sacchari* und *Streptomyces albus* [9] (**Tab. 2**) kommen diese Antikörper selten vor. Die ent-

Tab. 1 Erhöhte (+) und unauffällige (-) IgG-Antikörperkonzentrationen gegen die klassischen Farmerlungenauslöser und die in dieser Studie zusätzlich untersuchten Schimmelpilze bei Landwirten mit mindestens einem positiven IgG-Befund.

Antigen	Saccharopolyspora rectivirgula	Thermoactinomyces vulgaris	Aspergillus fumigatus	Wallemia sebi	Cladosporium herbarum	Aspergillus versicolor	Eurotium amstelodami
Serum mit Antikörpern gegen die klassischen Farmerlungen-Antigene							
1	-	+	+	-	-	-	-
2	-	-	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	-	+	-
6	+	-	+	-	-	-	-
7	-	-	+	+	-	+	-
8	-	+	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	-	-	-
10	-	-	+	-	+	+	+
11	-	-	+	-	-	-	-
12	-	-	+	-	-	-	-
13	-	-	+	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-
15	-	+	-	-	-	-	+
16	+	+	+	-	-	-	-
17	+	-	-	-	-	-	-
18	+	-	-	-	-	-	+
19	+	-	+	-	-	-	+
20	+	-	-	-	-	-	-
Serum ohne Antikörper gegen die klassischen Farmerlungen-Antigene							
40	-	-	-	+	-	-	-
55	-	-	-	+	-	-	-
Summe	9	5	13	5	2	4	5
% positiv	41 %	23 %	59 %	23 %	9 %	18 %	23 %

Tab. 2 Häufigkeit von IgG-Antikörpern bei den seropositiven Seren gegen Thermoactinomyeten und Schimmelpilze bei Personen mit Verdacht auf Farmerlunge in der Studie Joest 2010 [9] (oben) und in dieser Studie (unten).

Ergebnisse der Studie Joest 2010 (ELISA)	
<i>Aspergillus fumigatus</i>	57 %
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	63 %
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	43 %
<i>Absidia corymbifera</i>	43 %
<i>Streptomyces albus</i>	37 %
<i>Erwinia herbicola</i>	33 %
<i>Thermoactinomyces sacchari</i>	33 %
<i>Thermoactinomyces dichotomicus</i>	20 %
Ergebnisse dieser Studie (CAP-FEIA)	
<i>Eurotium amstelodami</i>	23 %
<i>Wallemia sebi</i>	23 %
<i>Aspergillus versicolor</i>	18 %
<i>Cladosporium herbarum</i>	9 %

sprechenden Antikörpertiter der Landwirte unterscheiden sich statistisch nicht signifikant von den Kontrollseren (● **Abb. 1**).

Diskussion

Es handelt sich bei den Patienten der Studie Joest und den Patienten dieser Studie um dieselben Personen mit denselben Kontrollpersonen und demselben Verfahren zur Ermittlung der Normbereiche. Insofern besteht eine weitgehende Vergleichbarkeit zwi-

schen allen Antigenen. In der genannten Studie waren die Seren mit dem klassischen ELISA-Verfahren untersucht worden [9].

Fünf Seren der Studie von Joest et al. (17 % der Seren) hatten auf keines der drei klassischen Antigene (*Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris* und *Aspergillus fumigatus*) reagiert, aber auf *Erwinia herbicola* [9], *Streptomyces albus* oder auf *Absidia corymbifera*. Die behandelnden Ärzte dieser fünf Patienten waren nachträglich zu den Symptomen der Patienten befragt worden. Dabei hatte sich herausgestellt, dass bei einem Patienten mit Antikörpern gegen *Erwinia herbicola* und *Streptomyces vulgaris*, einem Patienten mit Antikörpern nur gegen *Erwinia herbicola* und einem Patienten mit Antikörpern nur gegen *Absidia corymbifera* jeweils eine nach den Diagnosekriterien der EAA-Arbeitsgemeinschaft [29] eindeutige Farmerlunge vorgelegen hatte.

17 % der Seren der Joest-Studie hatten auf keines der drei klassischen Antigene (*Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris* und *Aspergillus fumigatus*) reagiert. Bei 3 Patienten dieser Studie hatte eine nach den Diagnosekriterien der EAA-Arbeitsgemeinschaft [29] eindeutige Farmerlunge vorgelegen. 2 Patienten hatten auf *Absidia corymbifera* und einer auf *Erwinia herbicola* reagiert [9].

Somit fand Joest bei Einsatz seiner Antigene 10 % mehr Farmerlungen, als wenn nur die drei klassischen Antigene getestet wurden. Hingegen bringt der Einsatz der Antigene *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus versicolor* und *Eurotium amstelodami* bei den hier untersuchten 44 seronegativen Landwirten keine weiteren Antikörpernachweise. Somit wären diese Antigene keine Bereicherung für die Farmerlungen-Diagnostik in Deutschland.

Hingegen reagierten zwei auf die klassischen Antigene negative Seren auf *Wallemia sebi* (● Tab. 1).

Klinische Hinweise auf eine Farmerlunge konnten wir von den behandelnden Ärzten nicht erhalten. Auch ist die heutige Datenlage für *Wallemia sebi* als Farmerlungen-Antigen zu schwach, als dass ein routinemäßiger Einsatz dieses Antigens derzeit empfohlen werden könnte [10, 14, 16].

Die 4 Seren mit Antikörpern gegen *Aspergillus versicolor* hatten zuvor im ELISA alle auch auf *Aspergillus fumigatus* reagiert, wie aus ● Tab. 1 zu ersehen ist. Hier dürften Kreuzreaktionen vorliegen.

Bei *Eurotium amstelodami* (früher *Aspergillus amstelodami* genannt) hingegen reagierten 2 Seren nur auf *Eurotium amstelodami*, aber nicht auf *Aspergillus fumigatus*. Da diese 2 Seren auf andere klassische Farmerlungen-Antigene positiv waren und von den Seren mit fehlenden Antikörpern gegen die klassischen Antigene kein einziges auf *Eurotium* reagierte, bringt die Bestimmung von Antikörpern gegen *Eurotium amstelodami* in der vorliegenden Untersuchungs-Serie keinen zusätzlichen Erkenntnisgewinn.

Somit kann man beim heutigen Wissensstand in Deutschland folgende Antigene als häufige Farmerlungen-Antigene ansehen: *Saccharopolyspora rectivirgula*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Aspergillus fumigatus* und *Absidia (Lichtheimia) corymbifera*. Weniger gut dokumentiert und seltener sind *Erwinia herbicola* und *Streptomyces albus*.

Wenn in einem Einzelfall ein Landwirt mit einem anderen EAA-Antigen beruflichen Kontakt hat, wie beispielsweise mit dem Hefepilz *Candida albicans* im Heu [30] oder *Bacillus subtilis* im Stroh [31], so kommt selbstverständlich auch ein solches Antigen als Verursacher der Farmerlunge in Betracht.

Anliegen dieser und unserer vorangegangenen Studien ist, für Landwirte mit Verdacht auf Farmerlunge die Farmerlungen-Antigene in Deutschland zu ermitteln, die besonders häufig Verursacher der Farmerlunge sind und die somit für einen Antikörper-Suchtest am besten geeignet sind. Diesem Ziel sind wir mit diesen Studien ein Stück näher gekommen. Weitere Untersuchungen, insbesondere zur klinischen Bedeutung dieser Antikörper, sind erforderlich, damit von den betroffenen Landwirten das Schicksal einer Lungenfibrose und eines Lungenemphysems möglichst frühzeitig abgewendet wird.

Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Institute

- ¹ Lungen- und Allergiezentrum Bonn in Malteser Trägerschaft (Leiter: Dr. M. Joest; Prof. Dr. J. Sennekamp)
- ² Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum, IPA (Leiter: Prof. T. Brüning)
- ³ Zentrum für Infektiologie und Infektionsschutz – Institut für Hygiene und öffentliche Gesundheit der Universität Bonn (Leiter: Prof. M. Exner)

Literatur

- 1 Bartmann K. Immunologische Tests in der Diagnose und Verlaufskontrolle der Alveoliten. *Prax Pneumol* 1979; 33: 1–14
- 2 Petersen A. Über die organischen Staublungen unter besonderer Berücksichtigung der Farmerlunge. In: Hamm J, Hrsg. Interstitielle Lungenerkrankungen – Lungenfibrosen. Stuttgart: Thieme; 1975: 45–55
- 3 Sennekamp J. Extrinsic allergic alveolitis-hypersensitivity pneumonitis. München: Dustri; 2004
- 4 Baur X, Fruhmant G, Rienmüller R. Inhalative Provokation bei allergischer Alveolitis und Bronchialobstruktion infolge Exposition gegenüber Heustaub, Vogel-Antigenen und Befeuchterwasser. *Prax Pneumol* 1981; 35: 308–315

- 5 Edwards JH, Baker JT, Davies BH. Precipitin test negative farmer's lung – activation of the alternative pathway of complement by mouldy hay dust. *Clin Allergy* 1974; 4: 379–388
- 6 Pether JVS, Greatorex FB. Farmer's lung disease in Somerset. *Brit J Industr Med* 1976; 33: 265–268
- 7 Terho EO, Lacey J. Microbiological and serological studies of farmer's lung in Finland. *Clin Allergy* 1979; 9: 43–52
- 8 Joest M, Sennekamp J, Engelhart S. *Absidia corymbifera* – ein Antigen der Farmerlunge in Deutschland? *Allergologie* 2008; 31: 479–481
- 9 Joest M, Schulte W, Engelhart S et al. Gibt es in Deutschland bisher noch unbekannte Farmerlungenantigene? *Allergologie* 2010; 33: 565–569
- 10 Bélanger AP, Reboux G, Botterel F et al. New evidence of the involvement of *Lichtheimia corymbifera* in farmer's lung disease. *Med Mycol* 2010; 48: 981–987
- 11 Dutkiewicz J, Kus E, Dutkiewicz E et al. Hypersensitivity pneumonitis in grain farmers due to sensitization to *Erwinia herbicola*. *Ann Allergy* 1985; 54: 65–68
- 12 Kagen SL, Fink JN, Schlueter DP et al. *Streptomyces albus*: a new cause of hypersensitivity pneumonitis. *J Allergy Clin Immunol* 1981; 68: 295–299
- 13 Lacey J. Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med* 1997; 4: 113–121
- 14 Reboux G, Piarroux R, Mauny F et al. Role of molds in farmer's lung disease in Eastern France. *Amer J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 1534–1539
- 15 Reboux G, Reiman M, Roussel S et al. Impact of agricultural practices on microbiology of hay, silage, and flour on Finnish and French farms. *Ann Agric Environ Med* 2006; 13: 267–273
- 16 Reboux G, Piarroux R, Roussel S et al. Assessment of four serological techniques in the immunological diagnosis of farmer's lung disease. *J Med Microbiol* 2007; 56: 1317–1321
- 17 Roussel S, Reboux G, Dalphin J-C et al. Microbiological evolution of hay and relapse in patients with farmer's lung. *Occup Environ Med* 2004; 61: 3
- 18 Roussel S, Reboux G, Dalphin J-C et al. Farmer's lung disease and microbiological composition of hay: a case control study. *Mycopathologia* 2005; 160: 273–279
- 19 Wenzel FJ, Gray RL, Roberts RC et al. Serologic studies in farmer's lung. *Amer Rev Resp Dis* 1974; 109: 464–468
- 20 Zeng QY, Westermark SO, Rasmuson-Lestander A et al. Detection and quantification of *Wallemia sebi* in aerosols by real-time PCR, conventional PCR, and cultivation. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 7295–7302
- 21 Kotimaa MH, Terho EO, Husman K. Airborne moulds and actinomycetes in work environment of farmers. *Eur Respir Dis Suppl* 1987; 152: 91–100
- 22 Raulf-Heimsoth M, Sander I, Mayer S et al. IgG-Antikörper als Expositionsmarker bei Getreidearbeitern. *Allergologie* 2008; 31: 484–486
- 23 Raulf-Heimsoth M, Kespohl S, Pesch B et al. Eignet sich die Bestimmung von *Aspergillus versicolor*-spezifischen IgG-Antikörpern als Expositionsmarker für Schimmelpilzbefall in Innenräumen? *Allergologie* 2010; 33: 558–561
- 24 Jacobs RL, Thorner RE, Holcomb JR et al. Hypersensitivity pneumonitis caused by *Cladosporium* in an enclosed hot-tub area. *Ann Intern Med* 1986; 105: 204–206
- 25 Gbaguidi-Haore H, Roussel S, Reboux G et al. Multilevel analysis of the impact of environmental factors and agricultural practices on the concentration in hay of microorganisms responsible for farmer's lung disease. *Ann Agric Environ Med* 2009; 16: 219–225
- 26 van Hoeyveld E, Dupont L, Bossuyt X. Quantification of IgG antibodies to *Aspergillus fumigatus* and pigeon antigen by immunoCAP technology: An alternative to the precipitation technique? *Clin Chem* 2006; 52: 1785–1793
- 27 McSharry C, Dye GM, Ismail T et al. Quantifying serum antibody in bird fancier's hypersensitivity pneumonitis. *BMC Pulm Med* 2006; 6: 16
- 28 Sander I, Kespohl S, Merget R et al. A new method to bind allergens for the measurement of specific IgE antibodies. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 136: 39–44
- 29 Arbeitsgemeinschaft exogen-allergische Alveolitis. Empfehlungen zur Diagnostik der exogen-allergischen Alveolitis. *Allergologie* 2006; 29: 431–438 und *Pneumologie* 2007; 61: 52–56
- 30 Ando M, Yoshida K, Nakashima H et al. Role of *Candida albicans* in chronic hypersensitivity pneumonitis. *Chest* 1994; 105: 317–318
- 31 Green WF, Woolcock AJ. Do airborne *Bacillus subtilis* enzymes from sources other than biodegradants cause respiratory disease? *Lancet* 1978; II: 730