

Abschlussbericht zum Vorhaben

FP-0413

Laufzeit

01.02.2018 – 30.11.2018

Bericht vom

28.02.2019

Autoren

Clara Pogner

Annette Kolk

Markus Gorfer

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Kurzfassung deutsch	3
Kurzfassung englisch.....	4
1 Problemstellung	5
2 Forschungszweck/-ziel	6
3 Methodik	7
4 Ergebnisse des Gesamtvorhabens.....	9
Erstellung eines standardisierten und kontrollierten Testaufbaus.....	9
Tests mit <i>Cladosporium sphaerospermum</i>	10
Etablierung des Endotoxin-Nachweissystems.....	12
Tests mit Schweinestallstaub.....	13
Evaluierung von Lagerungs- und Transportbedingungen.....	14
Lagerung	14
Transport	15
Mögliche alternative Sammelsystem.....	17
Etablierung und Durchführung eines Testringversuches	18
Referenzmessungen	18
Ergebnisse Teilnehmer	19
5 Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen.....	22
6 Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen	23
7 Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan.....	25
8 Literatur.....	25
1 Anhang/Anhänge	25

Kurzfassung deutsch

Biologische Stoffe in der Luft (Bioaerosole), können zu Beeinträchtigungen der Gesundheit führen und besitzen dadurch eine arbeits- und umweltmedizinische Relevanz. Pyrogen wirkende Stoffe, wie zum Beispiel Endotoxine, können zu unspezifischen Immun- und Entzündungsreaktionen in den Atemwegen und in weiterer Folge zu akuten und chronischen Erkrankungen führen. Folgen einer Inhalation von Pyrogenen über die Atemluft können Husten, Beeinträchtigung der Lungenfunktion, Fieber und grippeähnliche Symptome sein. Eine wiederholte oder andauernde Belastung in höherer Konzentration kann zu akuten und chronischen Erkrankungen führen. Um die Gefährdung durch Pyrogene an Arbeitsplätzen abschätzen zu können, ist es notwendig ihre Konzentration vor Ort zu erfassen. Dazu wird am häufigsten ein Filter-Sammelsystemen und die Analyse mittels LAL oder rFC Analyse eingesetzt. Arbeitsplatzkontrollen werden regelmäßig durchgeführt, aber zurzeit gibt es für die Sammlung, die Lagerung und die Analyse keine oder wenige Verfahren, welche die Qualitätssicherung der Verfahren gewährleisten.

Ziel des Projektes ENDOTOX war es die Grundlage zur Qualitätssicherung des Endotoxinnachweises an Arbeitsplätzen zu schaffen. Als Grundlage dafür wurden Verfahren etabliert um kontrolliert und reproduzierbar eine Vielzahl von Proben mit endotoxinhaltigem Staub zu beaufschlagen. Mit diesen Proben wurde der Einfluss von Lagerung und Transport evaluiert und die Protokolle zur Durchführung von Ringversuchen etabliert und getestet. Es wurde ein standardisierter Aufbau zur Produktion von reproduzierbaren, standardisierten, pyrogenhaltigen Proben erstellt, evaluiert und dokumentiert. Jeder Schritt in der Etablierung und Überprüfung des Systems wurde in mehreren Wiederholungen getestet um eine einwandfreie Durchführung gewährleisten zu können. Es wurden Standardprotokolle erstellt um unkompliziert Proben für alle weiteren Versuche herstellen zu können. Mithilfe dieser Proben wurde der Einfluss von Transport- und Lagerungsbedingungen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Lagerung bei Raumtemperatur ausreichend ist. Eine Lagerung für 14 Tage ist ohne Probleme möglich. Der Vergleich der Endotoxinkonzentration vor und nach dem Transport zeigte deutliche Unterschiede, diese enthalten aber auch den Einfluss der Analyse durch ein zweites Labor.

Um die Analysen verschiedener Labore miteinander vergleichen zu können, sind neben standardisierten Proben auch Standardprotokolle für die Durchführung von Ringversuchen nötig, diese wurden im bereitgestellten System etabliert und getestet. Die Ergebnisse des Testringversuches zeigten einen Verbesserungsbedarf im Probenversand und in der Verdeutlichung der Vorgaben für die Teilnehmer. Diese wurden in den Standardprotokollen umgesetzt. Die Ergebnisse der Teilnehmer waren meist im Rahmen von 50 bis 200 % der Kontrollproben. Neun Teilnehmer lieferten 11 Ergebnisse je Konzentration ab. Drei Ergebnisse waren über 200 % der Referenz, drei waren unter 50 % der Referenz. Dabei waren sowohl Unterschiede zwischen den teilnehmenden Laboren als auch zwischen den verwendeten Nachweisverfahren ersichtlich.

Die über das Forschungsprojekt gewonnenen Informationen, Standardverfahren und technischen Voraussetzungen für die Qualitätssicherung sind für alle Institutionen im Bereich Arbeitsschutz von Bedeutung. Ringversuche bieten die Möglichkeit, die Qualitätssicherung in der Analyse zu gewährleisten. Die Ergebnisse bezüglich Lagerung und Transport können in die aktuellen Arbeitsanweisungen aufgenommen werden. Außerdem bieten die im Projekt etablierten Verfahren die Grundlage für weitere Evaluierung, z.B. bezüglich Probenverarbeitung oder Sammlung, um die Qualitätssicherung der Arbeitsplatzmessungen auszuweiten. Die Gefährdungsbeurteilung am Arbeitsplatz, die Beurteilung von Arbeitsschutzmaßnahmen und die Anpassung von Arbeitsplätzen zur Belastungsvermeidung bauen auf möglichst genauen und nachvollziehbaren Analysen auf.

Kurzfassung englisch

Exposure to biological particles in air (bioaerosols) potentially causes serious health effects and therefore are of relevance for environmental and occupational health. Pyrogen active substances, like endotoxins, can cause unspecific immune responses and airway inflammation, which may subsequently lead to acute or chronic diseases. Consequences of the inhalation of pyrogens from the inhaled air are coughing, impairment of lung function, fever and flu like symptoms. A repeated or constant exposure of high concentrations can lead to acute or chronic diseases. To evaluate the risk on workplaces, concentrations are measured in occupational settings. The most common method for the detection of endotoxins is sampling on filters and subsequent analyses by LAL or rFC tests. Workplaces are investigated on a regular basis, but until now there is no or little quality management for the sampling, storage and analyses of endotoxin samples.

Goal of the project ENDOTOX was to establish the base for the quality assurance of endotoxin detection in occupational settings. As foundation for the work, a procedure was established to produce a high number of samples with the same amount of endotoxin containing dust in a controlled and reproducible manner. With these samples the influence of storage and transport on the samples was evaluated and procedures for the execution of an interlaboratory test were established and tested. A standardized setting for the production of standardized and reproducible pyrogen containing samples was established, evaluated and documented. Each step in the establishment and evaluation of the system was done in replicates to ensure a flawless execution. Standard procedures were established to make the production of samples for further experiments straightforward. With the produced samples the influence of storage and transport was evaluated. The results show, that the storage at room temperature is adequate, as no significant loss could be observed. The storage of samples up to 14 days showed no obvious loss of detectable endotoxin. The comparison of endotoxin concentrations before and after transport showed clear differences, these are a combined result of transport and the analyses by another laboratory.

To compare the analyses of different laboratories to each other, standardized samples and standard procedures for the execution of the interlaboratory test are necessary. These protocols were developed and tested in the before established system. The results of the trial interlaboratory test showed the need of improvement in sample shipping and clarification of the instructions for participants. These improvements were added to the standard protocols. The results of the participants were mostly in the range of 50 to 200 % of the reference samples. Nine participants provided in total 11 results for each test concentration, as some labs used two analyses procedures. Three results were above 200 % of the reference and three were below 50 %. Differences between the results could be found between the participants but also between the used analyses procedures.

The information gained with this research project, the standardized procedures and technical settings for the quality assurance are important for all areas of occupational health and security, dealing with pyrogen material. Interlaboratory test help to ensure the quality of the analysis of samples. The results for the storage and transport of samples can be included in current working instructions of the DGUV. Furthermore, the procedures established in the project set the bases for further evaluation and quality assurance of procedures of occupational health monitoring, for example the sampling and processing procedures for endotoxin samples. The risk assessment of workplaces, the evaluation of safety precautions and the adaptation of work stations are based on as accurate measurements as possible.

1 Problemstellung

Luft enthält neben der gasförmigen Phase auch eine Vielzahl von flüssigen oder festen Stoffen, die als Aerosole transportiert werden. Einige Aerosole biologischen Ursprungs, Bioaerosole, können zu Beeinträchtigungen der Gesundheit führen. Zu diesen Stoffen zählen auch Pyrogene (z.B. Endotoxine), die dadurch eine arbeits- und umweltmedizinische Relevanz besitzen. Endotoxine sind Zellwandbestandteile von Bakterien, die bei deren Absterben freigesetzt werden (Hartung 2015). Folgen einer Inhalation von Pyrogenen über die Atemluft können Husten, Beeinträchtigung der Lungenfunktion, Fieber und grippeähnliche Symptome sein. Eine wiederholte oder andauernde Belastung in höherer Konzentration kann zu akuten und chronischen Erkrankungen führen.

Arbeitsplätze, an denen erhöhte Konzentrationen an Endotoxinen in der Luft auftreten können, sind zum Beispiel in metallverarbeitenden Betrieben mit Kühlschmierstoff-Kreisläufen zu finden (<http://www.hse.gov.uk/research/rrpdf/rr1043.pdf>). Ebenso können Arbeitsplätze in abwassertechnischen Anlagen, Recycling- und Wertstoffsammlung erhöhte Vorkommen von Bakterien und deren Zerfallsprodukte aufweisen (Laitinen et al. 1994).

Um die Gefährdung durch Pyrogene an Arbeitsplätzen abschätzen zu können, ist es notwendig ihre Konzentration vor Ort zu erfassen. Die weiteste Verbreitung zur Erfassung von Endotoxinen und anderen LAL-reaktiven Substanzen hat die Sammlung mittels Filter-Sammelsystemen und die Analyse mittels *Limulus-Amoebocytin*-Lysat (LAL), ca. 90 % der Analysen werden mit diesem Test durchgeführt (Hartung 2015). Das LAL-Verfahren wurde ursprünglich für den Nachweis fieberauslösender Substanzen als Verunreinigung in pharmazeutischen- oder Medizinprodukten entwickelt. Aus Tierschutzgründen aber auch im Sinne der Nachhaltigkeit wurden in den letzten Jahren Verfahren auf den Markt gebracht, die bestimmte Faktoren der Gerinnungskaskade der *Limulus-Amoebocytin* enthalten. Diese Faktoren werden rekombinant hergestellt und sind dadurch unabhängig von bestehenden *Limulus* Populationen, es ist kein tierschutzrelevanter Aderlass der Tiere mehr notwendig und die Qualität der Produkte kann im Labor gesichert werden.

Die Sammlung und Analyse von luftgetragenen Pyrogenen zur Arbeitsplatzkontrolle wird regelmäßig durchgeführt, jedoch gibt es zurzeit keine oder wenige qualitätssichernde Kriterien und Maßnahmen für die Durchführung. Beispielsweise würden Ringversuche zur Qualitätssicherung des Verfahrens beitragen, da die Analysequalität der Labore überprüft werden kann. Im Bereich der pharmazeutischen und medizinischen Produkte werden Ringversuche zur Qualitätssicherung regelmäßig durchgeführt. Diese Ringversuche sind aufgrund von vorliegenden Konzentrationen und Sammelverfahren nicht für Arbeitsplatzproben geeignet.

Vergleichenden Untersuchungen von Arbeitsplatzproben durch mehrere Labore haben gezeigt, dass die Ergebnisse bei der Untersuchung von Umweltproben stark schwanken können, auch wenn das Analyseverfahren in den einzelnen Laboren grundsätzlich gut etabliert ist. Dadurch kann es zu signifikanten Variationen bei der Belastungsbeurteilung der Arbeitsplätze kommen (Douwes et al. 2003). Auch die Lagerung und der Transport von Proben oder Extrakten können die Ergebnisse beeinflussen. Diese Themen sind bisher jedoch nur ungenügend betrachtet worden (Duquenne 2012c, Douwes et al. 1995).

Um Qualitätskontrollen des Sammel- und Analyseverfahrens durchführen zu können, Einfluss von Transport und Lagerung zu bestimmen und in Ringversuchen verschiedene analytische Labore miteinander zu vergleichen, sind standardisierte Proben nötig, die kontrolliert und wiederholbar mit bestimmten Mengen an pyrogenhaltiger Luft beaufschlagt wurden. Nur mit Hilfe von reproduzierbaren Bedingungen ist die Qualitätssicherung und Evaluierung von Sammel- und Analyseverfahren möglich.

2 Forschungszweck/-ziel

Ziel des Forschungsvorhabens war die Evaluierung, Standardisierung und Qualitätskontrolle für Sammel- und Analyseverfahren von luftgetragenen Pyrogenen. Dabei sollen die zur Zeit vorhandenen Technik- und Wissenslücken, wie die Verfügbarkeit von standardisiertem Probematerial und Standardprotokolle zur Durchführung von Ringversuchen für luftgetragene Pyrogene am Arbeitsplatz, geschlossen werden. Um dieses Ziel zu erreichen, werden folgende Teilziele angestrebt:

- Die Etablierung einer kontrollierten und reproduzierbaren Beaufschlagung von Probeträgern mit pyrogenhaltigem Staub aus der Luft, möglichst in verschiedenen Konzentrationen
- Die Evaluierung des Einflusses von Lagerung und Transport von Probeträgern auf den Endotoxingehalt
- Die Erstellung eines Standardprotokolls zur Durchführung von Ringversuchen für Pyrogen-Nachweisverfahren von Luftproben am Arbeitsplatz

Die über das Forschungsprojekt gewonnenen Informationen, Standardverfahren und technischen Voraussetzungen für die Qualitätssicherung sind für alle Institutionen im Bereich Arbeitsschutz von Bedeutung. Die Gefährdungsbeurteilung am Arbeitsplatz, die Beurteilung von Arbeitsschutzmaßnahmen und die Anpassung von Arbeitsplätzen zur Belastungsvermeidung bauen auf möglichst genauen und nachvollziehbaren Analysen auf. Nach der Probenahme durch Berufsgenossenschaften, Arbeitsschutz oder Institutionen der Unfallversicherungsträger werden die Proben an das IFA oder externe Labore zur Analytik vergeben. Ringversuche bieten hier die Möglichkeit, die Qualität von der Probenahme bis zur Analyse und Gefährdungsbeurteilung zu sichern.

Die Überprüfung der Pyrogenkonzentration am Arbeitsplatz beginnt mit der Sammlung, geht weiter über den Einfluss von Transport und Lagerung der Proben und endet bei der Analyse und Konzentrationsbestimmung. Für die Sammlung von pyrogenhaltiger Luft hat sich das Filtersystem etabliert. Dieses soll mit mögliche Alternativen verglichen werden. Um den Einfluss von Transport und Lagerung zu evaluieren, werden Luftproben auf Filtern gesammelt, unterschiedlich gelagert und transportiert und der Einfluss der unterschiedlichen Bedingungen analysiert. Um Ringversuche mit kontrolliertem und standardisiertem Material durchzuführen werden Standardprotokolle erstellt. Solche Ringversuche ermöglichen Analyselaboren ihre Ergebnisse zu vergleichen und damit eine Anforderung der Qualitätssicherung zu erfüllen. Alle diese Teilbereiche bauen darauf auf, dass reproduzierbar, standardisiertes Prüfmateriale in ausreichender Menge erstellt werden kann. Um das zu gewährleisten wird in einer Bioaerosolkammer eine Konstruktion zur Beaufschlagung von mehreren Quarzfasernfiltern eingerichtet und getestet.

3 Methodik

Um die Ziele des Projektes ENDOTOX zu erreichen und das beim IFA etablierte Filtersystem für die Sammlung von endotoxinhaltigem Staub zu testen wurden drei Arbeitspakete geplant. Dabei sollten mögliche alternative Sammelsysteme getestet, der Einfluss von Lagerung und Transport auf Filterproben eruiert und ein System für kontrollierte und reproduzierbare Ringversuche etabliert werden. Die Durchführung der Arbeiten wurde wie in Abbildung 1 dargestellt, geplant.

- Arbeitspaket 1.1 Etablierung eines standardisierten und kontrollierten Testaufbaues zur Herstellung von pyrogenhaltigen Aerosolen und gleichmäßiger Sammlung auf Filtern
- Arbeitspaket 1.2 Etablierung des Endotoxinnachweises am Standort Tulln, Wissensaustausch AIT-IFA
- Arbeitspaket 2.1 Herstellung von Prüfmaterial für die Evaluierung von Transport- und Lagerungsbedingungen
- Arbeitspaket 2.2 Überprüfung des Einflusses von Transport- und Lagerungsbedingungen
- Arbeitspaket 2.3 Test alternativer Sammelsysteme
- Arbeitspaket 3.1 Erstellung von Standardprotokollen für die Durchführung von Ringversuchen zur Evaluierung der Pyrogen-Analyse in Laboren
- Arbeitspaket 3.2 Durchführung eines Test-Ringversuches, Evaluierung der Ergebnisse und Adaption der Standardprotokolle

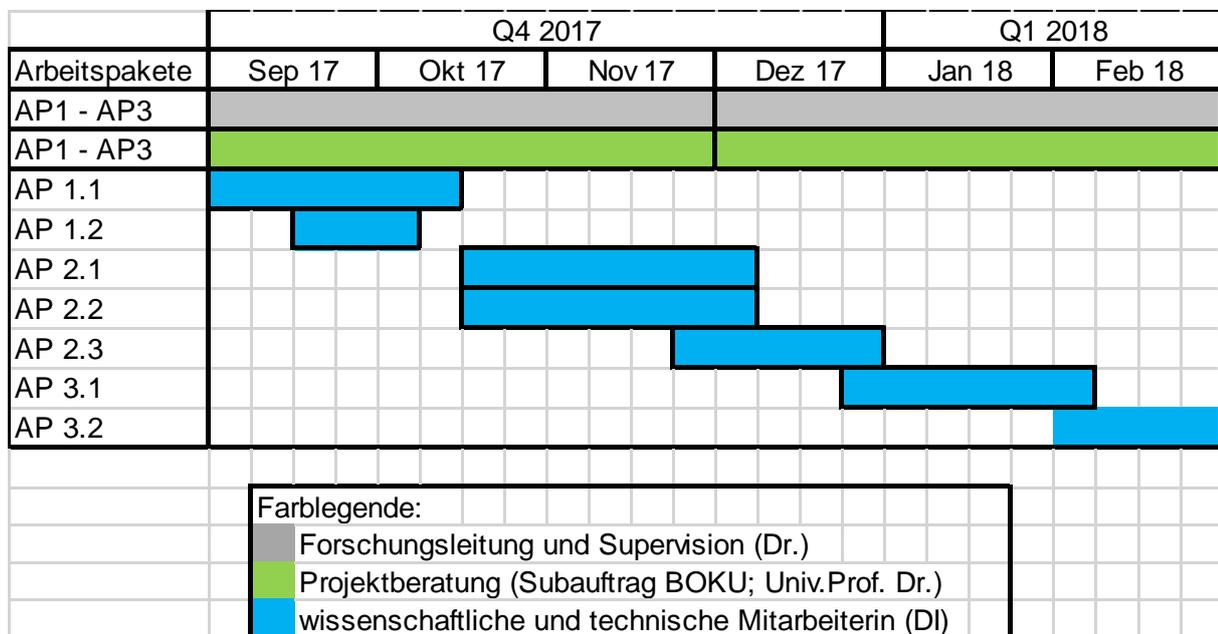


Abbildung 1 – Überblick über den geplanten Zeitablauf des Projektes ENDOTOX laut Antrag

Der Projektstart des Vorhabens wurde von September 2017 auf Februar 2018 verschoben. Mit Zusage der Förderung Ende August 2017 wäre ein Start im Herbst möglich gewesen, durch die Kooperation des AIT und des IFA (DGUV) wurde auf die Vorteile eines Kooperationsvertrages hingewiesen. Die Erstellung von diesem und die Organisation der Leihe der nötigen Geräte verzögerte den Beginn des Projektes. Außerdem war im Rahmen des Vorhabens ein Wissensaustausch für die Verarbeitung von endotoxinhaltigen Filterproben geplant, damit die Analysen bei AIT und IFA möglichst gleich ablaufen. Ein Termin dafür war erst im Februar 2018 möglich, weshalb der Projektstart auf den 1.2.2018 verlegt wurde.

Aufgrund der Verschiebung des Projektstarts in den Februar, fiel die Sommerferienzeit in die Projektlaufzeit. Das Setup zur kontrollierten Beaufschlagung von Filtern konnte davor etabliert und die ersten Protokollversionen erstellt werden. Durch die abwechselnden Urlaube im AIT und IFA konnten im Juni und Juli 2018 nur wenige Arbeiten durchgeführt werden. Der Großteil des Projektaufwandes hat sich in die Zeit zwischen August und November verschoben (siehe Abbildung 2). Nach der Urlaubszeit konnten die Termine für die Evaluierung der Transport- und Lagerungsbedingungen gefunden und ein Testringversuch durchgeführt und ausgewertet werden.

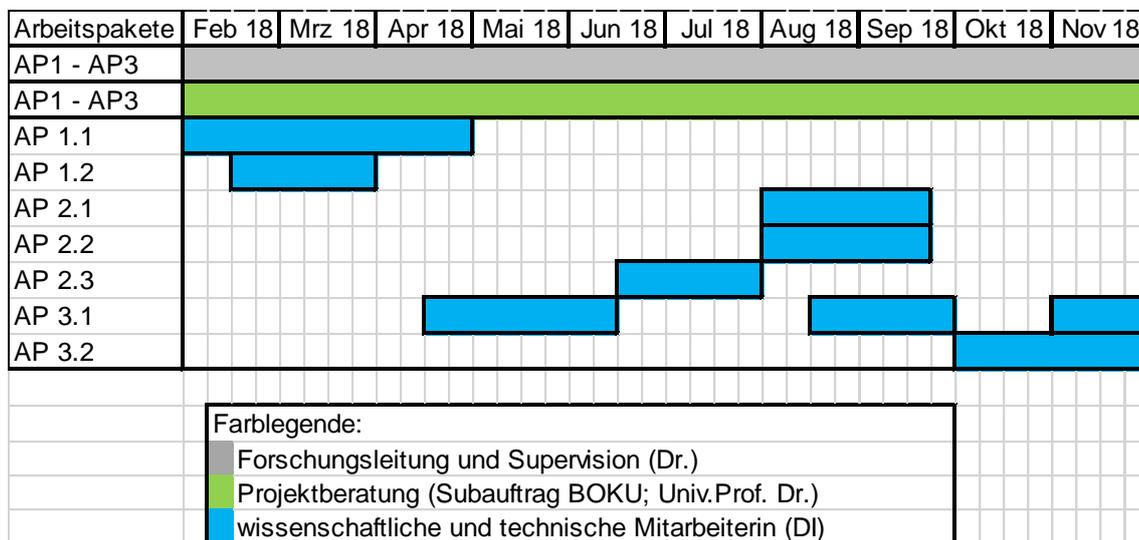


Abbildung 2 – Überblick über den tatsächlichen Zeitablauf des Projektes ENDOTOX

Inhaltlich konnte das Projekt in allen Punkten laut Antrag abgearbeitet werden. Im Kapitel „Ergebnisse des Gesamtvorhabens“ werden die durchgeführten Arbeiten und gewonnenen detailliert Erkenntnisse dargestellt.

4 Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Im Projekt wurden drei Arbeitspakete geplant und abgearbeitet. In Arbeitspaket 1, wurde ein standardisierter und kontrollierter Testaufbaues zur Herstellung von pyrogenhaltigen Aerosolen und gleichmäßiger Sammlung auf Filtern erstellt. In Arbeitspaket 2 wurden die Einflüsse von Lagerung und Transport auf die pyrogenhaltigen Proben analysiert und unterschiedliche Probensammelmethoden verglichen. In Arbeitspaket 3 wurden Standardprotokollen für die Durchführung von Ringversuchen zur Evaluierung der Pyrogen-Analyse in Laboren erstellt und getestet.

Erstellung eines standardisierten und kontrollierten Testaufbaus

Für alle geplanten Arbeiten zur Evaluierung von Lagerungs- und Transporteinflüssen und zur Etablierung von Ringversuchen, sind möglichst gleiche, reproduzierbare Probenträger nötig. Zur Produktion von Filtern mit einer definierten Menge an endotoxinhaltigem Staub, wurde das System der Bioaerosolkammer CCB3000, welches beim AIT in Tulln steht, eingesetzt. Die Verwendung der Bioaerosolkammer mit Stäuben wurde bereits 2013 von Konlechner et al. beschrieben (Konlechner et al. 2013). Weitere Verbesserungen an der Kammer gewährleiten nun eine noch gleichmäßigere räumliche Verteilung der Partikel (Pogner et al., 2019).

Ziel des ENDOTOX Testaufbaus war es möglichst viele Filter ohne Störung des Systems beaufschlagen zu können und reproduzierbare Konditionen zu schaffen, sodass Wiederholungen des gleichen Experiments zu gleichen Beladungen auf den Filtern führen. So können einerseits eine Vielzahl an Filtern gleich beaufschlagt werden und andererseits Experimente zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt werden (z.B. für jeden Ringversuch die gleiche Filterbeladung). Diese Wiederholbarkeit ist nur in einem kontrollierten System mit Standardprotokollen möglich.

Im Vorfeld zum Projekt ENDOTOX wurde die Kammer mit einer neuen Tür ausgestattet und die gleichmäßige Partikelverteilung erneut evaluiert. Ebenso wie in der Publikation von Konlechner et al. 2013, wurde Prüfstaub (Arizona Test Dust fine), ein Bürstendispersierger (RGB1000, PALAS GmbH) und ein optischer Partikelzähler (welas digital 2000, PALAS GmbH) eingesetzt. Die Partikelkonzentration und -größenverteilung wurde an 27 Punkten im Kammerraum gemessen siehe Abbildung 3.

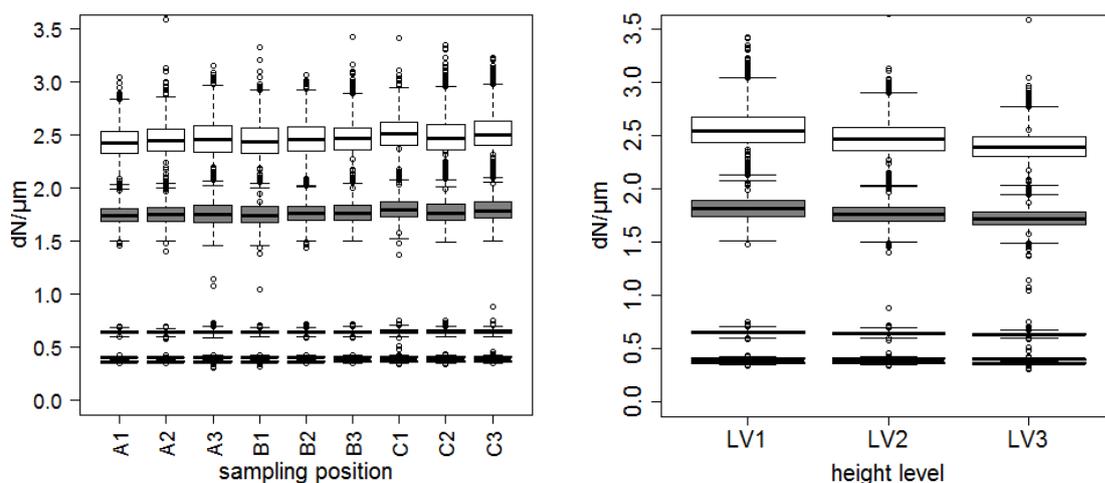


Abbildung 3 – Partikelverteilung an 27 Punkten im Prüfkammerraum der CCB3000. Sammelpositionen A1 – C3 stellen 9 gleichmäßig verteilte Positionen am Boden der Kammer dar, die Ergebnisse fassen alle drei Höhenstufen zusammen. LV1-LV3 stellen drei Höhenstufen dar, die Ergebnisse fassen alle 9 Positionen zusammen. Die Partikelverteilung wurde mit dem welas digital 2000 in unterschiedlichen Größenkanälen gemessen: 90 µm (weiß), 84 µm (hellgrau), gefolgt von 50 µm, 16 µm und 10 µm

Um eine Vielzahl an Filtern mit endotoxinhaltigem Staub beaufschlagt zu werden sollte ein Multisammelsystem (MoTec Konzepte) mit acht Probenahmeköpfen des GSP Systems in der Kammer eingesetzt werden. Das Multisammelsystem besteht aus einer Vorrichtung, an der acht Probenahmeköpfe befestigt sind, einem Ventilsystem, das eine zeitgleiche Öffnung und Schließung aller acht Schläuche veranlasst und einer Pumpe, die ausreichend Unterdruck erzeugt damit alle acht Probenahmeköpfe gleichzeitig sammeln können.

Eine gleichmäßige Partikelverteilung in der Kammer und eine gleichmäßige Sammlung durch den Multisammler sollten ebenso zu einer gleichmäßigen Beaufschlagung der Filter führen.

Um dies zu testen wurden an der Sammelkopfhalterung acht einzelne Gillian 5000 Pumpen angeschlossen und die Sammelköpfe einzeln und gemeinsam getestet (siehe Abbildung 4). Versuche zur gleichmäßigen Beaufschlagung von Filtern mit dem Multisammelsystem in der Bioaerosolkammer wurden mit *Cladosporium sphaerospermum* (ARWT1704) durchgeführt. Von diesem Pilz lassen sich einfach ausreichende Mengen an Sporen herstellen und diese anschließend auf Filtern über die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten quantifizieren. Damit ist ein kostengünstiger Vergleich vieler Proben möglich. Es wurden definierte Sporensuspensionen hergestellt und mit dem Aerosolgenerator LSA (CH-Technologies) aerosolisiert. Die Sammlung erfolgte auf Polycarbonatfilter, welche auf Nährmedium aufgelegt und für 5 Tage inkubiert wurden. Danach wurde die Anzahl an koloniebildenden Einheiten pro Platte gezählt und KBE/m^3 berechnet (vergleiche Pogner et al. 2019).



Abbildung 4 – links: Aufbau der Sammelkopfhalterung mit angeschlossenen Pumpen in der Bioaerosolkammer CCB3000. Rechts: Filterhalter und Transportdöschen des GSP Kopfes

Tests mit *Cladosporium sphaerospermum*

In den Vortests wurde zunächst eruiert, ob sich die Sammeleffizienz der Probenahmeköpfe unterscheidet, wenn die Pumpen nacheinander in Betrieb genommen werden bzw. parallel laufen. Abbildung 5 A) zeigt einen deutlichen Unterschied der KBE/m^3 die bei gleichzeitiger oder einzelner Sammlung erreicht werden konnten. Die Schwankung zwischen den Probenahmeköpfen (relative Standardabweichung) ist in beiden Varianten mit 24 bzw. 28 % ähnlich. Dieser Unterschied kann einerseits durch den Unterschied zwischen gleichzeitig und einzelner Sammlung als auch durch Unterschiede zwischen zwei Probenahmen resultieren. Um diesen Unterschied weiter zu untersuchen wurden in einem weiteren Test der Einfluss bei der parallelen Sammlung über eine diagonale betrachtet. Hierbei verbindet die diagonale zwei Probenahmeköpfe im 45° Winkel, die halbe diagonale im $22,5^\circ$ Winkel (siehe Abbildung 5 B). Abbildung 5 C) und D) zeigen, dass kein

deutlicher Unterschied zwischen der Sammlung einzeln oder parallel über die Diagonale oder die Halbdigonale beobachtet werden konnte.

Da keine Unterschiede zwischen der einzelnen Sammlung und dem parallelen Betrieb der Pumpen festgestellt werden konnte und der Vergleich des Betriebes aller Sammelköpfe gleichzeitig und getrennt keinen Unterschied in der Streuung der Ergebnisse zeigte, wurde im nächsten Schritt die Sammlung mit acht Einzelpumpen mit dem Multisammler verglichen. In Abbildung 6 A) ist zu sehen, dass die Variation zwischen den Sammelköpfen beim Multisammler etwas höher war, als bei den Einzelpumpen (relative sd: 17 % bzw. 11 %). Die wiederholte Sammlung mit dem Multisammler zeigt allerdings, dass die Abweichungen zwischen den Probenahmeköpfen von Sammelvorgang zu Sammelvorgang variieren. Bei den vier Wiederholungen konnten relative Standardabweichungen von 6 %, 5 %, 8 % und 9 % erhoben werden. Die Konzentration war bei jeder Wiederholung etwas unterschiedlich, dies ist durch den manuellen Eingriff in das Kammersystem zum Tausch der Filter und die manuelle Justierung der Aerosolerzeugung begründet. Es ist also notwendig für jede Sammlung Kontrollen durchzuführen um Abweichungen in der Konzentration zu erkennen. Für die Unterschiede zwischen den Sammelköpfen jeder Sammlung (relative Standardabweichung) konnte kein Muster erkannt werden. Es dürfte generell zu leichten Unterschieden zwischen den Proben kommen, diese sind nicht von der Position des Kopfes abhängig (Abbildung 7 B).

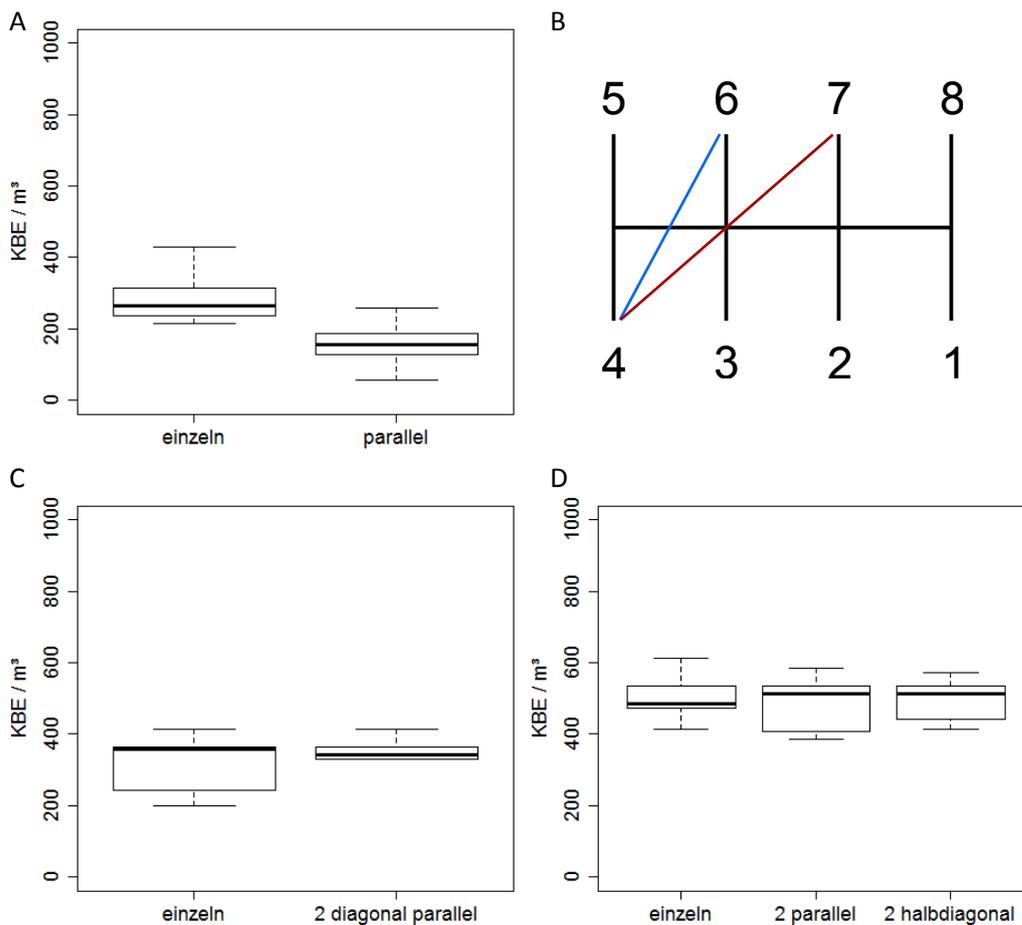


Abbildung 5 – Ergebnisse der Evaluierung der Sammelkopfhaltung in der CCB3000 mit *Cladosporium sphaerospermum* und *Gilliam 5000* Pumpen. A) vergleich der Sammlung mit Pumpen parallel bzw. nacheinander; D) Schema der Position der Probenahmeköpfe und der langen (rot) bzw. halben (blau) Diagonale; C) Vergleich der Sammlung einzeln bzw. über die lange diagonale; D) vergleich der Sammlung einzeln bzw. über die lange und halbe diagonale;

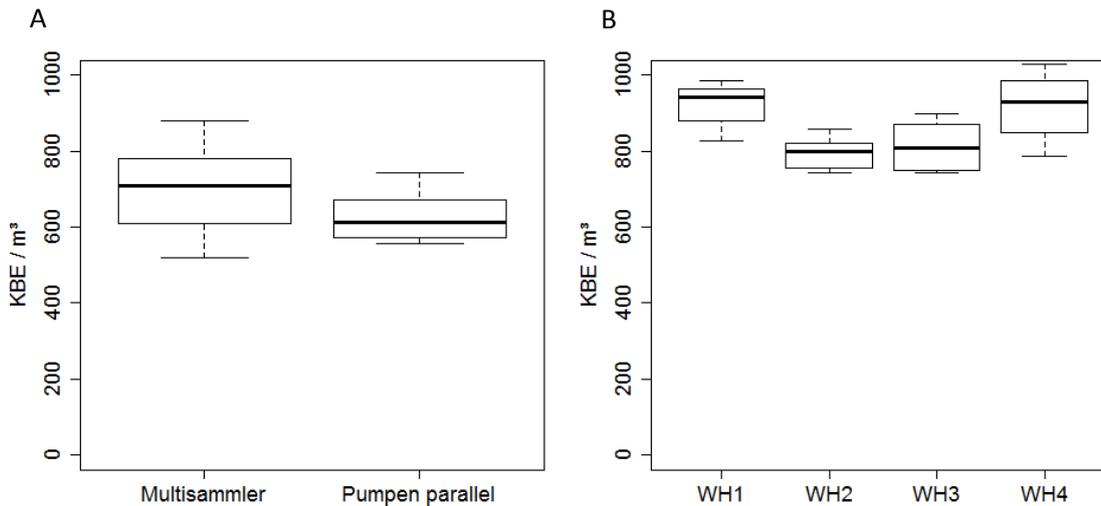


Abbildung 6 – Darstellung der Sammlung von *Cladosporium sphaerospermum* Sporen, A) Vergleich der parallelen Sammlung mit dem Multisammler und acht einzelnen Pumpen, die an die Sammelkopfhalterung angeschlossen waren; B) vier Wiederholungen der Sammlung mit dem Multisammler

Etablierung des Endotoxin-Nachweissystems

Anschließend zu den Vorversuchen mit *Cladosporium* Sporen sollte die Gleichverteilung zwischen den Probenahmeköpfen und Variationen zwischen Wiederholungen mit endotoxinhaltigem Staub (Schweinegestallstaub) und einem Endotoxin-Nachweis System (Haemotox rFC, Haemochrom Diagnostica AB) durchgeführt werden. Der Schweinegestallstaub wurde vom SVLFG Deutschland gesammelt, gemahlen, gesiebt und eine Korngrößenbestimmung durchgeführt. Der Staub stellt eine natürliche Mischung aus Substanzen dar, die an belasteten Arbeitsplätzen vorgefunden werden können. Bei dem Staub aus Schweinegeställen handelt es sich um einen gut charakterisierten Prüfstaub, der nachweislich pyrogene Substanzen enthält.

Um für die späteren Arbeiten, in denen Analysen in Tulln und am IFA vergleichend durchgeführt werden, möglichst gleiche Arbeitsabläufe und Einstellungen zu verwenden, wurden die Arbeitsanweisungen vom IFA zur Verfügung gestellt und bei einem Wissensaustausch, die Arbeiten gemeinsam durchgeführt.

Bei der Etablierung des Haemotox rFC Systems in Tulln musste zunächst der Fluoreszenzreader auf das Nachweisverfahren eingestellt werden, da der rFC Kit nur mit einem bestimmten Reader getestet wurde (siehe Anhang 1). Zunächst wurde laut Protokoll eine Standardreihe von 0,005 EU/mL bis 50 EU/mL hergestellt und diese mit dem Kit und dem Fluoreszenzreader in Tulln (Synergy MX, BioTek) getestet. Die Fluoreszenzmessung erfolgte kontinuierlich um mögliche Fehler nachvollziehen zu können. Bei der höchsten Konzentration der Standardreihe (50 EU/mL) kam es bereits nach 30 Minuten Inkubationszeit zu einer Überladung des Signals. Auch die zweithöchste Konzentration (5 EU/mL) kam es vor dem Erreichen der 60 Minuten Inkubationszeit (laut Protokoll des Kits) zu einer Überladung des Signals.

Nach Rücksprache mit den Herstellern von Kit und Fluoreszenzreader wurden die Einstellungen so geändert, dass die Sensitivität des Readers statt auf 5000 RFU (relative Fluoreszenzeinheiten) auf 2000 RFU beim 0,05 EU/mL Standard eingestellt wird. Mit diesen Einstellungen konnten Standardreihen hergestellt und vermessen werden, die nach 60 Minuten Inkubationszeit keine Überlagerung erzeugten und Ergebnisse lieferten. Die Standardreihen zeigten sehr gute Übereinstimmung zur den erwarteten Steigungsfunktionen.

Die kontinuierliche Messung der Fluoreszenz wurde weiter beibehalten um Abweichungen und Schwankungen während der Inkubationszeit zu verfolgen. Zur Auswertung der EU Gehalte wurde entsprechend dem Protokoll die Analyse nach 60 Minuten Inkubationszeit herangezogen.

Tests mit Schweinestallstaub

Nach der Etablierung der gleichmäßigen Beaufschlagung und des Nachweisverfahrens, war es möglich die gleichmäßige Sammlung von Schweinestallstaub mit anschließendem Endotoxinnachweis durchzuführen.

Der Staub wurde mittels eines Bürstendispersierers (RGB 1000, PALAS GmbH) aerosolisiert und auf Quarzfaserfilter (37mm Grade QMA, Whatman) gesammelt. In der Vorarbeit zu dem vorliegenden Projektantrag wurde der Prüfstaub bereits erfolgreich im Bioaerosoltestsystem am UFT aerosolisiert. Es konnte eine gleichmäßige Partikelanzahl- und Partikelgrößenverteilung über Raum und Zeit festgestellt werden. Bei der Erzeugung von Bioaerosolen und der Arbeit im Testsystem wird nach VDI 4852 Blatt 1 und Blatt 2 vorgegangen (Blatt 2 zurzeit im Gründruck).

Die Sammelköpfe und Quarzfaserfilter, sowie das Extraktions- und Nachweismaterial wurde entweder pyrogenfrei gekauft oder durch Hitze (4h 200°) pyrogenfrei gemacht. Die Bestimmung des Endotoxingehaltes erfolgt in zwei Wiederholungen je Probe. Abbildung 7 zeigt, dass es ebenso wie für die Sammlung von *Cladosporium* zu Unterschieden zwischen den Positionen der Sammelköpfe kommt und in einzelnen Wiederholungen unterschiedliche mittlere Konzentration an Endotoxin nachgewiesen werden konnten. Die relativen Standardabweichungen der Wiederholungen waren bei 10 % (rot), 12 % (lila) und 8 % grün. Diese Abweichungen stellen ein Summenparameter der Abweichungen durch die Verteilung in der Kammer, die Sammlung, die Verarbeitung der Proben und die Messung mittels rFC Kit, dar.

Da diese Schwankungen im biologischen Bereich als normal angesehen werden, wurde der Aufbau, die Einstellungen und die Durchführung der Sammlung in Standardprotokollen festgehalten und diese für die weiteren Arbeiten verwendet.

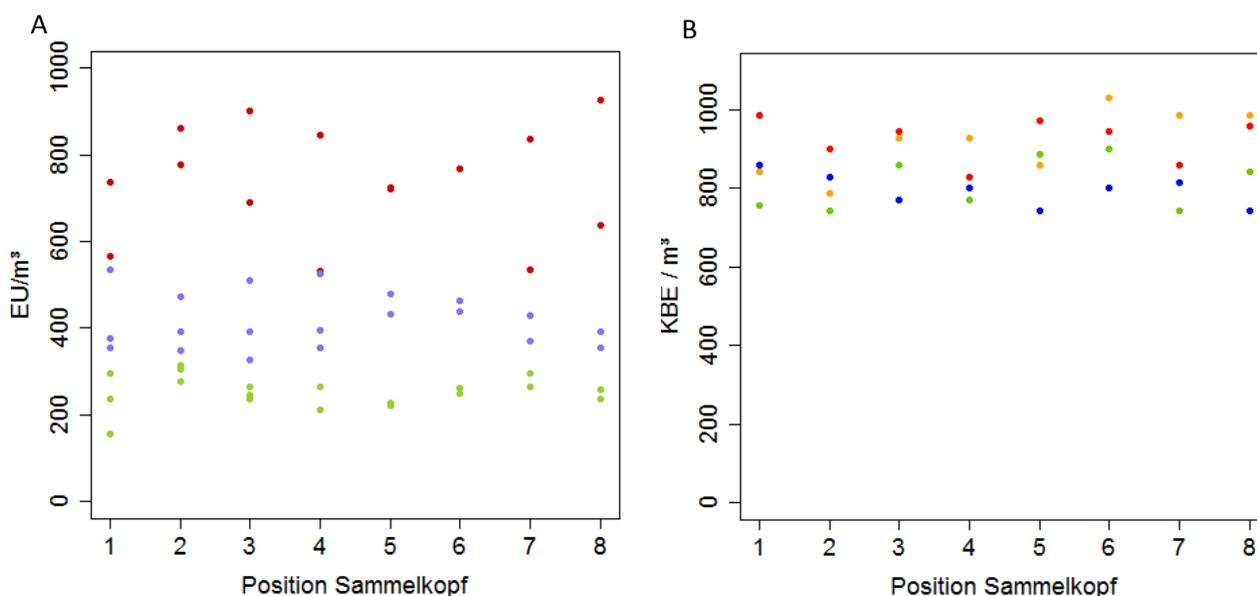


Abbildung 7 – Ergebnisse der wiederholten Sammlung und Analyse von beaufschlagten Filtern. A) 3 Beaufschlagungen mit unterschiedlichen Mengen an Schweinestallstaub; Je Probe wurden zwei Messungen mit dem Analysesystem Haemotox rFC durchgeführt; B) 4 Beaufschlagungen der gleichen Konzentration von *Cladosporium sphaerospermum*; Angegeben ist die Position des Sammelkopfes im Multisammler (x-Achse). Die Wiederholungen sind farblich gekennzeichnet.

Evaluierung von Lagerungs- und Transportbedingungen

Um den Einfluss von Lagerung und Transport auf den Endotoxingehalt der Probenträger zu analysieren, wurden Filter in mehreren Wiederholungen und Replikaten mit pyrogenhaltigem Prüfstaub beaufschlagt. Insgesamt wurden 80 Quarzfaserfilter mit Schweinestallstaub produziert. Um Einflüsse der Aerosolerzeugung und Sammlung gering zu halten, wurde eine Füllung des RGB mit Schweinestallstaub verwendet und alle Filter an einem Tag, in zehn Sammelvorgängen (A-J) beaufschlagt.

Lagerung

Von diesen 80 Filtern wurden 64 für die Evaluierung der Lagerungszeit und -bedingungen eingesetzt. Dafür wurden die Filter der Sammelwiederholungen A-H verwendet. Um eventuelle Schwankungen zwischen den Sammelwiederholungen zu erfassen wurden aus jedem Sammelvorgang zwei der acht Proben als Kontrollen verwendet. Diese Kontrollen bestanden jeweils aus dem Filter an Position 8 und einem an einer zweiten Position die bei jeder Sammelwiederholung gewechselt wurde.

Die Analyse der Kontrollproben zeigt, dass es im Verlauf der Sammlung zu erhöhten Konzentrationen auf den Filtern gekommen ist (Abbildung 8). Teilweise kam es auch zu starken Schwankungen zwischen den beiden Kontrollproben einer Beaufschlagung.

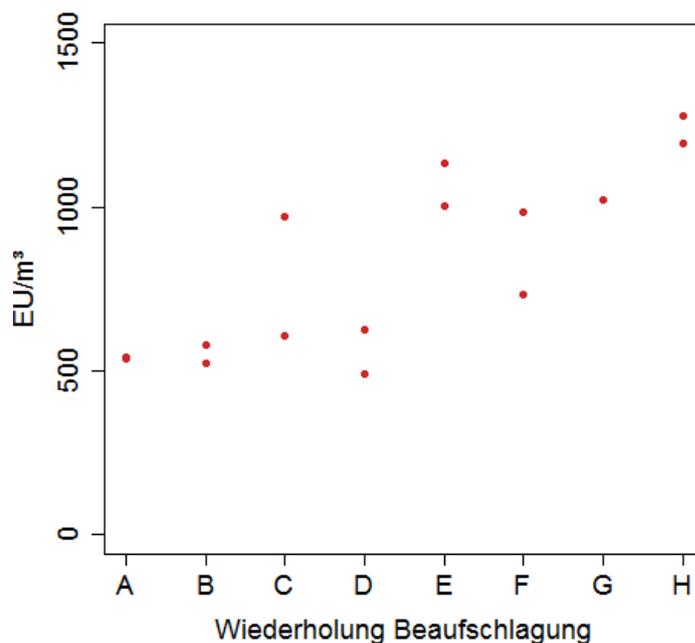


Abbildung 8 – Ergebnisse der Analyse der Kontrollproben für den Test der Lagerung. Je Sammelwiederholung wurden zwei Proben als Kontrollen analysiert.

Nach der Beaufschlagung wurden alle Proben bis auf die Kontrollen verpackt und an das Partnerlabor des IFA in St. Augustin gesendet. Dort wurden die Proben bei drei verschiedenen Bedingungen bis zu 14 Tage gelagert. Als Lagerungsbedingungen wurden getestet: I) im Döschen bei Raumtemperatur, II) Filter nach Ankunft in Glasgefäß überführt, Lagerung bei 4 °C, III) Lagerung im Döschen bei 4 °C. Die Überfuhr in ein Glasgefäß wurde getestet, da die Besorgnis bestand, dass eine Lagerung bei 4 °C zu Kondenswasserbildung

und Rosten der Döschen führen könnte. Für jede Kombination Lagerungszeit und -bedingung wurden 4 Filter analysiert.

Abbildung 10 links zeigt, dass für die Lagerungszeit kein Einfluss auf den Endotoxingehalt der Filter gefunden werden konnte. In dieser Grafik ist d0 als der Tag nach der Sammlung eingezeichnet, an dem die Kontrollen analysiert wurden. Ab d3 fand Analyse von Proben im Labor des IFA statt. Bei der Lagerungsbedingung konnte ein leichter Unterschied zwischen den Bedingungen gefunden werden, die Lagerung bei 4 °C lieferte an jedem Analysetag die höchsten Werte. Die Ergebnisse unterlagen jedoch auch den höchsten Schwankungen.

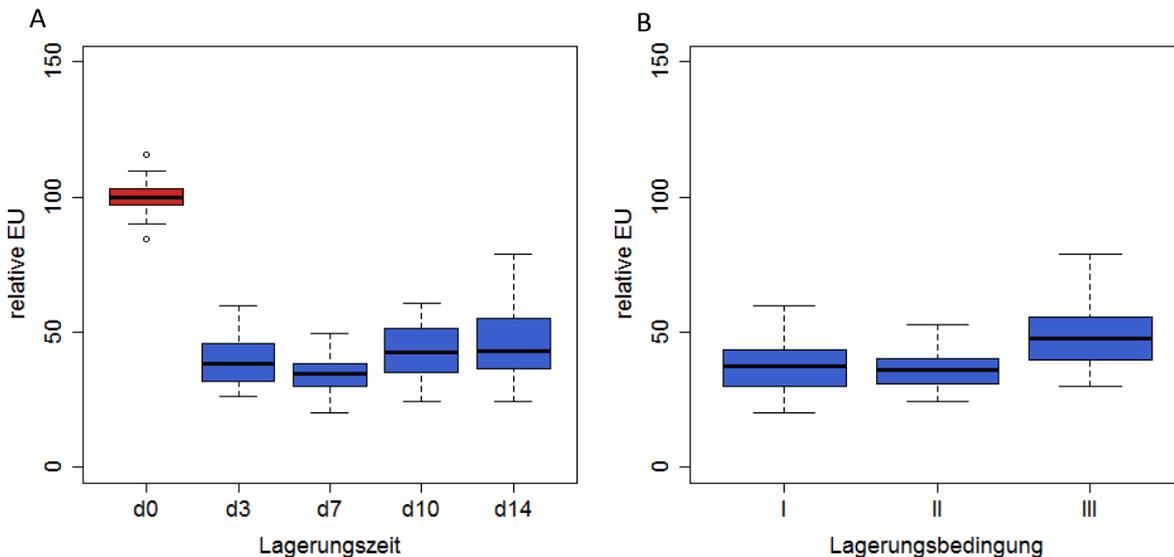


Abbildung 9 – Ergebnisse der Lagerungszeit (d0 – d14) und Lagerungsbedingungen (I, II, III); die Ergebnisse sind relativ zu den Kontrollfiltern der jeweiligen Sammelwiederholungen (A-H) angegeben; rot – Ergebnisse der Kontrollfilter, Analyse AIT; blau – Ergebnisse der Testfilter, Analyse IFA; Lagerungsbedingungen: I) RT in Döschen, II) 4 °C in Glasgefäß, III) 4 °C in Döschen

	d3	d7	d10	d14
I	335,00	290,00	360,71	305,71
II	272,14	300,00	315,71	304,29
III	440,00	408,57	399,29	478,57

Tabelle 1 – Median der EU/m³ Ergebnisse der vier Filter die für jede Kombination Lagerungszeit (d3 – d14) und Lagerungsbedingung (I, II, III) getestet wurden, Analyse IFA. I) RT in Döschen, II) 4 °C in Glasgefäß, III) 4 °C in Döschen

Transport

Um einen möglichen Einfluss des Transportes auf die Filterproben zu eruieren, wurden 16 der 80 beaufschlagten Filter für den Transporttest verwendet. Von den zwei Beaufschlagungswiederholungen I und J wurden je vier Filter im AIT und vier im IFA analysiert. Von diesen vier Filtern wurden je zwei bei Raumtemperatur und zwei bei 4 °C transportiert. In Summe wurden je Lagerungsbedingung vier Filter von jedem Institut analysiert. Der Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass im IFA deutlich weniger Endotoxineinheiten gemessen wurden als am AIT (Abbildung 11).

Beim Transport wurden durch die großen Erschütterungen einige Döschen geöffnet und es wird vermutet, dass dadurch Endotoxinmaterial verloren gegangen ist. Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob diese Abweichung durch den Transport alleine oder durch die anderen Analysebedingungen im Labor entstanden sind, auch wenn das gleiche Protokoll zur Extraktion und Endotoxinmessung verwendet wurde.

Um einen Verlust beim Transport zu verhindern wurde das Standardprotokoll angepasst und ein Verschluss mittels Klebefilm oder Kreppband vorgesehen.

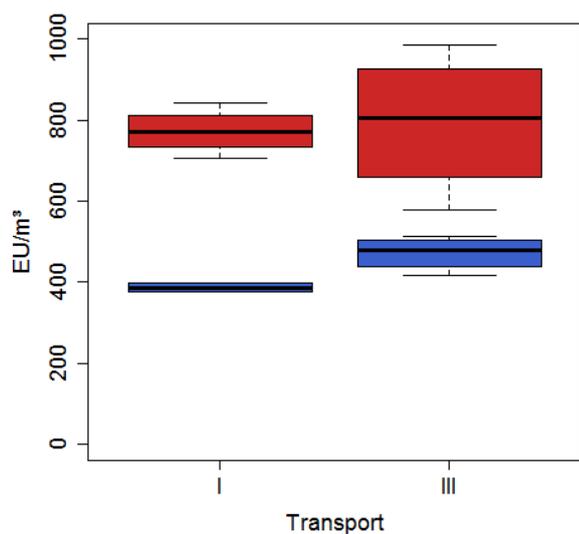


Abbildung 10 – Ergebnisse des Transportversuches. Die Filter stammen aus zwei Sammelvorgängen. Je Sammelvorgang wurden zwei Filter pro Institut und Lagerungsbedingung analysiert.; rot – Ergebnisse der Analyse ohne Transport, im AIT; blau – Ergebnisse der Analyse mit Transport, am IFA; Lagerungsbedingungen: I) RT in Döschen, III) 4 °C in Döschen

Die Daten, die aus den Transport- und Lagerungsversuchen gewonnen wurden, sind in die Erstellung eines Standardprotokolls eingeflossen: Die Probendöschen sollen nach der Beaufschlagung mit einem Klebefilm verschlossen und bei Raumtemperatur bis zu 14 Tage trocken gelagert werden.

Mögliche alternative Sammelsystem

Die Sammlung auf Quarzfaserfilter stellt zurzeit das häufigste Luftprobenahmesystem zur Überprüfung des Pyrogengehaltes am Arbeitsplatz in Deutschland dar. Zur Vorbereitung für die Analyse werden die Filter abgewaschen, dadurch kommt es zu einer starken Verdünnung der Proben und einer Einschränkung bezüglich des Detektionslimits. Angelehnt an Systeme, die für die Allergenbestimmung etabliert wurden, werden vier alternative Systeme zur Sammlung auf Filter getestet. Um zu evaluieren, ob andere Sammelsysteme, die teilweise einen höheren Luftvolumenstrom aufweisen als das GSP System, für die Sammlung von Endotoxine einsetzbar wären, wurde ein Vorversuch mit 4 Sammelsystemen durchgeführt. Für jedes Sammelsystem wurden aufgrund der hohen Analysekosten lediglich zwei Wiederholungen durchgeführt, weshalb die Daten nur als Trend anzusehen sind.

Da aus Platzgründen nicht alle Sammelsysteme gleichzeitig getestet werden konnten, wurde das GSP System als Referenz genutzt und in allen vier Beaufschlagungswiederholungen verwendet. Für alle Methoden wurde endotoxinfreies Material und endotoxinfreies Wasser zur Extraktion bzw. Sammlung verwendet. Für den AS100 (UA Holbach) wurden Mikrotiterstreifen (8 Wells) als Sammelmedium verwendet. Der Sammelkopf verfügt über 7 Probeneingänge, wodurch die achte Probe als Blindwert verbleibt. Der BC112 (NIOSH) sammelt in ein konisches 1,5mL Reaktionsgefäß. Partikel die nicht im Reaktionsgefäß abgeschieden werden, werden in einem Filter gesammelt. Der Coriolis μ (Bertin) sammelt standardmäßig in ein konisches Gefäß, welches mit Sammelflüssigkeit (in diesem Fall Wasser) gefüllt ist. In diesem Versuch wurde ebenfalls die Sammlung in das Gefäß ohne Flüssigkeit getestet.

Der Coriolis μ sammelt mit einem Volumenstrom von 100L/min, weshalb er separat betrieben wurde. Der AS100 (30L/min) und der BC112 (3,5L/min) wurden gleichzeitig mit dem Referenzsystem (GSP 3,5L/min) betrieben. Für den Coriolis μ wurde die Sammlung in Flüssigkeit (COR_liq) und die Sammlung im trockenen Sammelgefäß (Spülen nach der Sammlung mit 10mL) durchgeführt. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse des Vergleiches. Für den AS100 wurden nur die Wells mit Proben herangezogen. Für den BC112 wurden die Werte von Filter und Reaktionsgefäß zusammengefasst. Die Ergebnisse dieses Vergleiches und die Arbeiten von Duquenne et al. (2018) zeigen den BC112 als mögliche alternative Sammelmethode zum GSP System.

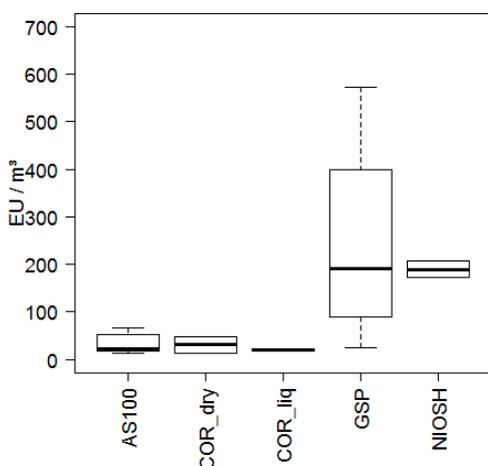


Abbildung 11 – Ergebnisse des Vergleiches von vier Sammelsystem für die Sammlung von Schweinestallstaub und die folgende Analyse von Endotoxinkonzentrationen. MASS30 AS100 Sammelsystem (UA Holbach) sammelt in Mikrotiterstreifen (trocken), der Coriolis μ (Bertin) wurde mit 10mL Sammelflüssigkeit (COR_liq) und mit trockenem Probenahmegefäß (COR_dry) und nachfolgendem ausspülen getestet; der BC112 (NIOSH) sammelt in 1,5mL Reaktionsgefäße und scheidet übriges Material auf Filter ab. Die Sammelsysteme wurden in je zwei Beaufschlagungswiederholungen getestet, das GSP System dient dabei als Referenz in allen vier Beaufschlagungen.

Etablierung und Durchführung eines Testringversuches

Um die Qualität der Ergebnisse aus verschiedenen analytischen Laboren zu vergleichen werden im Allgemeinen Ringversuche durchgeführt. Aus Mangel an standardisierten pyrogenhaltigen Luftproben sind Ringversuche für die Analyse von Arbeitsplatzluftproben bisher sehr selten. Außerdem sind Ringversuche mit „Freilandproben“ bereits probennamebedingt mit hohen Variationen verbunden.

Um die Qualitätssicherung in diesem Bereich zu ermöglichen wurden zunächst Protokolle zur Herstellung von Prüfmaterial erarbeitet. Diese Protokolle beinhalten die Vorgehensweise zur Herstellung von Prüflingen in verschiedenen Konzentrationen, sowie Angaben zur Lagerung und zum Versand der Prüfobjekte. Außerdem wurden Protokolle für die interne Qualitätskontrolle, den Vergleich der Ergebnisse und die Analyse der Daten erstellt.

In einem internen Test-Ringversuch sollten diese Protokolle auf ihre Praxistauglichkeit überprüft und gegebenenfalls angepasst werden. Ziel des Ringversuches war es verschiedene Laboren und deren Umsetzung von Arbeitsanweisungen miteinander zu vergleichen und offene Punkte im Protokoll zu detektieren.

Für den Testringversuch wurden Quarzfaserfilter (37mm Ø) mit endotoxinhaltigem Prüfstaub beaufschlagt. Es wurden Prüflinge mit drei verschiedenen Pyrogenkonzentrationen hergestellt. Die Negativkontrollen stellten nicht mit Staub beaufschlagte Filter dar. Filter mit einer niedrigen Konzentration wurden mit rund 100 EU/m³, sowie diejenigen mit einer hohen Konzentration mit rund 500 EU/m³ beaufschlagt. Die Sammlung der niedrigen und der hohen Konzentration erfolgte jeweils in drei Durchgängen.

Jedes teilnehmende Labor erhielt jeweils zwei Filterproben von jeder Konzentration, insgesamt sechs Proben pro Teilnehmer. Die Proben waren anonymisiert, die zu messenden Konzentrationen wurden vorab nicht genannt. Das Sammelvolumen wurde angegeben um die Berechnung der Ergebnisse in EU/m³ zu ermöglichen.

Insgesamt haben sich neun Labore an dem Ringversuch beteiligt. Jedes teilnehmende Labor wendete seine eigenen Hausverfahren zur Extraktion der Proben und zur Bestimmung des Endotoxingehaltes an. Die Ergebnisse wurden als EU/mL (Rohwert) und als EU/m³ (berechnetes Ergebnis) angegeben.

Referenzmessungen

Für die Referenzmessungen wurden von jeder Sammlung in der Bioaerosolkammer (hohe Konzentration - A, B, C, niedrige Konzentration - D, E, F) zwei Filter als Kontrollproben verwendet. Dabei wurden immer die gleichen Positionen am Multisammler als Kontrollen herangezogen.

Für die Negativkontrolle wurde keine Sammlung und nach dem backen (4 h 200 °C) kein Öffnen der Filterhalter durchgeführt. Als Kontrolle wurden vier Filter extrahiert und analysiert.

Die Konzentration der Proben lag für A, B und C im Mittel bei 650 EU/m³ und für D, E, F bei 120 EU/m³. Die Negativkontrollen lagen alle unter der Nachweisgrenze Abbildung 12 A).

Ergebnisse Teilnehmer

Alle Labore haben die Berechnung von EU/mL auf EU/m³ korrekt durchgeführt.

Von den Teilnehmern wurden drei verschiedene Testverfahren von drei verschiedenen Herstellern verwendet.

- rFC Nachweis von Haemochrom (rFC_H)
- rFC Nachweis von Lonza (rFC_L)
- LAL Nachweis von Lonza (LAL_L)
- LAL Nachweis von Charles River, Endosafe (LAL_ES_CR)
- LAL Nachweis von Charles River, Endochrom (LAL_CR)
- LAL Nachweis von ACC, Pyrochrome (LAL_P)

Mit zwei Ausnahmen wurden die Negativkontrollen von allen Teilnehmern richtig bestimmt. Die nicht beaufschlagten Filter von Teilnehmer 6 lagen im positiven Bereich und eine Negativprobe von Teilnehmer 1 wurde mit dem rFC Kit auf über 500 EU/m³ bestimmt, mit dem LAL lag der Wert jedoch bei Null.

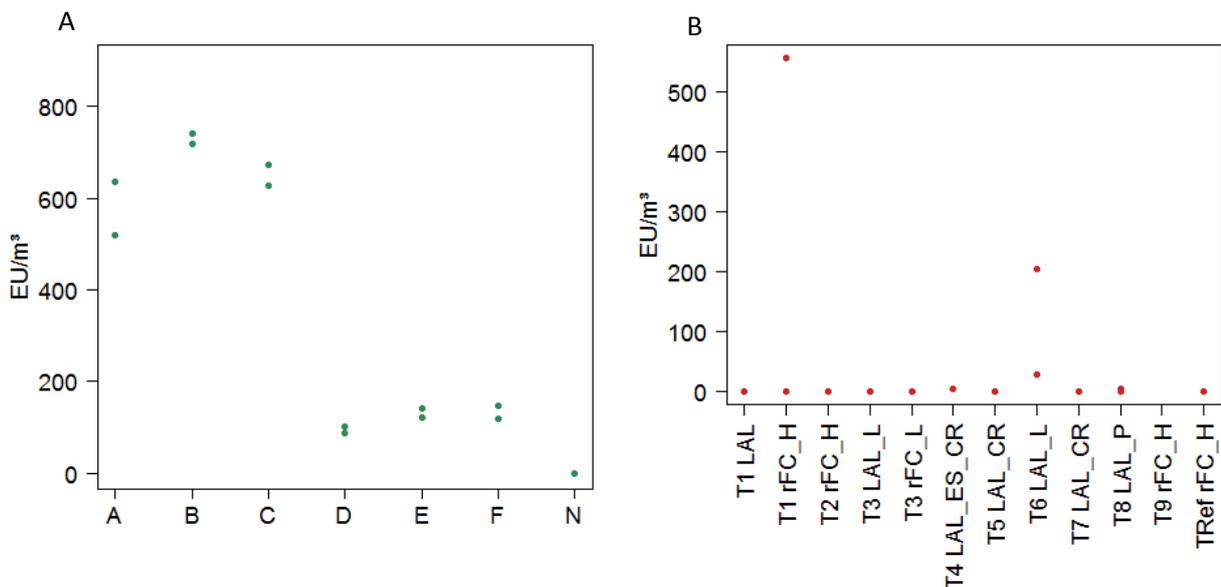


Abbildung 12 – A) Ergebnisse der Kontrollmessungen. Je Sammeldurchgang in der Bioaerosolkammer (A, B, C, D, E, F) wurden zwei Filter als Kontrollen direkt am Tag der Beaufschlagung analysiert. Für die Negativkontrolle wurden 4 Filter analysiert.

B) Ergebnisse der Negativkontrollen der Teilnehmer und der Referenzmessung. T1-T8 gibt die Teilnehmernummer an, danach ist der verwendete Test und Hersteller (soweit bekannt) angegeben

Bei Betrachtung der Ergebnisse für die hohe und die niedrige Konzentration, fällt auf, dass Teilnehmer 3 jeweils höhere Werte bei Verwendung des LAL-Tests als Analyseverfahren im Vergleich zum rFC-Test erhalten hat. Die Ergebnisse von Teilnehmer 6 liegen, genau wie bei der Negativkontrolle, deutlich über dem Durchschnitt der anderen Teilnehmer und der Referenzergebnisse.

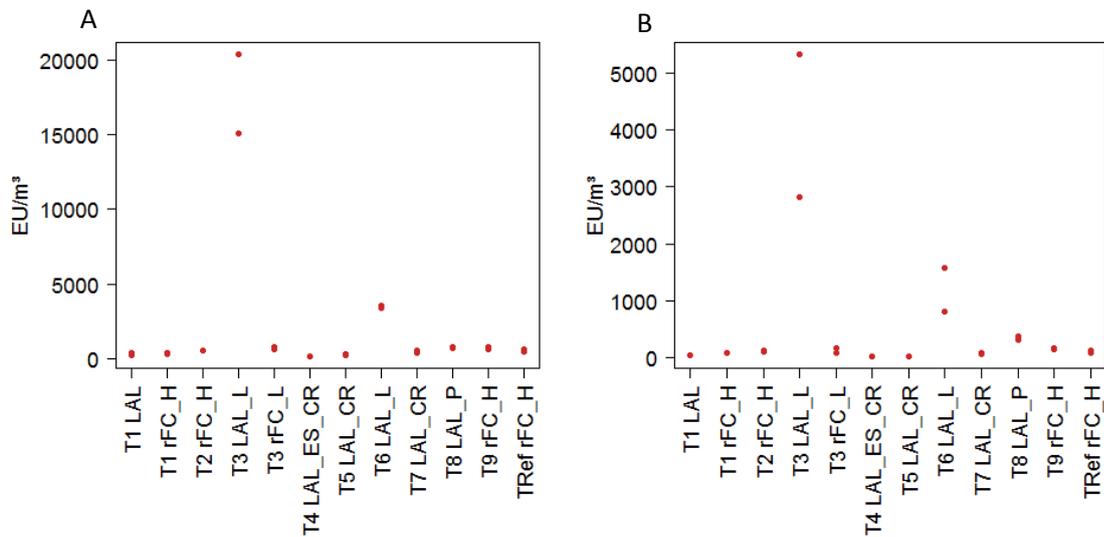


Abbildung 13 – Ergebnisse der Teilnehmer und der Referenz für die Proben mit geringer und hoher Konzentration, Darstellung aller Ergebnisse

Werden die Ergebnisse ohne die Werte von Teilnehmer 3, LAL-Test und Teilnehmer 6 dargestellt, wird ersichtlich, dass die meisten Ergebnisse im Bereich von 50 % bis 200 % (rote Linien) der Referenzwerte (grüne Linie) liegen. Die Ergebnisse von Teilnehmer 4 und 5 waren, bei beiden Konzentrationen unter der 50 % Marke lagen. Aus den Protokollen der Teilnehmer wurde ersichtlich, dass die Proben von Teilnehmer 4 bei -80 °C eingefroren wurden, dies könnte die geringen nachgewiesenen Konzentrationen erklären. Die Proben von Teilnehmer 5 wurden erst drei Monate nach der Beaufschlagung analysiert.

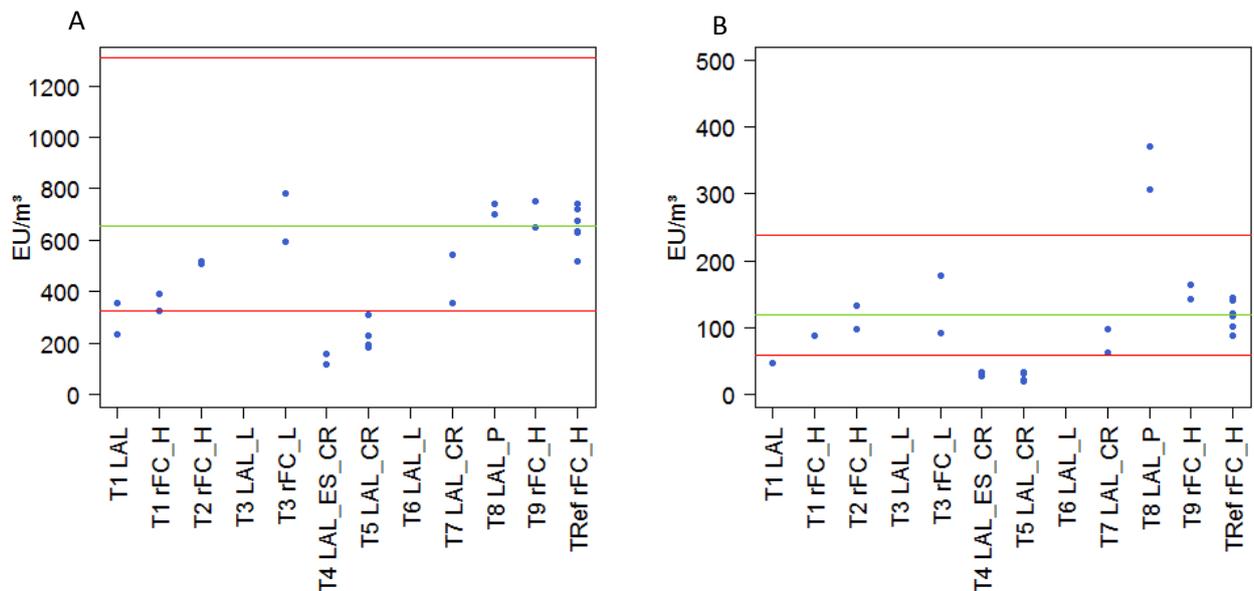


Abbildung 14 – Ergebnisse der Teilnehmer und der Referenzmessungen für die Proben mit geringer und hoher Konzentration, ohne die Ergebnisse von T3 LAL und T6; grüne Linie – median der Referenzmessungen, rote Linien – 50 und 200 % des Referenzmedian

Die Standardprotokolle, die für die Durchführung des Testringversuchs verwendet wurden, wurden weiter adaptiert. Der Transport der Prüflinge zum Ringversuchsteilnehmer dauerte zwischen 10 und 14 Tage. Dieser Punkt soll durch eine andere Versandmöglichkeit optimiert werden. Die Ergebnisse lagen überwiegend innerhalb der erlaubten Grenzen von 50 und 200 % der jeweiligen Referenzwerte. Die für die Ringversuche hergestellten Pyrogenkonzentrationen wurden somit als praktikabel für eine solche Probenvergleichsuntersuchung empfunden.

In einem weiteren Ringversuch könnten der Konzentrationsbereich, in dem die zu messenden Werte liegen vorab genannt werden (z.B. 0 bis 2000 EU/m³). Des weiteren könnten vorab zusätzliche Informationen zur Vorgehensweise bei Extraktion und Analyse gegeben werden, wie z.B. Lagerung der Proben bei Raumtemperatur bis zur Extraktion, Extraktionsvolumen, Analyse innerhalb von 12 – 24 h nach Extraktion.

Beides war im durchgeführten Test-Ringversuch absichtlich nicht vorgesehen, da die teilnehmenden Labore die Analyse nach ihren jeweils etablierten Standardverfahren durchführen sollten. Dazu gehört auch eine entsprechende Vorgehensweise mit z.B. Verdünnungen der Extraktionsansätze, um valide Messergebnisse für Proben mit unbekannter Größenordnung des Endotoxingehaltes, zu erhalten.

Im Vorfeld eines jeden Ringversuches ist es essentiell die genaue Fragestellung, welche Vorgehensweisen und Analysen verglichen werden sollen zu bestimmen und dem entsprechend umfassende oder geringe Angaben and die Teilnehmer zu geben.

5 Auflistung der für das Vorhaben relevanten Veröffentlichungen, Schutzrechtsanmeldungen und erteilten Schutzrechte von nicht am Vorhaben beteiligten Forschungsstellen

Während der Projektlaufzeit wurde von einer französischen Forschergruppe ein Vergleich von verschiedenen Sammelverfahren von Endotoxinen aus der Luft vorgestellt. Für die Evaluierung wurde im Gegensatz zum Projekt ENDOTOX, keine endotoxinhaltigen Stäube verwendet, sondern Flüssigkeiten als Ausgangsmaterial eingesetzt. Die vorgestellten Forschungsarbeiten ergänzen die Ergebnisse von ENDOTOX und eine gemeinsame Erarbeitung von zukünftigen Projekten könnte eine wertvolle Kombination von Expertisen erbringen.

Duquenne, Philippe, Catherine Coulais, Sébastien Bau, and Xavier Simon. 2018. "Performances of the BC-112 NIOSH Cyclone for the Measurement of Endotoxins in Bioaerosols : A Study in Laboratory Conditions." *Journal of Aerosol Science* 116(November 2017):92–105. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2017.11.005>)

Die Ergebnisse des Projekts ENDOTOX wurde für ein Poster bei der *international conference for biological risks* in Nancy von 5.6.2019 bis 7.6.2019 eingereicht und angenommen. Außerdem werden die Teilergebnisse bezüglich Lagerungsbedingungen in einem Vortrag vorgestellt.

Eine Publikation der Ergebnisse in einem internationalen peer review Journal ist geplant.

Es wurden in der Projektlaufzeit keine Schutzrechtsansprüche veröffentlicht oder erteilt.

6 Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich des Forschungszwecks/-ziels, Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse des Projektes ENDOTOX zeigen, dass es möglich ist eine größere Anzahl vergleichbarer Prüflinge mit endotoxinhaltigem Staub für Ringversuche herzustellen. Die Stabilität der Proben macht eine unkomplizierte Lagerung der Prüflinge bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum möglich. Für die Qualitätssicherung von Ringversuchsproben ist eine störungsfreie, reproduzierbare und gleichmäßige Sammlung von Stäuben in mehreren Wiederholungen unerlässlich. Der Aufbau und die durchgeführten Versuche wurden für die Reproduzierbarkeit als Standardprotokolle niedergelegt.

Für die gesetzliche Unfallversicherung spielen die Ergebnisse vor allem für die Qualität der Arbeitsplatzmessung mit Blick auf die Erfassung der Expositionssituation und in weiterer Folge für die Prävention von akuten und chronischen Erkrankungen eine große Rolle. Arbeitsplätze mit erhöhten Konzentrationen an Endotoxinen bieten für Arbeitnehmer ein erhöhtes Risiko des Einatmens von Endotoxinen, die so in die Atemwege gelangen und dort zu Immun- und Entzündungsreaktionen führen können.

Nur durch eine genaue Bestimmung der Endotoxin-Belastungen können Expositionsstufen bestimmt und geeignete Schutzmaßnahmen ergriffen und überprüft werden. Für die Messung von schädlichen Belastungen in der Luft ist eine Qualitätssicherung des Messerfahrens unerlässlich. Die Bestimmung der Endotoxinkonzentration beginnt mit der Sammlung der Luftprobe, darüber hinaus haben aber der Weg der Probe bis zur Analyse und die Untersuchung der Probe im analytischen Labor einen hohen Einfluss auf das Ergebnis. Die Ergebnisse des ENDOTOX Projektes liefern die Grundlage für die Optimierung von Lagerung und Transport endotoxinhaltiger Proben sowie für die Qualitätssicherung der Analytik.

Durchführung von Ringversuchen

Mit den erarbeiteten Protokollen und dem durchgeführten Testringversuch ist es der DGUV ohne weitere technische Vorarbeiten möglich, Ringversuche zum Vergleich der Qualität von Laboren die Analysen von endotoxinhaltigen Proben aus der Luft von Arbeitsplätzen anbieten, durchzuführen und so die Qualitätssicherung ihrer Arbeitsplatzbewertung zu gewährleisten.

Ein Standardverfahren zur Durchführung von Ringversuchen mit dem neuen Verfahren für die Herstellung von mit endotoxinhaltigem Staub beaufschlagten Probenträgern wurde etabliert und getestet. In diesen Verfahren sind die Prozedur zur Herstellung der Proben, die Dokumentation und der Versand sowie die Auswertung der Kontrollproben und der Ergebnisse der Teilnehmer enthalten.

Das Standardverfahren liefern somit alle Voraussetzungen um entsprechende Ringversuche jederzeit durchführen zu können, wobei Variationsmöglichkeiten mit Blick auf die Verwendung von Extraktions- und Analyseverfahren bestehen.

Anpassung von Verfahrensanweisungen

Aufbauend auf den Erkenntnissen im Projekt können Verfahrensanweisungen zur Durchführung von Arbeitsplatzmessungen angepasst werden. Dies trägt zum unkomplizierten Versand und Lagerung der

Proben bei, da gezeigt werden konnte, dass die Proben über eine längere Zeit auch bei Raumtemperatur stabil bleiben.

Grundlage für weitere Validierung

Das erarbeitete Setup zur kontrollierten und gleichmäßigen Beaufschlagung von mehreren Probenträgern mit endotoxinhaltigem Staub ermöglicht es unkompliziert weitere Schritte von der Probenahme zur Analyse der Proben zu evaluieren und zu optimieren. Für die Optimierung von Extraktionsprotokollen kann auf im Projekt ENDOTOX erarbeitete SOPs zurückgegriffen werden. In allen Fragestellungen welche die Sammlung, Probenaufarbeitung und Analyse von Proben betreffen, liefern die Ergebnisse des ENDOTOX Projektes optimale Voraussetzungen für eine rasche und unkomplizierte Durchführung entsprechender Vergleichsuntersuchungen.

Abseits der definierten Forschungsziele wurden weitere Fragestellungen im Projekt ENDOTOX erkannt, die eventuell in weiterführenden Forschungsvorhaben bearbeitet werden könnten.

In einem weiteren Testringversuch könnte evaluiert werden, welche Unterschiede zwischen den Analysen der Labore besteht, wenn das Extraktions- und Analyseverfahren genau vorgegeben wird. Im Vergleich zum im Projekt durchgeführten Test-Ringversuch würde detailliert der Einfluss des Labors und nicht des Gesamt- bzw. Standardverfahrens des Labors getestet werden.

Eine weitere Frage würde das Probenahmeverfahren betreffen, da hierfür mit Blick auf endotoxinhaltigen Staub, keine unteren und oberen Verfahrensgrenze bekannt sind und die Reproduzierbarkeit in verschiedenen Belastungssituationen bisher nicht untersucht wurde.

Auch wurde das verwendete Probenahmesystem bisher nicht mit Endotoxinen aus Bakteriensuspensionen getestet. Ein Vergleich von Probenahmeverfahren für Endotoxinen die aus Flüssigkeiten stammen, wurde während der Projektlaufzeit von französischen Kollegen publiziert (Duquenne et al. 2018).

Eine gemeinsame Präsentation der Ergebnisse aus den französischen- und den Untersuchungen im Rahmen des ENDOTOX-Projektes ist auf eine französischer Aerosol-Fachtagung im Januar 2020 geplant (Anfrage Xavier Simon, INRS im März 2019). Auch eine gemeinsame Publikation der jeweiligen Ringversuches-Projekte ist vorstellbar.

7 Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Es besteht der Plan, seitens des IFA, die Ergebnisse und erstellten SOP's zur Durchführung von Ringversuchen zur Qualitätssicherung von Arbeitsplatzrelevanten Endotoxinmessungen zu nutzen.

Ein solcher Ringversuch könnte im Jahr 2020 durchgeführt werden.

8 Literatur

- Duquenne, Philippe, Catherine Coulais, Sébastien Bau, and Xavier Simon. 2018. "Performances of the BC-112 NIOSH Cyclone for the Measurement of Endotoxins in Bioaerosols : A Study in Laboratory Conditions." *Journal of Aerosol Science* 116(November 2017):92–105. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2017.11.005>).
- Hartung, Thomas. 2015. "The Human Whole Blood Pyrogen Test - Lessons Learned in Twenty Years." *Altex* 32(2):79–100.
- Konlechner, Anja, Sabine Goller, Markus Gorfer, Leander Mölter, and Joseph Strauss. 2013. "Evaluierung Einer Prüfkammer Für Bioaerosolsammelsysteme." *Gefahrstoffe - Reinhaltung Der Luft* 73(11/12):471–76.
- Laitinen, Sirpa et al. 1994. "Workers' Exposure to Airborne Bacteria and Endotoxins at Industrial Wastewater Treatment Plants." *American Industrial Hygiene Association Journal* 55(11):1055–60. Retrieved (<https://doi.org/10.1080/15428119491018330>).
- Pogner, Clara et al. 2019. "A Novel Laminar-Flow-Based Bioaerosol Test System to Determine Biological Sampling Efficiencies of Bioaerosol Samplers." *Aerosol Science and Technology* 53(4):355–70. Retrieved (<https://doi.org/10.1080/02786826.2018.1562151>).

1 Anhang/Anhänge

Standardprotokoll zur Probenherstellung

Standardprotokoll zur Probenverarbeitung und Auswertung mit Gen5 Software

Standardprotokoll zur Durchführung eines Ringversuches