

Abschlussbericht zum Vorhaben **„SchimmelAntigenDetect“ (FP0431A)**

**Validierung von pilzspezifischen ELISA - Korrelation mit Zellzahl
(Mikroskopie, qPCR) und KBE unter kontrollierten,
reproduzierbaren Bedingungen**

Laufzeit

01.04.2019 – 31.12.2021

Bericht vom 06.04.2022

Autoren

**Dr. Markus Gorfer
DI Clara Pogner
Prof. Monika Raulf
Dr. Ingrid Sander
Prof. Joseph Strauss**

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

Forschungskooperation

Änderung der Arbeitspakete

Änderung des Zeitablaufes

Verwendete Materialien und Methoden

Testorganismen und Herstellung des Ausgangsmaterials

Bioaerosol Test System

Sammlung der Pilzsporen (Filter und Gaswaschflasche)

Aerosolgeneratoren

Nachweismethoden

Statistik und Interpretation der Ergebnisse

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Arbeitspaket 1 – Erstellung von kontrolliertem Probenmaterial

Arbeitspaket 2 – Adaptierung und Evaluierung des Testaufbaus, Evaluierung der gleichmäßigen Sammlung

Arbeitspaket 3 – Herstellung von Probenträgern

Arbeitspaket 4 – Verarbeitung und Analyse der Filterproben und Vergleich der Methoden

Extraktionsprotokolle

Analyse der Proben mit verschiedenen Verfahren

Vergleich der Ergebnisse zwischen den Analysemethoden

Veröffentlichungen der Ergebnisse

Schutzrechte

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

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

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Literatur

Zusätzliche Daten

Korrelationen der Extraktionsmethoden je Organismus

Korrelationen der Analysemethoden je Organismus

Kurzfassung deutsch

Bioaerosole an Arbeitsplätzen können bei hohen Konzentrationen und wiederholter Exposition zu schweren Erkrankungen bei Beschäftigten führen. Um die Exposition zu bestimmen und Schutz- bzw. Reduktionsmaßnahmen zu evaluieren ist eine Sammlung und Detektion erforderlich. Verschiedene Nachweismethoden haben unterschiedliche Stärken, Schwächen, Nachweisgrenzen und Spezifitäten.

Ziel der Studie „SchimmelAntigenDetect“ war die Evaluierung von sechs vom IPA in Bochum entwickelten für Schimmelpilzantigene spezifischen ELISA mit Luftstaubproben. Für die Evaluierung waren unterschiedliche Konzentrationen an Schimmelpilzen nötig (Nachweisgrenzen). Die Spezifität wurde einerseits bereits in Publikationen gezeigt, andererseits in dieser Studie auch anhand von Misch- und Betriebsproben getestet. Um die ELISA zu testen und Referenzen zu den Konzentrationen der Proben zu erhalten, wurden die Proben jeweils mit vier Analyseverfahren ausgewertet. Die ELISA wurden mit mikroskopischer Sporenzählung, Bestimmung der koloniebildenden Einheiten und Erhebung der SSU-Kopienzahl (qPCR) als Analyseverfahren verglichen.

Die Luftstaubproben wurden mittels Filtration - GSP 10L Sammeleinheit mit Gilian 10i Pumpen und Teflonfiltern – gesammelt. In einer Bioaerosolkammer wurden unter kontrollierten Bedingungen Sporenaerosole von *A. amoenus*, *A. amstelodami*, *A. fumigatus*, *C. herbarum*, *P. chrysogenum* und *W. sebi* als Reinkulturen oder als Mischung hergestellt. Für die Aerosolerzeugung von fünf Konzentrationen je Organismus wurden zwei Aerosolgeneratoren (LSA, RBG) verwendet. Für die Analyse mittels ELISA wurden zwei Extraktionsverfahren, mit und ohne Zellaufschluss, getestet. Im komplementären Projekt „AntigenSampling“ wurden Betriebsproben in Österreich genommen. Auch diese wurden mit den vom IPA entwickelten ELISA und den anderen drei Analyseverfahren ausgewertet. Im Projekt konnten für fünf der sechs Testorganismen fünf Konzentrationen im Bioaerosoltestsystem hergestellt werden. Für die hohen Konzentrationen wurde dafür ein davor noch nicht für Sporen getesteter Aerosolgenerator eingesetzt (RBG1000). Da *A. fumigatus* ein Risikogruppe 2 Organismus ist und für die Herstellung von Staub spezielle Geräte nötig sind, die nicht im Level 2 Labor vorhanden waren, wurden für diesen Organismus nur drei Konzentrationen getestet. Die Mischproben wurden aus fünf Organismen in vier Konzentrationen hergestellt. Je Organismus und Konzentration wurden mindestens fünf Filter beaufschlagt.

Der Vergleich der gleichzeitig beaufschlagten Filter zeigt stabile Bedingungen im Testsystem, jedoch bereits hohe Schwankungen bei den Ergebnissen der qPCR. Die Auswertung mit koloniebildenden Einheiten (KBE), Sporenzählung und ELISA lieferten stabile Replikate. Dieses Ergebnis ist auch beim direkten Vergleich der Analyseverfahren zueinander und der Berechnung der Korrelationskoeffizienten ersichtlich. Die vom IPA entwickelten ELISA zeigten die höchste Übereinstimmung mit der Sporenzahl, gefolgt von den KBE. Bei der Sensitivität zeigen KBE die geringste Nachweisgrenze bei hoher Keimrate nach Flüssigkultivierung. Die Nachweisgrenze der ELISA-Assays hing von der Sporengröße ab; während große Sporen ab einer Sporenzahl von 10^2 / mL im messbaren Bereich lagen, waren für kleine Sporen bis zu 10^6 Sporen / mL nötig. Die Extraktion mittels Zellaufschluss zeigte für die meisten Organismen keinen positiven Einfluss auf die Nachweisgrenze. Die Auswertung der Mischproben zeigt, dass die ELISA gut in der Lage waren die verschiedenen Pilze voneinander zu unterscheiden. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den KBE. Auch in an Arbeitsplätzen gesammelten Proben konnte sowohl mit den ELISA, als auch mit qPCR-Assays das Vorhandensein der Antigene bzw. Gene der verschiedenen Pilzspezies nachgewiesen werden.

Zusammenfassend befinden die Autoren, dass die vom IPA entwickelten, pilzspezifischen ELISA eine sehr gute Ergänzung zu klassischen Methoden darstellen und ein Einsatz auf Arbeitsplätzen befürwortet wird. Die im Vergleich zu KBE relativ hohe Nachweisgrenze, bei bestimmten kleinen Sporen, und damit geringere Sensitivität sollte in Betracht gezogen und eine Kombination von Analyseverfahren eingesetzt werden. Der gemeinsame Einsatz mit routinemäßigen durchgeführten, sensitiven Methoden wie z.B. KBE würde eine große analytische Breite abdecken und die Spezifität und damit die Aussagekraft der Daten erhöhen.

Kurzfassung englisch

Bioaerosols in workplaces can cause serious illness in workers at high concentrations and repeated exposure. Sampling and exposure assessment is required to evaluate protective and reduction measures. Different detection methods have different strengths, weaknesses, detection limits and specificities.

The aim of the study „SchimmelAntigenDetect“ was to evaluate six ELISAs specific for mould antigens, developed by the IPA in Bochum using airborne dust samples. Different concentrations of mould spores were necessary for the evaluation (detection limit). On the one hand, the specificity has already been shown in publications, on the other hand, it was also tested in this study using defined mixtures of fungal spores and samples from workplaces.

In order to test the ELISA and obtain references to the concentrations of the airborne dust samples, all samples were analyzed using four analytical methods. The ELISA results were compared with microscopic spore counting, colony forming units and assessment of SSU-copy numbers using qPCR.

Airborne dust was sampled by filtration comprising GSP 10L sampling heads, Gilian 10i pumps and Teflon filters. In a bioaerosol chamber, spore aerosols of *A. amoenus*, *A. amstelodami*, *A. fumigatus*, *C. herbarum*, *P. chrysogenum* and *W. sebi* were produced as pure cultures or as a mixture under controlled conditions. For aerosol generation, two aerosol generators (LSA, RBG) were used to produce five concentrations for each organism. For analysis by ELISA, two extraction procedures, with and without cell disruption, were tested. In the complementary project „AntigenSampling“, samples from workplaces were taken in Austria. These were also evaluated with the ELISAs developed by the IPA and the other three analytical methods.

In the project, five concentrations could be produced in the bioaerosol test system for five of the six fungal organisms. For the high concentrations, an aerosol generator not previously tested for fungal spores was used (RBG1000). Since *A. fumigatus* is a risk level 2 organism and special equipment is needed to generate spore dust, which was not available in the level 2 laboratory, only three concentrations were tested for this organism. In addition, *A. fumigatus* was omitted from the spore mixtures. Therefore, the mixture samples were prepared from five organisms and used in four concentrations. For each organism and concentration at least five filters were produced.

The comparison of the simultaneously sampled filters shows stable conditions in the test system, but already high fluctuations in the results of the qPCR. The analysis with colony forming units (CFU), spore counting and ELISA provided stable replicates. This result is also evident in the direct comparison of the analytical methods to each other and the calculation of the correlation coefficients. The ELISA developed by the IPA showed the highest agreement with spore count, followed by CFU. In terms of sensitivity, CFU showed the lowest detection limit at high germination rates after liquid cultivation. The detection limit of ELISAs depended on the spore size; while large spores were within the measurable range from a spore count of 10^2 / mL, small spores required up to 10^6 spores / mL. Extraction by cell disruption showed no positive influence on the detection limit for most of the organisms. The evaluation of the mixed samples shows that the ELISA were able to distinguish the different fungi from each other. The results showed a high agreement with the CFU. The antigens or genes of the different fungal species could also be detected in the workplace samples using both ELISAs and specific qPCR.

In summary, the authors conclude that the fungus-specific ELISAs developed by the IPA are a very good complement to classical methods and advocate their use in workplaces. The relatively high detection limit for certain small spores compared to CFU and thus lower sensitivity should be taken into consideration and a combination of analytical methods should be used. The joint use with routinely performed, sensitive methods such as CFU would cover a large analytical breadth and increase the specificity and thus the significance of the data.

1. Problemstellung

Bioaerosole sind luftgetragene Partikel biologischer Herkunft, zu denen Bakterien, Viren und Pilze sowie deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte gehören. Häufiger Kontakt mit höheren Konzentrationen an Bioaerosolen kann unspezifische und spezifische Reaktionen im Immunsystem hervorrufen. Diese reichen von Reizung und Schwellung der Nasenschleimhäute (Soler and Schlosser 2012), über Allergien und Atemwegsbeschwerden (Douwes et al. 2003), bis zu chronischen Lungenstörungen. Insbesondere wiederholte Inhalation von Pilzsporen und anderen Schimmelpilzbestandteilen kann zur Sensibilisierung und Ausbildung von Allergien führen, die in schwerwiegenden Fällen als exogen allergische Alveolitis oder allergisches Asthma diagnostiziert werden (Méheust et al. 2013; Raulf et al. 2014; Reboux et al. 2001). An vielen Arbeitsplätzen kann es zu einer hohen Belastung der Luft mit Bioaerosolen und durch wiederholte Exposition zu einer Erkrankung der Arbeitnehmer kommen (Raulf-Heimsoth et al. 2012).

Der zuverlässige Nachweis von Schimmelpilzen und die Einschätzung der Gesundheitsrisiken ist aber weiterhin schwierig. Seit dem späten 19. Jahrhundert (Marple 2004) stehen Methoden zur Sammlung und Analyse von Pilzsporen aus der Raumluft zur Verfügung, diese haben aber einige Nachteile. Mit der klassischen Analysemethoden, die auf koloniebildenden Einheiten (KBE) basiert, können nur jene Pilze nachgewiesen werden, die auf künstlichem Nährmedium wachsen, also lebend und kultivierbar sind. Außerdem spielt für den Nachweis von lebenden Sporen die biologische Sammeleffizienz und der Erhalt der Lebensfähigkeit während der Sammlung, eine große Rolle.

Alternative Analysemethoden wie Mikroskopie oder molekularbiologische Methoden (qPCR) basieren auf dem Nachweis aller Pilzzellen, die gesammelt werden können. Es können auch nicht lebensfähige und nicht kultivierbare Sporen sowie Myzelfragmente nachgewiesen werden. Diese Komponenten können ebenfalls bedeutsam sein, da Immunreaktionen von verschiedenen Bestandteilen der Schimmelpilze ausgelöst werden können und nicht auf kultivierbare Sporen beschränkt sind. Der Zusammenhang zwischen Gesamtzellzahl oder Genomäquivalenten und gesundheitlichen Beeinträchtigungen ist jedoch genauso wie bei KBE Zahlen nicht geklärt. Dies ist auch darin begründet, dass verschiedene Pilzarten über unterschiedliches allergenes Potential verfügen (Antigene und Allergene je Pilzspore).

In den letzten Jahren wurden daher Methoden entwickelt, die statt Sporenzahlen oder Keimzahlen, Proteine bzw. Antigene in Bioaerosolen bestimmen können. Da die Proteine für die Entwicklung von Allergien und Auslösung von allergischen Reaktionen verantwortlich sind, sollen mit ihrer Quantifizierung der Zusammenhänge zwischen luftgetragenen Allergenen und gesundheitlichen Auswirkungen festgestellt werden. Die Nachweisverfahren beruhen auf immunologischen Methoden, sogenannten ELISA, die zur Allergenquantifizierung eingesetzt werden können. Das Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der DGUV (IPA), Institut der Ruhr-Universität Bochum, hat für sechs Schimmelpilzarten Nachweissysteme auf Antigenbasis entwickelt, die teilweise bereits publiziert werden konnten (Neumann et al. 2015; Sander et al. 2012; Zahradnik et al. 2013). Die am IPA vorhandenen ELISA wurden jedoch noch nicht ausreichend validiert, um einen routinemäßigen Einsatz im Arbeitsschutz zu ermöglichen.

Durch die jahrzehntelange Anwendung, die einfache Handhabung und die auf der Methode basierenden Normen ist die Analyse der koloniebildenden Einheiten weiterhin ein Referenzsystem. Um bereits vorhandene Daten mit Ergebnissen von neuen Methoden vergleichen zu können, ist es wichtig, neue Analysemethoden mit vorhandenen Methoden zu vergleichen, Stärken und Schwächen aufzuzeigen und die Methoden zu validieren. In einer umfassenden Studie (Van Kampen et al. 2014) wurden einige der vom IPA entwickelten ELISA bereits mit anderen Nachweissystemen (KBE, Gesamtzellzahl) verglichen, und alle Nachweissysteme zeigten signifikante Korrelationen. Eine systematische Evaluierung unter kontrollierten Bedingungen wurde allerdings noch nicht durchgeführt und damit die Messunsicherheit und Effizienz des Nachweissystems (GSP + spezifischer ELISA) noch nicht getestet. Die Bioaerosolkammer des AIT (Konlechner et al. 2013; Pogner et al. 2019; Pogner, Gorfer, and Kolk 2020) in Tulln

bietet aufgrund von Kontrollierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Testbedingungen die optimale Umgebung, um einen systematischen Vergleich und eine Validierung von Analysemethoden durchzuführen.

2. Forschungszweck/-ziel

Um den komplexen Zusammenhang zwischen Konzentrationen von Allergenen und gesundheitlichen Faktoren zu erörtern, sind effiziente und sensitive Antigen- und Allergenmessungen an Arbeitsplätzen nötig. Ziel des vorliegenden Forschungsvorhabens ist es, die vom IPA entwickelten Verfahren zur Bestimmung der Belastung durch Schimmelpilze zu evaluieren. Dafür wurden verschiedene Konzentrationen an Schimmelpilzsporen in einem kontrollierten System hergestellt und die Konzentrationen mittels KBE Bestimmung und kultivierungsunabhängigen Methoden (Mikroskopie, qPCR) überprüft. Es wurden die Allergenkonzentrationen verschiedener Schimmelpilzarten mit erhaltenen Konzentrationen (bestimmt durch die anderen Nachweisverfahren) ins Verhältnis gestellt. Durch die Testung der Nachweisverfahren in unterschiedlichen Konzentrationen und mehreren Wiederholungen konnte eine Korrelation berechnet und die Reproduzierbarkeit der Messung (kombiniert aus Sammlung, Probenverarbeitung und Analyse) bestimmt werden. Um dies zu erreichen wurden unter kontrollierten und reproduzierbaren Bedingungen Luftproben mit dem zurzeit routinemäßig verwendeten System zur Probenahme an Arbeitsplätzen (Sammlung von E-Staub auf Teflonfiltern mit dem GSP-System) gesammelt. Die Proben wurden verarbeitet und die gewonnenen Suspensionen mit verschiedenen Analysesystemen (KBE, Mikroskopie, qPCR, ELISA) untersucht.

Parallel zur Einreichung und Abwicklung des vorliegenden Forschungsvorhabens, wurde das komplementäre Projekt „FP0413B AntigenSampling“ eingereicht und abgearbeitet. In diesem Projekt wurden verschiedene Sammelmethode, sowie Effekte von Probenlagerung und -transport untersucht. Ziel der beiden Forschungsvorhaben (AntigenSampling und SchimmelAntigenDetect) ist eine gezielte Prävention von Erkrankungen am Arbeitsplatz durch luftgetragene Schimmelsporen. Dazu müssen die Zusammenhänge zwischen der Exposition und dem gesundheitlichen Risiko besser entschlüsselt werden. Da Schimmelsporen ein Allergierisiko darstellen können, werden nun in einem ersten Schritt bereits entwickelte Nachweisverfahren zur Allergenbelastung am Arbeitsplatz evaluiert und mit anderen Methoden des Nachweises von Schimmelsporen verglichen.

Die Zielgruppe, die von den Ergebnissen profitiert, besteht aus ArbeitnehmerInnen, die aufgrund ihrer Tätigkeit an belasteten Arbeitsplätzen von einem höheren Erkrankungsrisiko durch Bioaerosole betroffen sind. Durch die Evaluierungsergebnisse und den Einsatz der Systeme in der Praxis soll ein weiterer Schritt Richtung Dosis-Wirkungsbeziehung und effektiver Prävention gesetzt werden. Der Einsatz der Verfahren in Studien kann wichtige Ergebnisse liefern, die für die Prävention genutzt werden können, um Erkrankungen und eventuelle Berufsunfähigkeiten aufgrund von gesundheitlichen Beschwerden verursacht durch Schimmelpilzexposition vorzubeugen. Außerdem können die Ergebnisse in der Begutachtungspraxis die Datenqualität durch valide Allergen- und Antigen-Expositionsmessungen unterstützen.

Betroffene Arbeitsgebiete finden sich z.B. in

- Kompostieranlagen (Gutarowska et al. 2015; Van Kampen et al. 2014)
- Recycling- (Matratzen) und Sortieranlagen (Poulsen et al. 1995)
- Archiven (Schröer, Klus, and Stephan 2017)
- der Landwirtschaft und daran angekoppelten Betrieben (z.B. Heu- und Stroh Umschlag) (Pepys et al. 1990; Reboux et al. 2001)
- Pilzfarmen (Bogart et al. 1993)

3. Methodik

Forschungskooperation

Das Projekt ist in enger Zusammenarbeit mit dem IPA der DGUV entstanden und wurde mit Einbezug des IPA durchgeführt. Während des Projektes wurde enger Kontakt und Austausch über die geplanten Experimente, Ergebnisse und Projektfortschritte gehalten. Die beiden österreichischen Projektpartner AIT und BOKU arbeiten am gemeinsamen Standort UFT – Universitäts- und Forschungszentrum Tulln. Im Rahmen der regelmäßigen Besprechungen zum Thema Bioaerosole wurden auch die aktuellen Experimente und Ergebnisse aus laufenden Projekten diskutiert. Durch die sich ergänzenden Expertisen der unterschiedlichen MitarbeiterInnen ist eine hohe Qualität der Arbeiten gewährleistet. Die Analysen mittels ELISA wurden im IPA durchgeführt, zur Finanzierung der Beteiligung des IPA wurden die Projekte „Allquant IPA-111“ und „Bioaerosole IPA-145“ genutzt. Weitere KooperationspartnerInnen könnten nach diesem Labor-Forschungsprojekt in einem Praxisprojekt mit Probanden und realen Arbeitsplätzen einbezogen werden.

Änderung der Arbeitspakete

Vorarbeiten zur Aerosolerzeugung mit den Testorganismen in der Bioaerosolkammer zeigten, dass zwei sehr unterschiedliche Aerosolgeneratoren verwendet werden müssen, um den gesamten relevanten Konzentrationsbereich abdecken zu können. Zur optimalen Abstimmung der beiden Methoden zur Aerosolerzeugung musste ein neues Arbeitspaket 1 geschaffen werden. Darin wurden Standardprotokolle für die Herstellung von Sporensuspensionen und von Sporenstaub entwickelt und die Antigengehalte der Ausgangsmaterialien für die Aerosolerzeugung evaluiert, um vergleichbare Ergebnisse absichern zu können.

In Arbeitspaket 2 wurde das Testsystem evaluiert. Durch die Verknüpfung der Arbeiten mit dem komplementären

Projekt „AntigenSampling“ kam statt der für dieses Arbeitspaket geplanten Pilzgattung *Cladosporium* der Pilz *Aspergillus protuberus* (Clade *Aspergillus versicolor*) zum Einsatz. Die Probenahmeköpfe wurden auf dem GSP Multisammler-Gestell (MOTEC) befestigt. Der gleichzeitige Betrieb von zwei GSP 10L Sammelköpfen (Laschke Messtechnik) und den dazugehörigen Pumpen war erfolgreich und zeigte sehr geringe Schwankungen. Es konnte kein Einfluss von Turbulenzen festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus dem AIT Bioaerosol Test System mit Stäuben (Pogner et al. 2020).

Im Arbeitspaket 3 fand wie geplant die eigentliche Herstellung der Testfilter statt. Die fünf Konzentrationen wurden mit zwei Aerosolgeneratoren hergestellt. Nur für den Risikogruppe 2 Organismus – *Aspergillus fumigatus* -konnte aus Sicherheitsgründen kein Staub hergestellt und damit nur drei Konzentrationen erzeugt werden. Neben den Filterproben wurden wie geplant Proben des Ausgangsmaterials und des Aerosolstroms hergestellt, um die verschiedenen Punkte im System zu kontrollieren. Parallel zur Filtersammlung wurde die Aerosolkonzentration in der Kammer aufgezeichnet (Kontrolle der gleichmäßigen Aerosolproduktion). Insgesamt wurden 193 Filterproben hergestellt.

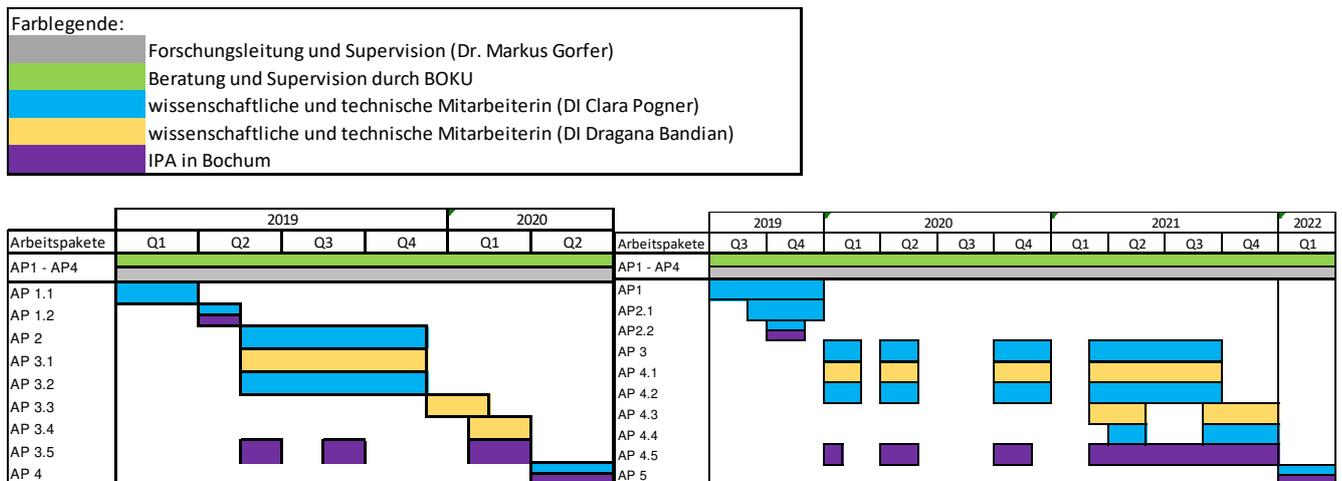
In Arbeitspaket 4 wurden wie geplant alle in den Arbeitspaket 1-3 hergestellten Proben analysiert. Dabei fand die ELISA Analyse beim IPA in Bochum statt, alle anderen Analysen (Sporenzahl, KBE, qPCR) wurden vom AIT in Tulln durchgeführt. Neben den Luftstaubproben aus Arbeitspaket 3 wurden auch die Betriebsproben aus dem komplementären Projekt „AntigenSampling“ untersucht.

Tabelle 1 – Übersicht über die Arbeitspakete und Indikation der verwendeten Organismen und Abweichungen zum eingereichten Arbeitsplan

Arbeitspaket	Organismus	Abweichungen zum Arbeitsplan
AP 1 Erstellung von kontrolliertem Probenmaterial	A. fumigatus A. amstelodami A. amoenus C. herbarum P. chrysogenum W. sebi	Neues Arbeitspaket: Zwei Methoden zur Materialherstellung waren nötig um die verschiedenen Konzentrationen zu erzeugen (Suspension – LSA, Staub – RGB); verschiedene Anzuchtmedien, je nach Organismus mussten eingesetzt werden Die Stabilität des neuen Ausgangsmaterials (Stäube) wurde überprüft
AP 2 Adaptierung und Evaluierung des Testaufbaus, Evaluierung der gleichmäßigen Sammlung	A. fumigatus A. amstelodami A. amoenus C. herbarum P. chrysogenum W. sebi	Durchgeführt wie geplant. Durch das zusätzliche Ausgangsmaterial wurde die Aerosolerzeugung für jeden Organismus mit beiden Methoden überprüft. Einflüsse der Aerosolerzeugung auf das unterschiedliche Material wurde überprüft und verglichen.
AP 3 Beaufschlagung der Filter mit Prüfaerosolen unter kontrollierten Bedingungen. Test von 6 Einzelsuspensionen und einem Sporenmix (Erhebung Sporenzahl, KBE)	A. fumigatus A. amstelodami A. amoenus C. herbarum P. chrysogenum W. sebi Mix	Für alle Organismen wurden Probenträger erzeugt. Dabei wurden bis zu 5 Wiederholungen je Konzentration durchgeführt. Um die Konzentrationen zu erreichen wurden 1-2 mit dem Flüssigdispersierer (LSA) und 3 mit dem Bürstendispersierer für Staub (RBG) erzeugt.
AP 4a Analyse der Proben durch IPA		Keine Abweichungen. Durchführung der ELISA für alle Proben
AP 4b Analyse der Proben durch AIT		Keine Abweichungen. Durchführung der Sporenzählung, Kultivierungsanalyse und molekularbiologischen Quantifizierung qPCR für alle Proben
AP 5 Erstellung des Endberichtes		

Änderung des Zeitablaufes

Änderung im Zeitablauf ergaben sich durch den Beginn des Projektes im Juni 2019 durch den gemeinsamen Start mit dem komplementären Projekt „AntigenSampling“. Weitere Verzögerungen ergaben sich durch die Einführung eines zweiten Aersosolgenerators und des neuen Arbeitspakets 1. In der Bearbeitung von Arbeitspaket 2 und 3 kam es zu mehreren Verzögerungen durch die COVID-19 Pandemie, da bei jeder Unterbrechung (Lockdown, Krankenstand, Quarantäne) einige Vorbereitungsarbeiten (angezogene Pilzplatten) neu gestartet werden mussten. Zusätzlich benötigt die Produktion von Sporenstaub mehr Zeit als die Produktion von Suspensionen. Die zusätzliche Arbeit zur Produktion von Sporenstaub wurde durch Studentische MitarbeiterInnen und PraktikantInnen unterstützt, sodass die geplanten Kosten eingehalten werden konnten.



Arbeitspakete Projektplan		Arbeitspakete Projektdurchführung	
		AP 1	Erstellung von kontrolliertem Probenmaterial
AP 1.1	Adaptierung des Testsystems, Etablierung eines Testaufbaues und Validierung der gleichmäßigen Sammlung	AP 2.1	Adaptierung des Testsystems, Etablierung eines Testaufbaues und Validierung der gleichmäßigen Sammlung
AP 1.2	Projektbesprechung in Bochum	AP 2.2	Projektbesprechung in Bochum
AP 2	Erstellung von kontrollierten Probenmaterial inklusive inkluse Kontrollpunkte in der Bioaerosolkammer, für sieben Pilze / Pilzgemische	AP 3	Erstellung von kontrollierten Probenmaterial inklusive inkluse Kontrollpunkte in der Bioaerosolkammer, für sieben Pilze / Pilzgemische
AP 3.1	Verarbeiten der Proben und Erstellung von Probensuspensionen und Aliquotierung	AP 4.1	Verarbeiten der Proben und Erstellung von Probensuspensionen und Aliquotierung
AP 3.2	Erfassung der Sporenzahl mittels Mikroskopie, Ausplattierenausplattieren eines Aliquotes für die KBE Bestimmung	AP 4.2	Erfassung der Sporenzahl mittels Mikroskopie, Ausplattierenausplattieren eines Aliquotes für die KBE Bestimmung
AP 3.3	Vorbereitung der Proben für Molekularbiologie und DNA Aufschluss	AP 4.3	Vorbereitung der Proben für Molekularbiologie und DNA Aufschluss
AP 3.4	Analyse der Proben mittels qPCR	AP 4.4	Analyse der Proben mittels qPCR
AP 3.5	Vorbereiten der Proben für ELISA und Durchführung der Analyse (IPA)	AP 4.5	Vorbereiten der Proben für ELISA und Durchführung der Analyse (IPA)
AP 4	Erstellung des Endberichts	AP 5	Erstellung des Endberichts

Abbildung 1 – Übersicht über den beantragten Zeitplan (links) und die tatsächliche Abarbeitung (rechts). Änderung ergeben sich durch die Einführung eines zusätzlichen Arbeitspaketes (AP1), zusätzlichen Aufwand bei AP 3 durch die Produktion von Sporenstaub und Behinderungen in der Abarbeitung durch die COVID-19 Pandemie.

Verwendete Materialien und Methoden

Zur Qualitätssicherung werden alle Forschungsarbeiten nach dem aktuellen Stand der Technik und unter Einbezug von neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen durchgeführt. Die Arbeitsabläufe und die Labore des AIT sind nach ISO zertifiziert und es werden alle Versuche, Auswertungen und Projektpläne zur Rekonstruktion aufgezeichnet. Die verwendeten Prozesse und Geräte sind publiziert und / oder auf internationalen Tagungen und Kongressen vorgestellt worden.

Ziel des Projektes war der Vergleich der vom IPA entwickelten spezifischen ELISA für den Nachweis von Schimmelpilzantigenen mit anderen Nachweissystemen. Um kontrolliertes und reproduzierbares Testmaterial herzustellen wurde das Bioaerosol-Testsystem des AIT in Tulln genutzt. Das geplante Setup wurde um eine zweite Methode zur Aerosolproduktion erweitert um auch mit hohen Sporenkonzentrationen arbeiten zu können. Die Sammlung der sporenbeladenen Luft erfolgte mit dem GSP System (10 L), das auch routinemäßig bei Arbeitsplatzmessungen eingesetzt wird. Als Probenträger kamen Teflonfilter zum Einsatz.

Für den Vergleich der Nachweismethoden wurden pro Schimmelpilz fünf Konzentrationen hergestellt. Für den Mix von fünf Schimmelpilzen wurden vier Konzentrationen getestet. Das Bioaerosol-Testsystem sieht eine Kontrolle des Materials an verschiedenen Kontroll- und Monitoringpunkten (CMP) vor. Diese beinhalten das Ausgangsmaterial vor der Aerosolproduktion, den Aerosolstrom direkt nach dem Generator und die Partikelzahl in der Testebene des Systems. Alle Proben der Monitoringpunkte und Sammelfilter wurden mit vier Verfahren analysiert: 1) spezifische ELISA des IPA, 2) Gesamtsporenzahl durch mikroskopische Zählung, 3) Bestimmung der koloniebildenden Einheiten und 4) Kopienzahlen von Gesamt-Pilz-DNA und spezifischer Pilz-DNA mittels qPCR.

In den folgenden Unterkapiteln werden die verschiedenen verwendeten Methoden im Detail beschrieben.

Testorganismen und Herstellung des Ausgangsmaterials

Da die vom IPA entwickelten ELISA spezifisch für bestimmte Pilze sind, wurden diese als Testorganismen ausgewählt. Insgesamt wurden sechs Pilze eingesetzt, wobei einer, *Aspergillus fumigatus*, in der Risikostufe 2 eingeordnet ist. Aus dieser Einstufung ergaben sich für diesen Testorganismus besondere Bestimmungen bei der Produktion des Pilzmaterials und der Sporensuspensionen. In Vorversuchen wurden für jeden Testorganismus die optimalen Kultivierungsbedingungen evaluiert und Standardprotokolle erarbeitet. Diese Arbeit wurde auch durch die Arbeiten im komplementären Projekt „FP0413B AntigenSampling“ unterstützt.

Die verwendeten Pilze stammen aus der AIT Stammsammlung bzw. wurden von der BOKU-Sammlung aus der Forschungsplattform „Bioaktive Mikrobielle Metaboliten“ (BiMM), für das Forschungsprojekt zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Testorganismen wurden zu Beginn des Projektes durch Sequenzieren von spezifischen DNA Regionen (ITS, β -Tubulin, EF1 α) auf ihre Identität überprüft.

A. fumigatus wurde in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 auf Malzextraktagar (MEA) kultiviert. Um ein Austreten der kleinen, leicht flüchtigen Sporen außerhalb der Sterilwerkbank zu vermeiden, erfolgte die Anzucht auf Schrägagar in 50-mL-Reaktionsgefäßen statt in Petrischalen. Die Röhrchen wurden während der Kultivierung mit Parafilm verschlossen. Zur Erzeugung der Suspension wurde Puffer direkt in die Röhrchen gefüllt, diese geschüttelt und die entstandene Lösung durch Glaswolle filtriert, um Sporen von Myzel zu trennen. Anschließend wurde die Suspension mit Anti-Schimmel-Konzentrat (Baufan Bauchemie Leipzig GmbH; Wirkstoff 2,49% 2-Octyl-2H-isothiazol-3-on) mit einer finalen Konzentration von 2,5 % über Nacht Stunden behandelt, um die Sporen zu

inaktivieren. In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Sporen mit Anti-Schimmel-Konzentrat die Antigendetektion durch den spezifischen ELISA nicht beeinträchtigt. Die so erstellten Sporensuspension wurde im Bioaerosol-Testsystem (Schutzstufe 1) eingesetzt. Eine Herstellung von Staub für den zweiten Aerosolgenerator wurde für diesen Organismus nicht durchgeführt, da die nötigen Geräte nicht im Labor der Schutzstufe 2 vorhanden waren.

Die anderen Testorganismen wurden in einem Labor der Schutzstufe 1 auf Malzextraktagar bzw. DG18 in Petrischalen angezogen. Das Pilzmaterial wurde mit einem Metallspatel in Puffer geerntet, gevortext und durch Glaswolle filtriert (Pogner et al. 2019). Die erhaltene Suspension wurde als Ausgangsmaterial eingesetzt.

Zur Herstellung von Staub wurden die Sporen statt in Puffer in Reinstwasser (arium® pro, Satorius) geerntet und die finale Suspension in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 2-4 LSC, CHRIST) getrocknet, um Sporenstaub zu erhalten.

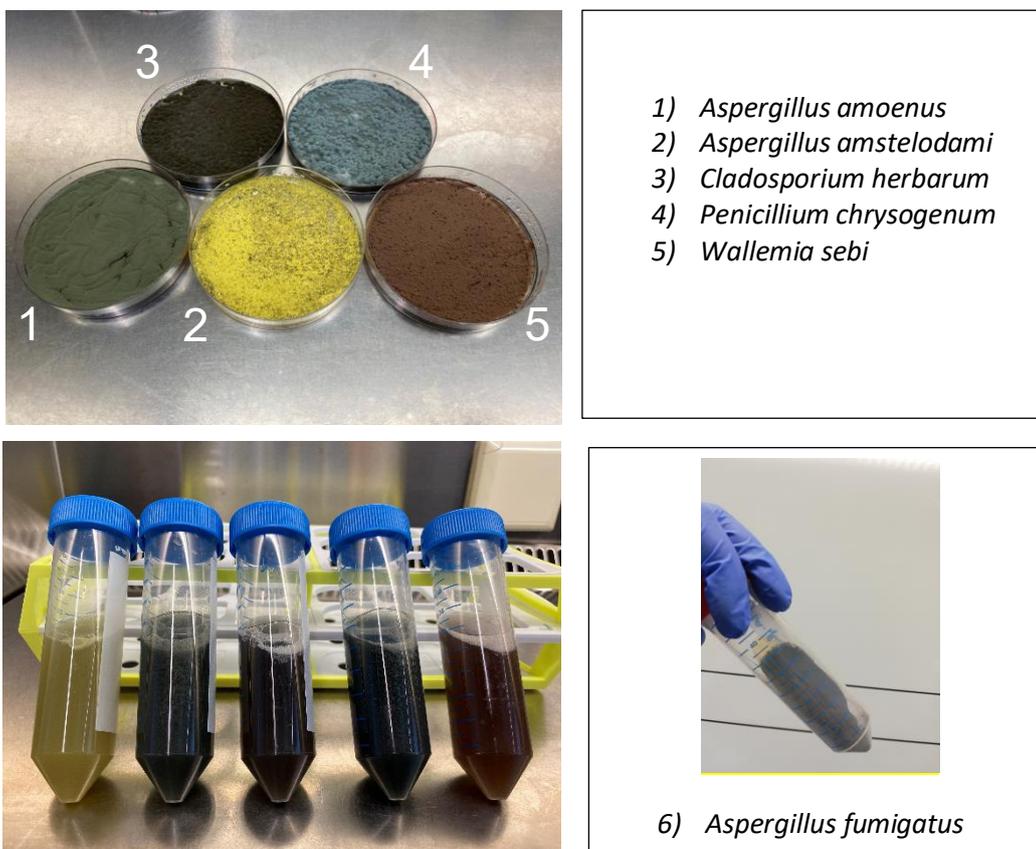


Abbildung 2 – im Projekt verwendete Testorganismen; oben – auf Platte angezogene Pilze, unten links – Sporensuspensionen der Organismen in Reihenfolge 1-5; unten rechts – in Röhrchen kultivierter Pilz der Risikogruppe 2

Das verwendete Ausgangsmaterial (Suspension bzw. Staub) wurde an jedem Versuchstag mit den vier Analyseverfahren kontrolliert, um reproduzierbare Bedingungen zu gewährleisten.

Bioaerosol-Testsystem

Um stabile und kontrollierte Testbedingungen zu schaffen wurde das Bioaerosol-Testsystem des AIT in Tulln verwendet. In dem System können verschiedene Konzentrationen an Aerosolen in die Luft eingebracht werden. Durch die laminare Strömung im Kammerteil wird eine Gleichverteilung der Partikel in der Sammelebene erzielt.

Das verwendete biologische Material wird an drei Kontroll- und Monitoringpunkten überprüft (Pogner et al. 2019). Zu diesen Punkten gehören das Ausgangsmaterial (CMP1), der Aerosolstrom direkt am Aerosolgenerator (CMP2, mittels Impingement gesammelt) und die Partikelkonzentration im Prüfraum der Kammer (CMP3) (Abbildung 3). Im Kontroll- und Monitoringpunkt CMP3 ist ebenfalls die Sammlung der Bioaerosole für die Versuche vorgesehen.

Die Suspensionen (Ausgangsmaterial und Aerosolstrom am Generator) wurden genauso wie die Filterproben durch Sporenzählung (Mikroskop), Ausplattieren (KBE Bestimmung), qPCR und spezifische ELISA untersucht (siehe Kapitel Nachweismethoden).

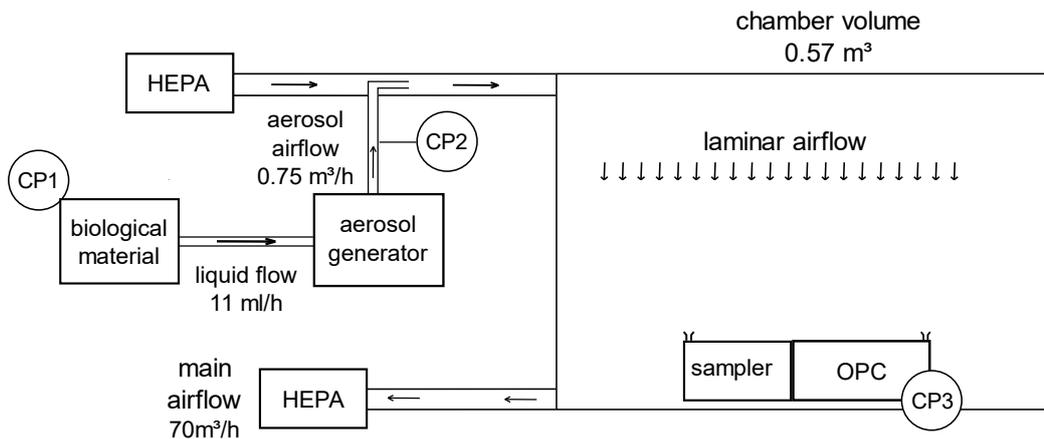


Abbildung 3 - Bioaerosoltestsystem mit eingezeichneten Kontrollpunkten (CP); CP1 – Ausgangsmaterial, CP2 – Aerosolstrom direkt nach dem Generator, CP3 – Partikelkonzentration im Prüfraum der Kammer

Sammlung der Pilzsporen (Filter und Gaswaschflasche)

Um Proben der Pilzsporen herzustellen, wurde das auf Arbeitsplätzen bereits etablierte Filtrations Sammelsystem GSP eingesetzt. Um eine ausreichende Konzentration für den ELISA Nachweis auf den Filtern zu erzielen, wurden GSP 10 L Sammelköpfe an Gilian 10i Pumpen angeschlossen und mit einer Flussrate von 10L/min gesammelt. Als Filter kamen Teflonfilter (FALP0037, Merck Milipore) zum Einsatz.

Die gesammelten Filter wurden nach der Beaufschlagung mit 5 mL Pufferlösung (1 x PBS + 0,01 % Tween-20) gewaschen. Für die Extraktion wurden verschiedene Protokolle ausgetestet, siehe Arbeitspaket 4 Extraktionsprotokolle. Die erhaltene Filter-Suspension wurde mit den vier Analysemethoden untersucht.

Die gleichmäßige Sammlung mit GSP Sammelköpfen und dem Bioaerosol-Testsystem wurde bereits mit „Arizona Test Dust“ und Staub aus Schweineställen gezeigt (Pogner et al. 2020). Am Beginn des vorliegenden Projektes wurde die gleichmäßige Sammlung nochmals mit Sporenmateriale von *Aspergillus protuberus* überprüft.

Bei der Evaluierung der Ergebnisse wurde die gleichmäßige Beaufschlagung der Filterduplikate nochmals für alle Proben überprüft und in Abbildung 8 für alle Analysenergebnisse dargestellt.

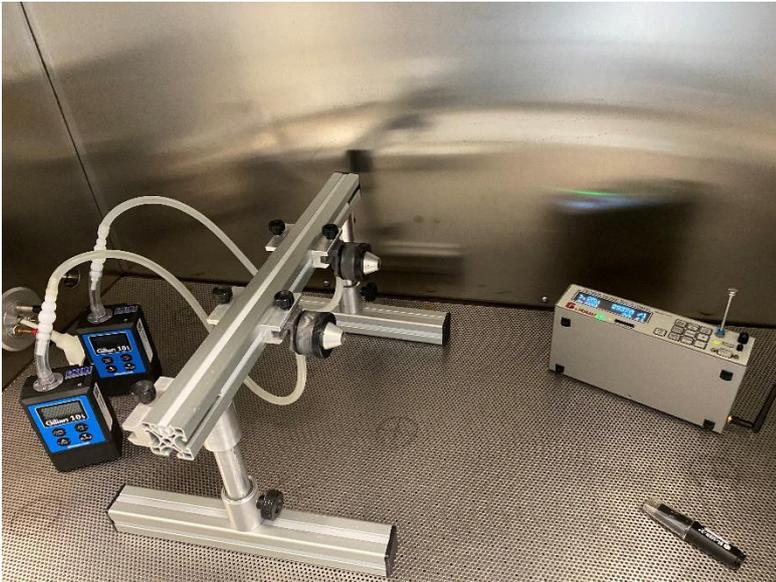


Abbildung 4 – Bioaerosolkammer in der Testebene mit zwei Gilian 10i Pumpen und angeschlossenen GSP 10L Filterköpfen (links), Partikelzähler 11-C (rechts hinter) und Datalogger zur Aufzeichnung von Lufttemperatur und -feuchte (rechts vorne)

Neben der geplanten Sammlung mit dem Filtrationssystem im Prüfraum des Bioaerosol-Testsystems, wurde der Aerosolstrom direkt nach den Aerosolgeneratoren aufgefangen. Dafür wurde eine Gaswasch-Flasche (Schott Duran) und die Methode des Impingement eingesetzt. Die erhaltene Suspension wurde ebenfalls mit allen vier Analyseverfahren evaluiert.

Aerosolgeneratoren

Um die Aerosolkonzentration an verschiedenen Arbeitsplätzen darzustellen, waren je Pilzart fünf Konzentrationen geplant. In den ersten Vorversuchen wurde klar, dass mit dem gewählten Aerosolgenerator (Liquid Sparging Aerosolizer, LSA) keine ausreichend hohen Konzentrationen auf den Filtern erzielt werden können um den gesamten Konzentrationsbereich abzudecken. In einer Bachelorarbeit wurde die weitere Effizienzsteigerung des LSA getestet (Dellinger 2020) und ein weiteres Aerosolisierungsverfahren (RBG1000, Palas GmbH) wurde für den Einsatz mit Pilzsporen ausprobiert.

Die Notwendigkeit eine weitere Methode zur Aerosolproduktion in dem vorliegenden Projekt zu etablieren und alle notwendigen Überprüfungen durchzuführen, führte zur Einführung des neuen Arbeitspaket 1.

Nach erfolgreichen Vortests mit dem RBG (Rotierender Bürstengenerator) wurde Pilzsporenstaub von *Penicillium chrysogenum* hergestellt und Vorversuche durchgeführt. Aufgrund der erzielten Ergebnisse wurden beide Aerosolgeneratoren eingesetzt, um die fünf Konzentrationen herzustellen. Dabei wurde der LSA für die zwei niedrigeren Konzentrationen und der RGB für drei höhere Konzentrationen verwendet.

Da es sich beim Pilz *Aspergillus fumigatus* um einen biologischen Stoff der Risikogruppe 2 handelt und keine Methoden zur sicheren, abgetöteten Staubproduktion im Labor der Schutzstufe 2 vorhanden sind, wurden in diesem Fall drei Konzentrationen nur mit dem LSA hergestellt.

Für die Versuche mit gemischtem Material wurde eine Konzentration mit dem LSA und drei Konzentrationen mit dem RGB hergestellt, um ausreichende Konzentrationen von jedem einzelnen Pilz zu erzielen. Pro Ausgangsmaterial (einzelner Pilz oder Gemisch) und Konzentration wurden mindestens fünf Wiederholungen auf Filtern gesammelt, wobei zwei Sammelgeräte verwendet wurden.

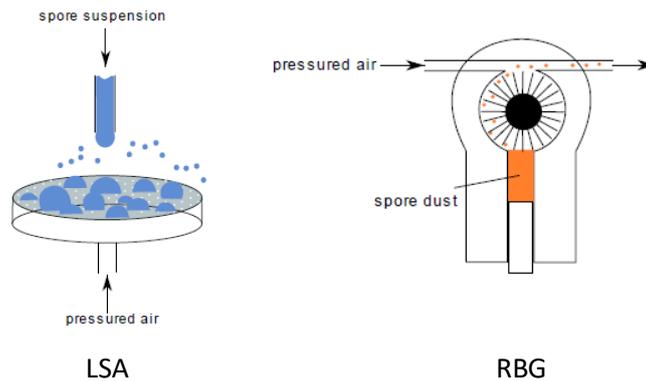


Abbildung 5 – Schematische Darstellung der verwendeten Bioaerosolgeneratoren; LSA – Liquid Sparging Aerosolizer, RBG – Rotating Brush Generator; Grafik adaptiert nach (Alsved et al. 2020)

Nachweismethoden

Alle hergestellten Suspensionen, Ausgangsmaterial, Impingement des Aerosolstroms und Filter-Suspensionen, wurden mit vier Analyseverfahren untersucht.

Sporenzählung

Um die Sporenzahl der Suspensionen zu bestimmen, wurde eine Zellzählung mittels Zählkammer (Neubauer Improved C-Chip, Incyto) durchgeführt. Dabei wurden alle neun Großquadrate unter dem Mikroskop (Eclipse E200, Nikon) mit einer 400fachen Vergrößerung ausgezählt. Der Mittelwert wurde gebildet und die Konzentration auf Sporen pro mL berechnet. Es wurden keine Wiederholungen der Zählungen durchgeführt.

Bestimmung der koloniebildenden Einheiten

Die Zahl der koloniebildenden Einheiten wurde bestimmt, indem ein Aliquot der Suspension in Triplikaten auf Petrischalen mit Nährmedium ausplattiert wurde. Dafür wurden meist Verdünnungen der Suspensionen verwendet, um eine geeignete Konzentration auf der Petrischale zu erzielen. Die geeignete Verdünnung wurde auf Basis der Sporenzählung bestimmt.

Pilz-spezifische ELISA

Um die Proben mit den vom IPA entwickelten spezifischen ELISA zu testen, wurden 1 mL Aliquote in Reaktionsgefäßen hergestellt und auf -80°C gefroren. Je Suspension wurden zwei Aliquote angefertigt, um die zwei Extraktionsverfahren (mit und ohne Aufschluss) zu testen.

Die Suspensionen wurden tiefgefroren an das IPA versandt und dort weiterverarbeitet. Im ersten Schritt wurden die Suspensionen aufgetaut und für die Extraktion ohne Zellaufschluss bei Raumtemperatur für 15 min bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen, portioniert und bei -80°C bis zur Analyse mittels ELISA aufbewahrt. Für die Extraktion mit Zellaufschluss wurden die Aliquote in 2 ml SK38 Gefäßen im Precellys Homogenisator durch Schütteln mit 6000 rpm dreimal für je 20 Sekunden mit Pausen von 30 Sekunden aufgearbeitet. Der Precellys Homogenisator wurde dabei auf $4-6^{\circ}\text{C}$ mit flüssigem Stickstoff durch die verbundene CryolysCryolis Kühleinheit gekühlt. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur für 15 min bei $3000 \times g$ wurde der Überstand mit einer Heparinkanüle abgenommen, portioniert und bei -80°C bis zur Analyse aufbewahrt.

Die spezifischen ELISA sind zum Großteil bereits publiziert und mit Pilzextrakten getestet worden:

<i>A. fumigatus</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>C. herbarum</i>	(Sander et al. 2012)
<i>A. amoenus</i> (clade <i>A. versicolor</i>)	(Zahradnik et al. 2013)
<i>W. sebi</i> , <i>A. amstelodami</i>	(Neumann et al. 2015)

Kopienzahl mittels qPCR

Um die Proben mittels qPCR zu evaluieren, wurden 1 mL Aliquote in Reaktionsgefäßen hergestellt und auf -80°C gefroren. Jeweils 96 Proben wurden gemeinsam weiterverarbeitet und mit dem MagAttract PowerSoil Kit (Qiagen) die DNA extrahiert. Dafür wurden die einzelnen Proben gefriergetrocknet, mit dem Power Bead Puffer aus dem Kit resuspendiert und 1,26 g Matrix Y (MP Bio) zugefügt. Der Aufschluss erfolgte durch 3 x 30 Sekunden auf Stufe 6 des Bead Beater (MP Bio Fast Prep 24). Die einzelnen Reaktionsgefäße wurden anschließend bei 13000 rpm auf einer Eppendorf Tischzentrifuge für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand in eine 96 well Platte des Kits übertragen. Die weitere Verarbeitung erfolgte nach dem Protokoll des Kits unter der Verwendung eines Robotersystems (Microlab Star, Hamilton).

Für die qPCR wurden die Proben 1:10 verdünnt und mit verschiedenen Assays gemessen. Bei den Proben aus Reinkulturen kam der sehr sensitive FungiQuant Assay zum Einsatz (Liu et al. 2012). Für die Mischproben wurden spezifische Assays für *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* und Basidiomycetes eingesetzt (Goebes et al. 2007; Unterwurzacher et al. 2018). Die qPCR Assays vervielfältigen einen Abschnitt der SSU-Region (SSU rRNA), die in den Pilzzellen aufzufinden ist.

Tabelle 2 – Liste der verwendeten Primerpaare (Assays) in der quantitativen PCR

Zielorganismus	Primer	Primer Sequenz	Referenz
Pilze	FungiQuant-F	5'-GGRAAACTCACCAGGTCCAG-3'	Liu et al. 2012
	FungiQuant-R	5'-GSWCTATCCCCAKCACGA-3'	Liu et al. 2012
Basidiomycetes	Basid2R+	5'-TACCGTTGTAGTCTTAACAG-3'	Lynch and Thorn 2006
	FungiQuant-R	5'-GSWCTATCCCCAKCACGA-3'	Liu et al. 2012
<i>Aspergillus</i>	ASP-F1	5'-TGCGATAACGAACGAGACCTCGG-3'	Unterwurzacher et al. 2018
	ASP2	5'-ACCCCCCTGAGCCAGTCCG-3'	Goebes et al. 2007
<i>Cladosporium</i>	CLA-F1	5'-TTCCTGCTGGGCGTGTG-3'	Unterwurzacher et al. 2018
	CLA-R1	5'-GAACCACACGTCCTAT-3'	Unterwurzacher et al. 2018
<i>Penicillium</i>	PEN-F1	5'-GAGAACAATTTAAATCCCTT-3'	Unterwurzacher et al. 2018
	PEN-R1	5'-GGGTCATYATAGAATCC-3'	Unterwurzacher et al. 2018

Für jede Messung wurden entsprechende Standards mit bekannten Konzentrationen an PCR-Produkt (ng / µL) der Pilze und daraus berechneter Kopienzahl / µl mitgemessen. Für Herstellung der Standards wurden spezifische PCR-Produkte einer größeren Länge angefertigt, aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) und die Konzentration an Nukleotiden gemessen (Quant-iT dsDNA Assay Kit, High Sensitivity, invitrogen). Aus der Konzentration an Nukleotiden und der Länge des PCR-Produktes, lässt sich die Kopienzahl errechnen. Die Standards wurden in fünf Verdünnungsstufen eingesetzt.

Der Nachweis der Proben und Standards erfolgte jeweils in vier Replikaten, in einem Reaktionsvolumen von 5 µl in einer 384 well Platte. Der Reaktionsmix bestand aus 2,5 µL GoTaq-qPCR (Biorad), 1 µL Probe, 0,9 µL PCR grade H₂O, und jeweils 0,3 µL der Primer. Die Messung erfolgte auf einer CFX 384 (Biorad) und mit folgenden Programmen:

FungiQuant - 95°C für 5 Minuten, 40 Zyklen von 95°C für 20 sec, 54°C für 20 sec, 72 °C für 30 sec;

Andere Assays - 95°C für 5 Minuten, 40 Zyklen von 95°C für 20 sec, 55°C für 20 sec, 72 °C für 25 sec.
Nach den 40 Zyklen wurde eine Schmelzkurve von 65°C bis 95°C angefertigt.

Statistik und Interpretation der Ergebnisse

Die Sammlung der Daten zu den Proben und die Rohdaten der verschiedenen Analyseergebnisse erfolgte in Tabellenblättern in Excel. Die Verknüpfung der Daten, die Aufbereitung in Grafiken und Berechnungen erfolgten in R version 4.0.2.

Von den Analysemethoden werden unterschiedliche Ergebnisgrößen ausgegeben (Sporenzahl, KBE-Zahl, Proteingehalt, Kopienzahl), diese wurden alle auf Einheiten pro mL umgerechnet, um die Daten vergleichen zu können.

Für die Berechnung der Kopienzahlen pro mL wurden zu jedem qPCR Versuch Standards mitgemessen, deren Kopienzahl pro μL bekannt ist. Anhand der Steigungsgerade der Ct Werte und Konzentration der Standards wurden die Kenngrößen d und k berechnet.

$$Ct = k \times \log(\text{Konzentration}(\text{Kopie}/\mu\text{L})) + d$$

Durch die Umformung der Formel wurden die Ct Werte der gemessenen Proben in logarithmierte Kopienzahlen pro μL berechnet. Dieses Ergebnis wurde als Potenz der Basis 10 verwendet, um die Kopienzahl pro μL zu erhalten. Da die DNA in einer 1:10 Verdünnung gemessen wurde, erfolgte eine Multiplikation mit 10. Um die Kopien / mL zu erhalten ist es nötig, die DNA-Extraktion miteinzubeziehen. Bei dieser fand eine Konzentrierung statt, da die Sporen aus 1 mL Aliquot trocken in die DNA-Extraktion gingen und am Ende mit 100 μL eluiert wurde.

$$\frac{\text{Kopienzahl}}{\text{mL}} = \text{berechnete Kopienzahl von Ct} \times 10 \times 100$$

Die Ergebnisse der ELISA wurden durch die Verknüpfung mit der Sporenzahl von ng / mL in pg / 1000 Sporen umgerechnet:

$$\frac{\text{Antigen ng / mL}}{\text{Sporenzahl / mL}} * 1000000 = \text{pg/1000 Sporen}$$

Um die koloniebildenden Einheiten mit der Sporenzahl ins Verhältnis zu setzen, kann die Keimrate berechnet werden. Dabei wird angenommen, dass jede Kolonie aus einer Spore besteht. Das Ergebnis zeigt, aus wie vielen Sporen eine Kolonie entstanden ist.

$$\frac{\text{Zahl koloniebildenden Einheiten / mL}}{\text{Sporenzahl / mL}} * 100 = \text{Keimrate [\%]}$$

Bei dem Vergleich der Analyseergebnisse ist zu beachten, dass Kopienzahlen als auch KBE-Zahlen nicht direkt in Sporenzahlen umgerechnet werden können, da einzelne Sporen unterschiedlich viele SSU Kopien haben können und der Ursprung einer Kolonie in einer Einzelspore oder einem Sporenaggregat liegen kann. Außerdem fließt in die Koloniezahl die Keimrate der Sporen mit ein.

Für die Darstellung und Berechnung von Zusammenhängen wurden Punkt-Grafiken angefertigt (`plot(method=dot)`), lineare Modelle berechnet (`lm()`) und der Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet (`cor.test(method=Spearman)`). Diese Berechnungen wurden für die Reproduzierbarkeit der Filterduplikate, für den Vergleich der Extraktionsprotokolle und den Vergleich der Analyseverfahren eingesetzt. Der Korrelationskoeffizient *rho* ist in den Grafiken angegeben bzw. in Tabellen zusammengefasst im Bericht ersichtlich.

Um die Variation innerhalb der Messwerte der Analyseverfahren zu vergleichen, wurden relative Standardabweichungen berechnet.

Für die ELISA Analyse wurde jede Probe in drei Verdünnungen (z.B. 1:100, 1:200, 1:400) gemessen. Mindestens zwei Messungen sollten im Messbereich liegen, ansonsten wurde die Messung in angepasster Verdünnungsreihe wiederholt. Aus den Messwiederholungen der Verdünnungen wurde die relative Standardabweichung (CV in %) berechnet.

Eine Wiederholung der Messung wurde auch durchgeführt, wenn die relative Standardabweichung höher als 30% ergab, da das ein Hinweis für möglicherweise technische Fehler im Probenansatz war. Für die Endauswertung wurden dann jene Werte verwendet, welche die niedrigere relative Standardabweichung aufwiesen, auch wenn der CV-Wert größer als 30% war. Bei Proben an der Nachweisgrenze ergab nur die unverdünnte Probe einen messbaren Wert und hat dementsprechend keinen CV-Wert ausgewiesen.

Für die Variation in den Messwerten der qPCR wurden die Kopienzahlen-Werte der vier Messduplikate herangezogen. Für jede Messung jeder Probe wurde der arithmetische Mittelwert aus den Replikaten gebildet (`aggregate(FUN=mean)`) und die Standardabweichung berechnet (`aggregate(FUN=sd)`). Aus diesen Werten wurde die relative Standardabweichung in % berechnet:

$$\frac{\text{Standardabweichung(Kopienzahl)}}{\text{Mittelwert(Kopienzahl)}} \times 100$$

Nach dem gleichen Verfahren wurde auch die relative Standardabweichung der koloniebildenden Einheiten berechnet.

Um die Zahl der Proben innerhalb der Nachweisgrenze zu berechnen wurden für die ELISA jene Werte herangezogen, in denen mindestens eine Verdünnung erfolgreich gemessen werden konnte. Für die koloniebildenden Einheiten und die Sporenzahl wurden alle Daten herangezogen, die einen Wert hatten. Es wurde kein Mindestwert (z.B. 10 Kolonien auf der Platte) verwendet. Daten der qPCR wurden ebenfalls als gemessen definiert, wenn ein Ct Wert ausgegeben werden konnte.

Anhand dieser Definitionen wurden die Zahlen der Proben eines Organismus (Proben_0) innerhalb und außerhalb der Nachweisgrenzen (NWG) bestimmt. Um die beiden Werte in Relation zu setzen wurde der Anteil der Proben unter der Nachweisgrenze in Prozent berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl Proben}_o < \text{NWG}}{\text{Gesamtzahl Proben}_o} \times 100$$

Bei Grafiken, welche die Daten als Boxplots darstellen (`boxplot()`), ist der Median durch einen dunklen Strich angezeichnet. Die Box gibt das 75ste und 25ste Perzentil an. Ergebnisse, die das 1,5 fache des Interquartilabstandes überschreiten, werden als Ausreißer definiert und als Kreise dargestellt. Die „Whiskers“ zeigen den größten und kleinsten Wert des 1,5 fachen Interquartilabstandes an.

Weitere Grafiken sind unter Verwendung der Funktionen `plot()` und `barplot()` erstellt.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Die Arbeiten im Projekt sind in vier Arbeitspakete gegliedert, die aufeinander aufbauen und sich teilweise überschneiden. Das Ziel des Projektes war die Evaluierung und der Vergleich der vom IPA entwickelten pilzspezifischen ELISA mit anderen Nachweismethoden. In den Arbeitspaketen 1 und 2 wurden die Grundlagen geschaffen, um kontrolliertes Probenmaterial zu erzeugen. In Arbeitspaket 3 wurden Probenträger mit sechs verschiedenen Pilzen und einem Pilzgemisch beaufschlagt und zu Suspensionen verarbeitet. Die Sporenzahl und die koloniebildenden Einheiten wurden von diesen Suspensionen vom AIT bestimmt. In Arbeitspaket 4 wurden alle erstellten Proben vom IPA mit spezifischen ELISA und vom AIT mittels Molekularbiologie (DNA und qPCR) analysiert. Danach wurden die Daten kombiniert und ausgewertet.

In Tabelle 3 ist eine Übersicht über die Arbeitspakete und die durchgeführten Arbeiten dargestellt. Die Analyse der Proben mittels ELISA wurde zur Gänze durch das IPA in Bochum durchgeführt. Referenzierte Daten mit dem AVE-X ELISA aus dem komplementären Projekt „AntigenSampling“ wurden durch das BMA Labor Bochum analysiert. Alle anderen Arbeiten wurden unter beratender Unterstützung durch die BOKU vom AIT Austrian Institute of Technology durchgeführt.

In den folgenden Kapiteln sind die Arbeiten und Ergebnisse im Detail beschrieben.

Tabelle 3 – Übersicht über die Arbeitspakete und die durchgeführten Arbeiten.

<i>Abkürzung</i>	<i>Name Arbeitspaket</i>	<i>Durchgeführte Arbeiten</i>
<i>AP 1</i>	<i>Erstellung von kontrolliertem Probenmaterial</i>	<i>Erstellung von Protokollen zur Herstellung von Pilzsuspensionen und Sporenstäuben. Überprüfung des Antigengehalts beider Ausgangsmaterialien und der Lagerfähigkeit des Staubes.</i>
<i>AP 2</i>	<i>Adaptierung und Evaluierung des Testaufbaus, Evaluierung der gleichmäßigen Sammlung</i>	<i>Überprüfung der gleichmäßigen Sammlung mit zwei Filtersammlern gleichzeitig in der Bioaerosolkammer. Überprüfung des Antigengehalts nach der Aerosolerzeugung und nach der Sammlung.</i>
<i>AP 3</i>	<i>Beaufschlagung der Filter mit Prüfaerosolen unter kontrollierten Bedingungen. Test von 6 Einzelsuspensionen und einem Sporenmix (Erhebung Sporenzahl, KBE)</i>	<i>Herstellen von Filterproben von sechs verschiedenen Pilzen in 3 bis 5 Konzentrationen und bis zu 5 Wiederholungen pro Konzentration. Herstellen von Filterproben mit einem Pilzgemisch aus fünf Organismen in 4 Konzentrationen und mindestens 5 Wiederholungen je Konzentration. Verarbeitung der Proben und Bestimmung der Sporenzahl und Anzahl der koloniebildenden Einheiten.</i>
<i>AP 4a</i>	<i>Analyse der Proben durch IPA</i>	<i>Messung von Aliquoten des Ausgangsmaterials, des gesammelten Aerosolstroms, der Filterproben und von Betriebsproben aus dem komplementären Projekt „AntigenSampling“ durch das IPA Bochum.</i>
<i>AP 4b</i>	<i>Analyse der Proben durch AIT</i>	<i>Extraktion der DNA von Aliquoten des Ausgangsmaterials, des gesammelten Aerosolstroms und der Filterproben. Analyse der DNA mit quantitativer PCR und einem allgemeinem und vier spezifischen Assays. Auswertung der Daten.</i>

Arbeitspaket 1 – Erstellung von kontrolliertem Probenmaterial

Dieses Arbeitspaket war ursprünglich als Teil von Arbeitspaket 2 geplant, da ein Flüssigdispergierer (LSA, CH Technologies) für die Aerosolproduktion eingesetzt werden sollte, für den bereits etablierte Standardprotokolle vorhanden sind. Nach den ersten Vorversuchen mit Sporenmaterial in Flüssigkeit und Filterextrakten wurde klar, dass die Konzentration auf den Filtern, bei einer im Labormaßstab praktikablen Sammelzeit, nicht ausreichend ist um fünf unterschiedliche Konzentrationen über der Nachweisgrenze der ELISA herzustellen.

Ein alternativer Aerosolerzeuger, der Rotierende-Bürsten-Dispergierer – RBG, wurde in das Projekt miteinbezogen. Der RBG verwendet Staub als Ausgangsmaterial. Da für die Herstellung von Sporenstaub von verschiedenen Pilzorganismen und die Aerosolerzeugung keine standardisierten Protokolle am AIT vorhanden waren, wurde das Arbeitspaket 1 neu entwickelt.

In dem Arbeitspaket wurde die Herstellung von Sporenstaub standardisiert und die Kultivierungsbedingungen optimiert, um genügend Material herzustellen. Der Sporenstaub wurde auf seine Haltbarkeit getestet und Unterschiede im Antigengehalt von flüssigem und trockenem Material überprüft.

Tabelle 4 – Liste der verwendeten Organismen und deren Kultivierungsbedingungen; MEA – Malzextraktagar, DG-18 – Dichloran Glycerin Chloramphenicol Agar;

Art	Abkürzung	Bezeichnung Stamm	DNA Region zur Identifizierung	Medium	Ernte	Herstellung Staub
<i>Aspergillus amoenus</i>	<i>A.amoe</i>	ATCC10072	β Tub	MEA	flüssig	Ja
<i>Aspergillus amstelodami</i>	<i>A.amst</i>	RL586	β Tub	DG18	abschaben	Ja
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>A.fumi</i>	RL548	β Tub	MEA (50mL Röhren)	flüssig Inaktivierung durch Einsatz von Anti-Schimmel-Konzentrat	Nein - Gesundheitsrisiko
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>C.herb</i>	D_D78	ITS, LSU, EF1 α , β Tub	MEA	flüssig	Ja
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>P.chry</i>	D_D53	ITS, LSU, β Tub	MEA	abschaben	Ja
<i>Wallemia sebi</i>	<i>W.sebi</i>	R8	ITS, LSU, EF1 α	MEA+0,5% NaCl, Zellophan	abschaben	JA

Zur Herstellung von Staub wurde das Pilzmaterial äquivalent zur Herstellung von Suspension verarbeitet, siehe "Testorganismen und Herstellung des Ausgangsmaterials". Statt Puffer wurde für die Ernte Reinstwasser (arium® pro, Satorius) eingesetzt. Danach wurde das Material für mehrere Minuten stark geschüttelt (Vortex Genie 2) und durch Glaswolle oder ein feines Metallgitter filtriert. Die filtrierte Sporensuspension wurde mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren und in einer Gefriertrocknungsanlage (Alpha 2-4 LSC, CHRIST) getrocknet.

Um die Stabilität des Staubes zu evaluieren wurde Staub von *Penicillium chrysogenum* hergestellt. Von diesem Staub wurde an sieben Zeitpunkten (20. November = Tag der ersten Trocknung) je ein Aliquot mit einem Löffelchen entnommen und nach dem etablierten Standardprotokoll extrahiert. Die Proben wurden vom IPA mit und ohne Aufschluss mit dem spezifischen *Penicillium* ELISA gemessen. Abbildung 6 zeigt die Entwicklung des Antigengehalts pro 1000 Sporen während der Lagerungszeit. Die Daten zeigen, dass der Antigengehalt mit der Zeit um ca. 1 pg / 1000 Sporen abnimmt. Die Daten unterliegen jedoch einer hohen Schwankung. Zu dieser Schwankung trägt auch die Ungenauigkeit der Sporenzählung bei. Außerdem ist ein Unterschied zwischen der Extraktion mit und ohne Aufschluss ersichtlich. Mit Aufschluss lag die Antigenausbeute pro 1000 Sporen mehr als doppelt so hoch wie ohne Aufschluss. Beide Aliquote von einem Versuchstag entstammen einer Suspension und sind mit der gleichen Sporenzahl berechnet.

Im Standardprotokoll wurde festgehalten, dass Sporenstaub möglichst innerhalb von vier Wochen verwendet werden sollte. Außerdem wurde, wie bereits für flüssiges Ausgangsmaterial etabliert, an jedem Versuchstag ein Aliquot des Ausgangsmaterials entnommen und mit allen Analysemethoden vermessen. Dadurch kann eine Vergleichbarkeit der Versuchstage gewährleistet werden.

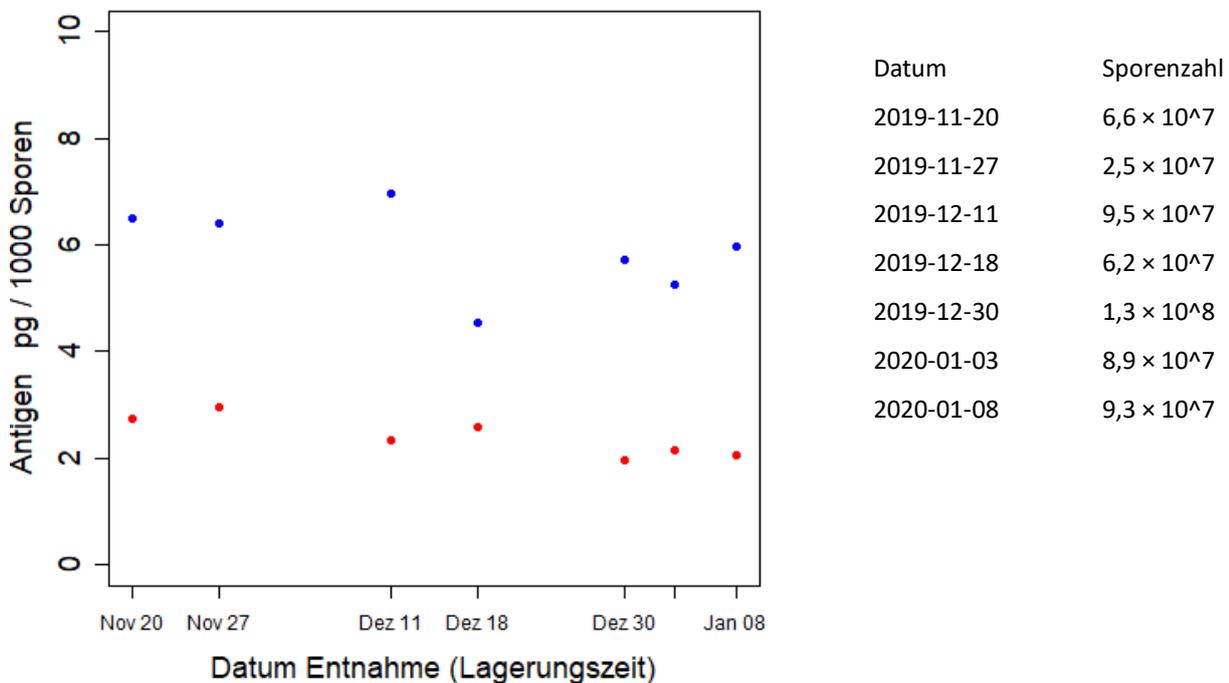


Abbildung 6 - Antigengehalt von *Penicillium chrysogenum* Staub (hergestellt am 20. November), Lagerung über 49 Tage, Entnahme von Aliquoten zu 6 Zeitpunkten, Herstellung einer Suspension, Analyse der Sporenzahl. Bestimmung des Antigengehalts in pg / pro 1000 Sporen in zwei Aliquoten der gleichen Suspension: rot - wässrige Extraktion, blau – Extraktion mit Zellaufschluss; n = 14

An jedem Versuchstag zur Herstellung der Filterproben wurde das flüssige bzw. das trockene Ausgangsmaterial extrahiert und mit allen Analysemethoden gemessen. Anhand der gezählten Sporenzahl und der gemessenen Antigenkonzentration wurden der Antigengehalt (pg / 1000 Sporen) berechnet. Abbildung 7 zeigt die Antigengehalte, Keimrate und Kopienzahl/Spore für das Ausgangsmaterial der verschiedenen Organismen. Für *Aspergillus fumigatus* wurde aufgrund der möglichen gesundheitlichen Gefährdung während der Trocknung kein Sporenstaub hergestellt.

Die Daten zeigen, dass der Antigengehalt je nach Organismus unterschiedlich ist. Dabei haben die großen Sporen (*Aspergillus amstelodami* und *Cladosporium herbarum*) annähernd hundertfach höhere Gehalte als die Organismen mit kleineren Sporen. Der Antigengehalt schwankte, ist aber für trockenes und flüssiges Material meist in den gleichen Größenordnungen. *Wallemia sebi* zeigt einen deutlichen Unterschied im Antigengehalt zwischen Staub und Flüssigkeit. Außerdem ist der Antigengehalt der *W. sebi* Sporen nach Staubherstellung fast so hoch wie bei den großen Sporen von *C. herbarum*, obwohl die Sporen von *W. sebi* relativ klein sind. Die Keimrate zeigt hohe Unterschiede vor allem der Sporenstäube und im Mittel deutlich reduzierte Keimraten für den Staub. Diese Reduktion kommt durch das Frieren mit flüssigem Stickstoff und Gefriertrocknen zu Stande. Die Daten der molekularbiologischen Analyse zeigen ebenfalls hohe Schwankungen. Weder die Keimraten noch die Kopienzahlen steigen mit der Sporengröße.

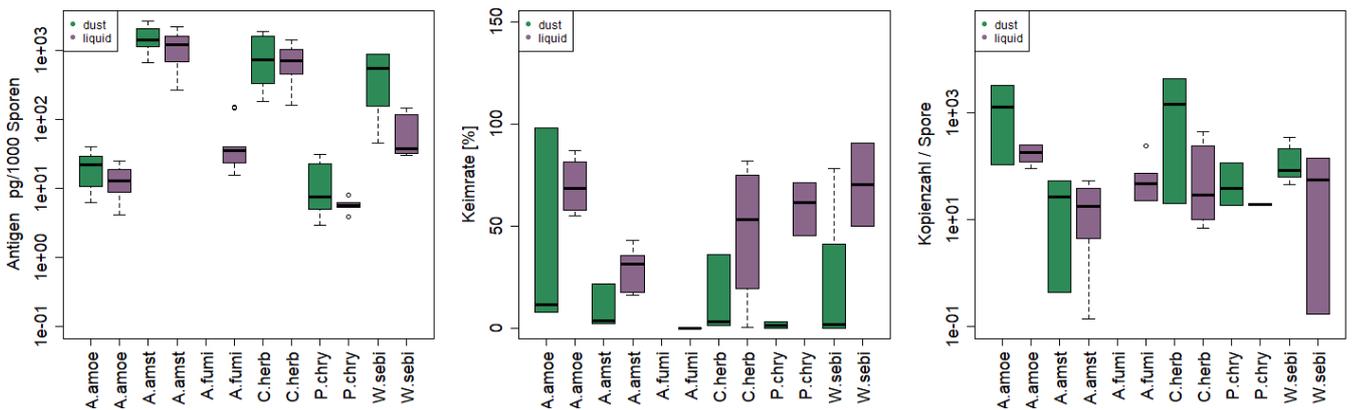


Abbildung 7 – Antigengehalt des Ausgangsmaterials vor der Aerosolerzeugung; grün – trockenes Material (Sporenstaub für RGB); lila – flüssiges Material (Sporensuspension für LSA); aufgrund des Gesundheitsrisikos wurde von *A. fumigatus* kein Staub hergestellt; Links – Antigengehalt [pg/1000 Sporen], Mitte – Keimrate [%] Rechts – Kopienzahl / Spore; n = 92

Arbeitspaket 2 – Adaptierung und Evaluierung des Testaufbaus, Evaluierung der gleichmäßigen Sammlung

Für den Vergleich der pilzspezifischen ELISA des IPA mit anderen Analyseverfahren wurden Filterproben unter kontrollierten Bedingungen im AIT Bioaerosol-Testsystem hergestellt. Um mehrere Proben herstellen zu können und die Reproduzierbarkeit der Analyse bei Parallelproben aufzuzeigen, wurden jeweils zwei Filterproben gleichzeitig beaufschlagt.

Geringe Varianzen bei gleichzeitigem Betrieb von acht 3,5 L GSP Sammelköpfen wurde bereits in einem Vorgängerprojekt gezeigt (Pogner et al. 2020). Der Aufbau in der AIT Bioaerosolkammer (siehe Kapitel „Bioaerosol Test System“) mit 10 L GSP Sammelköpfen wurde im vorliegenden Projekt in Vortests überprüft. Dabei wurde die gleichmäßige Partikelverteilung in der Luft sowie auf gleichmäßige Beaufschlagung auf Filtern getestet.

Neben den Vorversuchen wurde nach Beendigung aller Versuche die gleichmäßige Beaufschlagung auf beiden Filterduplikaten nochmals geprüft. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der Filterduplikate, wobei die vordere Sammelposition gegen die hintere Sammelposition aufgezeichnet ist. Die eingezeichnete Gerade beschreibt die Darstellung von identen Ergebnissen. Sowohl für die Analyse der Sporenzahl der Filter, der koloniebildenden Einheiten als auch die Analyse mittels ELISA zeigen die Daten geringe Abweichungen und eine Gruppierung rund um die Ideallinie. Die Daten der molekularbiologischen Analyse zeigen dagegen hohe Abweichungen. Diese Ergebnisse zeigen bereits, dass die Konzentration nicht gut abgebildet werden konnte. Das ist wahrscheinlich der DNA Extraktion geschuldet, die zu hohen Variationen führen kann.

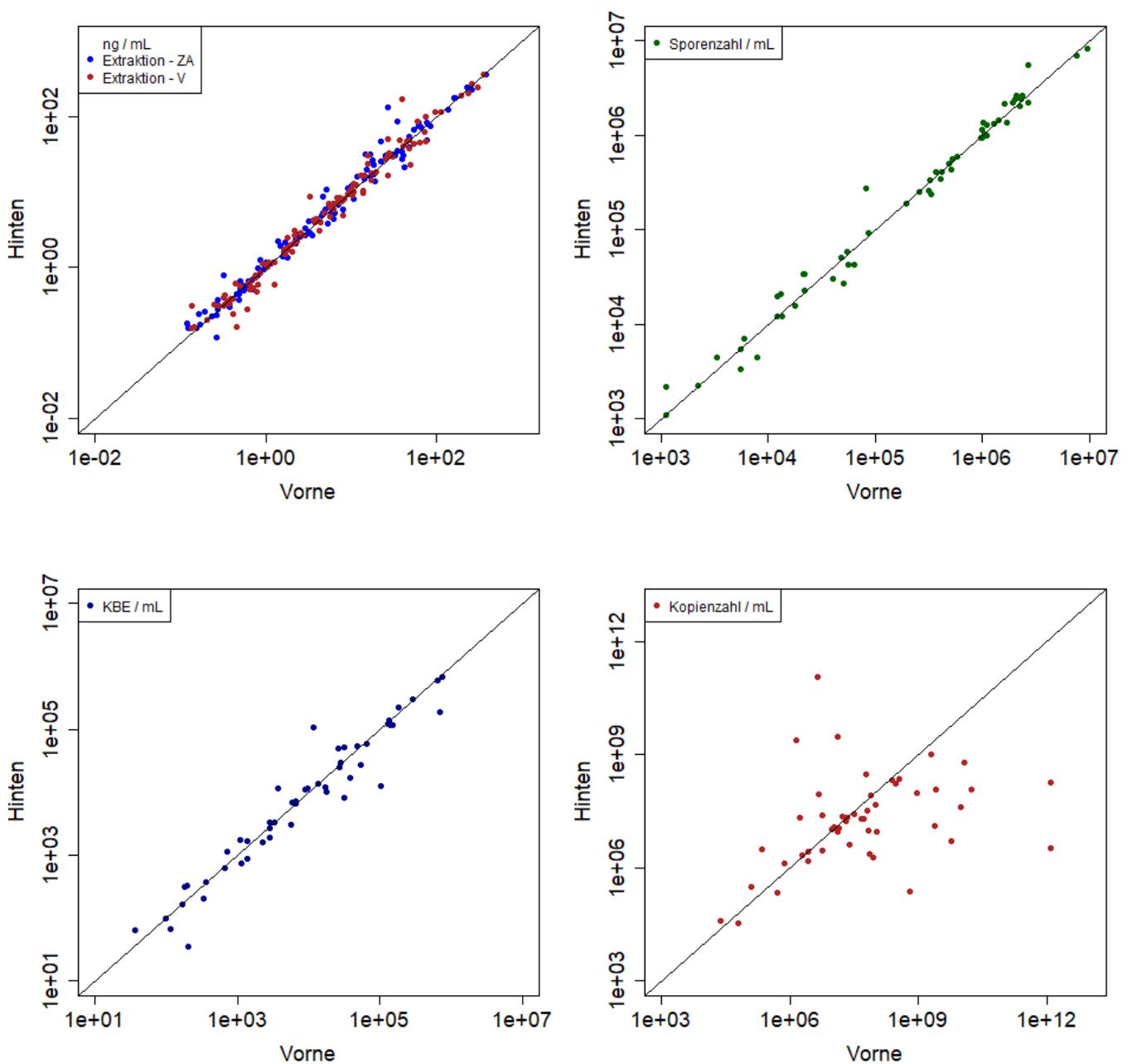


Abbildung 8 – Erzielte Ergebnisse der gleichzeitig beaufschlagten Filterduplikate, die eingezeichnete Gerade beschreibt fiktive idente Ergebnisse;

Links oben – Ergebnisse der ELISA Analysen, rot – wässrige Extraktion ($\rho = 0,989$), blau - Extraktion mit Zellaufschluss ($\rho = 0,987$), Rechts oben – Ergebnisse der Sporenzählung ($\rho = 0,992$); Links unten – Ergebnisse der koloniebildenden Einheiten ($\rho = 0,913$); Rechts unten – Ergebnisse der Kopienzahl ($\rho = 0,490$); $n = 77$

Um sicherzustellen, dass die Aerosolerzeugung keinen Einfluss auf den Antigengehalt hat, wurde neben dem Ausgangsmaterial (Abbildung 7) ebenfalls der Aerosolstrom direkt nach dem Aerosolerzeuger analysiert. Die Sammlung erfolgt wie in Kapitel „Sammlung der Pilzsporen“ beschrieben mittels einer Gaswaschflasche. Die Sammelflüssigkeit wurde mit allen vier Analyseverfahren ausgewertet.

Der Antigengehalt des Ausgangsmaterials (Staub bzw. Flüssigkeit) wurde mit dem Antigengehalt nach der Aerosolerzeugung (Gaswaschflasche) und dem Antigengehalt der Filterextrakte verglichen (siehe Abbildung 9). Die

Antigengehalte unterliegen, so wie in Abbildung 7, hohen Schwankungen. Diese ergeben sich aus Schwankungen der Analysemethoden (Sporenzahl, ELISA) sowie biologischen Schwankungen. Bis auf die Daten von *Wallemia sebi* und *Aspergillus fumigatus* unterliegen die Filterextrakte den höchsten Schwankungen. Auch die Daten für die Keimrate und die Kopiezahl zeigen ähnliche große Schwankungen wie in Abbildung 7.

Ein einheitlicher Trend zu einer Abnahme oder Zunahme des Antigengehaltes nach der Aerosolerzeugung oder Filtersammlung ist nicht erkennbar.

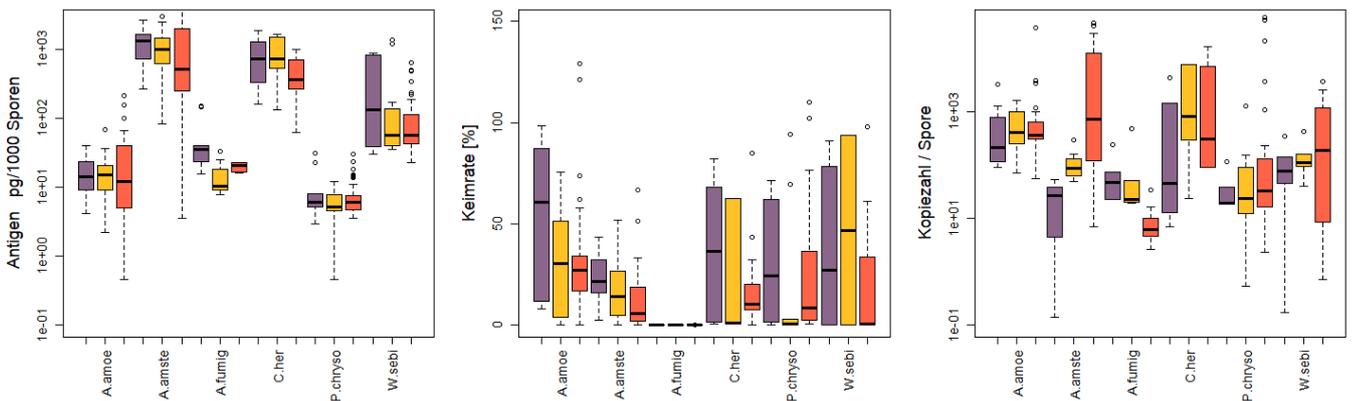


Abbildung 9 – Ergebnisse Analysemethoden an drei Punkten im Versuchsaufbau; lila – Ausgangsmaterial, gelb – nach der Aerosolerzeugung, rot – nach der Filterextraktion;
 Links - Antigengehalt in pg / 1000 Sporen (beide Extraktionsverfahren, mit und ohne Aufschluss sind inkludiert);
 Mitte – Keimrate; Rechts – Kopiezahl / Spore; n = 597

Arbeitspaket 3 – Herstellung von Probenträgern

Nach der Erstellung von Protokollen für die stabile Erzeugung von Ausgangsmaterial und der Überprüfung des Testaufbaus wurden die geplanten Probenträger zum Vergleich der Analysemethoden erstellt. Wie in Arbeitspaket 1 beschrieben wurden zwei Verfahren zur Aerosolerzeugung eingesetzt, um die fünf geplanten Konzentrationen herzustellen. In Tabelle 5 sind die Anzahl der Versuche, die Versuchstage sowie die verwendeten Aerosolerzeugungsmethoden aufgelistet. Je Organismus und Konzentration wurden mindestens fünf Filter beaufschlagt.

Das Ausgangsmaterial wurde an jedem Versuchstag überprüft (Messung mit allen vier Analysemethoden). Der Aerosolstrom wurde für jede Aerosol-Generierungsmethode mindestens einmal gesammelt.

Tabelle 5 – Anzahl der Versuchstage, Versuche und verwendeten Aerosolmethoden für die Herstellung der Testfilter, je nach Testmaterial

	Versuchstage	Versuche gesamt	Konzentrationen LSA	Konzentrationen RGB
<i>Aspergillus amoenus</i>	9	15	2	3
<i>Aspergillus amstelodami</i>	10	14	2	3
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	12	3	
<i>Cladosporium herbarum</i>	7	11	2	3
<i>Penicillium chrysogenum</i>	8	12	2	3
<i>Wallemia sebi</i>	7	10	2	3
Mix	6	8	1	3

Arbeitspaket 4 – Verarbeitung und Analyse der Filterproben und Vergleich der Methoden

Nach der Sammlung müssen Filterproben extrahiert werden, um das Material für die Analyse zugänglich zu machen. Eine Zählung von Sporen auf Filtermaterial ist theoretisch möglich, quantitativ aber schwer umsetzbar. Eine direkte Kultivierung von Filtern ist nur bei einer geringen Pilzkonzentration möglich. Für die Analyse mittels Molekularbiologie oder ELISA ist die Herstellung einer Suspension unbedingt nötig.

Zur Extraktion wurden zwei verschiedene Methoden, mit und ohne Aufschluss, mit den pilzspezifischen ELISA getestet. Für die Sporenzählung und Kultivierung ist ein Aufschluss nicht möglich, für die Molekularbiologie jedoch nötig um die DNA zugänglich zu machen.

Die Ergebnisse der Analysemethoden wurden gesammelt und miteinander verglichen. Korrelationen wurden errechnet und Stärken, Schwächen und Nachweisgrenzen aufgezeigt.

Extraktionsprotokolle

In der Literatur sind verschiedene Protokolle für die Extraktion von Pilzmaterial und Filterproben für die Analyse mit ELISA beschrieben. Im komplementären Projekt „AntigenSampling“ wurden verschiedene Methoden ausgetestet. Dabei wurde ein negativer Effekt durch die Zugabe von Protease-Inhibitoren festgestellt.

Der Test zeigte hohe Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten. Ein positiver Effekt einer längeren Extraktion (über Nacht) war nicht ersichtlich.

In dem vorliegenden Projekt wurde auf die bereits für die pilzspezifischen ELISA des IPA publizierten Extraktionsmethode mit 1 Minute vortexen, 30 Minuten inkubieren am Rollenschüttler, 1 Minute Vortexen und 30 Minuten Inkubation sowie auch die Aufschlussmethode durch Homogenisation mit Precellys zurückgegriffen (Sander et al. 2012). Da die Konzentration von 0,05 % Tween20 einen negativen Effekt auf den Nachweis mittels qPCR haben kann und am AIT gute Erfahrungen für die Extraktion von Filtern mit einer Konzentration von 0,01% Tween20 gesammelt wurden, wurde als Puffer 1 x PBS 0,01% Tween20 eingesetzt.

Der Aufschluss von Extrakten mittels Beat Beater (MP Bio Fast Prep 24) wurde ebenfalls im Vortest im komplementären Projekt „AntigenSampling“ ausprobiert. In diesem Test konnte ein positiver Einfluss vom Zellaufschluss auf den Antigengehalt festgestellt werden. In der Folge wurden im vorliegenden Projekt Versuche mit allen sechs Testorganismen mit und ohne Zellaufschluss durchgeführt (Precellys). Die ersten Ergebnisse bei der Analyse der Ausgangsmaterialien mit hoher Sporenzahl zeigten Unterschiede der Antigenkonzentration mit und ohne Aufschluss je nach Testorganismus. Daher wurde beschlossen, alle Proben in doppelter Bestimmung im ELISA zu messen.

Nach Beendigung aller Analysen wurden die Ergebnisse mit und ohne Aufschluss miteinander verglichen. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der ELISA direkt (ng / mL) und den Antigengehalt (pg / 1000 Sporen) für die Testorganismen und die Mischproben. Die Mischproben wurden jeweils mit den spezifischen ELISA gemessen. Die Proben der Reinkulturen sind farblich dargestellt. Die Mischproben sind nicht nach ELISA farblich markiert, um eine Unterscheidung zwischen Proben mit einzelnen Organismen (Laborproben der Bioaerosolkammer) und gemischtem Ausgangsmaterial (Laborproben und Betriebsproben) zu ermöglichen. Die Punkte der Grafiken zeigen

eine sehr gute Korrelation der beiden Ergebnisse, egal welcher Testorganismus und damit spezifische ELISA eingesetzt wurde.

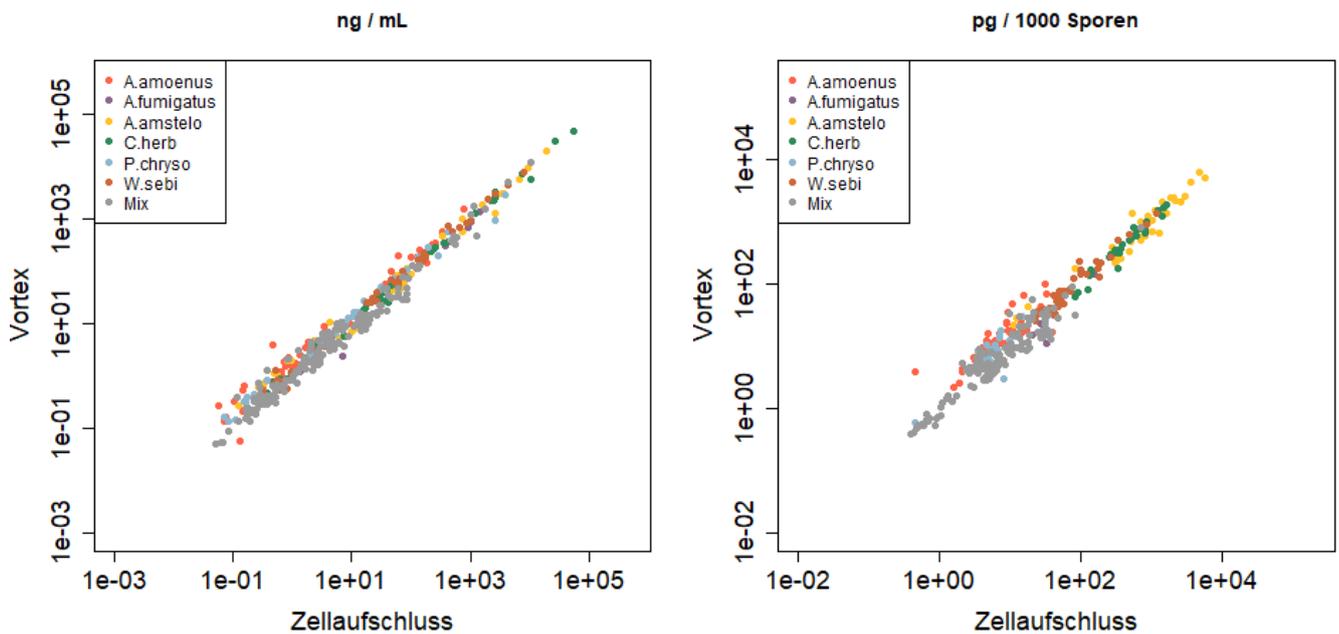
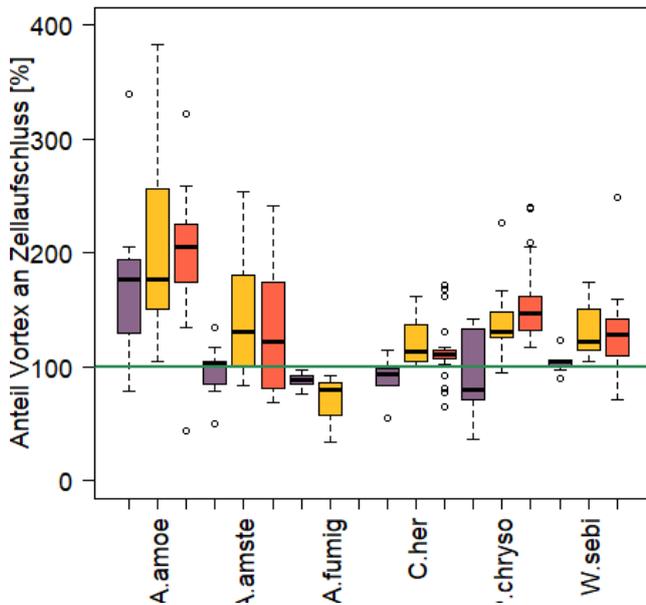


Abbildung 10 – Ergebnisse der Extraktion von Suspensionen mit und ohne Aufschluss; Mixing – wässriger Extraktion, Precellys – Extraktion mit Zellaufschluss; links – Ergebnisse der ELISA direkt, rechts – Ergebnisse der ELISA normalisiert auf den Sporengehalt = Antigengehalt in pg / 1000 Sporen; n = 505 je Grafik

Der Vergleich der Extraktionsmethoden erfolgte auch für jeden Organismus einzeln (siehe Annex). Die Korrelationen wurden jeweils berechnet und sind in Tabelle 6 angegeben. In Abbildung 11 ist der Anteil des Antigengehaltes der wässrigen Extraktion zur Extraktion mit Zellaufschluss dargestellt. Für die meisten Organismen und Kontrollpunkte zeigt die wässrige Extraktion leicht höhere Ergebnisse. Nur für *A. fumigatus* und das Ausgangsmaterial von *C. herbarum* und *A. amstelodami* sind fast alle Werte unter 100 % und damit höher bei der Extraktion mit Zellaufschluss. Für *A. amoenus* liegen fast aller Werte bei der wässrigen Extraktion höher.

Damit konnte bei Betrachtung aller Testorganismen in verschiedenen Konzentrationen mit mehreren Wiederholungen, die Ergebnisse der Vortests nur teilweise bestätigt werden. Wie in den ersten Tests ist ein Unterschied je nach Organismus erkennbar.

Tabelle 6 – Korrelationen der Extraktionsverfahren mit und ohne Aufschluss für jeden Testorganismus; Berechnungsmethode Spearman



Organismus	<i>rho</i>
A. amoebae	0.968
A. amstelodami	0.99
A. fumigatus	0.976
C. herbarum	0.994
P. chrysogenum	0.995
W. sebi	0.981

Abbildung 11 – Vergleich des Extraktion mit und ohne Zellaufschluss; Daten als Anteil [%] Antigengehalt der wässrigen Extraktion an dem Antigengehalt der Extraktion mit Zellaufschluss; grüne Linie = 100% - Ergebnis mit und ohne Zellaufschluss sind gleich; lila – Ausgangsmaterial, gelb – nach der Aerosolerzeugung, rot – nach der Filterextraktion

Aufgrund dieser Daten wird es für den Einsatz der ELISA in Betriebsmessungen nicht nötig sein, einen Aufschluss durchzuführen. Das spart Materialkosten und Analysezeit. Ein Aufschluss ist allerdings möglich und wäre eine Option, wenn von dem gleichen Material ELISA durchgeführt sowie DNA extrahiert wird (aliquotieren vor dem Zentrifugationsschritt).

Zusammenfassung des Extraktionsprotokolls:

- Extraktion der Filter in 5 mL 1x PBS 0,01%Tween20
- 1 Minute Vortex, 30 Minuten Rollenschüttler, 1 Minute Vortex, 30 Minuten Rollenschüttler
- Zellaufschluss (optional)
- Zentrifugation RT 15 Minuten und 3000 x g
- Messen des Überstandes

Analyse der Proben mit verschiedenen Verfahren

Um die vom IPA entwickelten ELISA auf ihre Einsatzfähigkeit für Betriebsproben zu testen, wurden sie im vorliegenden Projekt mit anderen Analyseverfahren verglichen. Dafür wurden alle Proben - Ausgangsmaterial, gesammelter Aerosolstrom, Filterproben – mit allen vier Analyseverfahren quantifiziert.

Die Sporenzahl wurde mittels Zählung in einer Zählkammer ermittelt. Ein Aliquot wurde in Triplikaten auf Nährmedium kultiviert und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten berechnet. Weiterhin wurden die Proben mit den spezifischen ELISA, einem allgemeinen qPCR Assay und vier spezifischen qPCR Assays analysiert.

Je nach Nachweisgrenze der Methoden konnte eine unterschiedliche Anzahl der Proben analysiert werden. Außerdem ist die Abweichung der Analysereplikate je nach Methode unterschiedlich.

Zahl der detektierten Proben

Für jede Probe wurden alle Analyseverfahren verwendet, jedoch konnten nicht immer Werte über der jeweiligen Nachweisgrenze erzielt werden. In Tabelle 7 ist das Verhältnis zwischen bzw. die Anzahl von Proben oberhalb und unterhalb der Nachweisgrenze dargestellt.

Obwohl es sich bei der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten prinzipiell um eine sehr sensitive Methode handelt, konnten nicht bei allen Proben Kolonien gezählt werden. Das liegt auch daran, dass Proben, die mit gefriergetrocknetem Staub hergestellt werden, eine stark reduzierte Keimfähigkeit aufweisen. Das Verfahren zur Herstellung des Staubs reduziert die Keimfähigkeit von ca. 30-80% auf ca. 1-10% (siehe Abbildung 7).

Tabelle 7 - Anzahl der Proben unterhalb (< NWG) und oberhalb (> NWG) der Nachweisgrenze (NWG) der verschiedenen Analyseverfahren. Die Anzahl der Messungen unterscheidet sich von der Probenzahl aufgrund des Einsatzes von zwei Extraktionsverfahren bei den ELISA. % - Anteil der Proben unterhalb der Nachweisgrenze

Organismus	Anzahl Proben	Sporenzahl			KBE			qPCR			ELISA		
		< NWG	> NWG	%	< NWG	> NWG	%	< NWG	> NWG	%	< NWG	> NWG	%
A.amoenus	34	0	34	0	2	32	5,9	0	34	0	14	54	20,6
A.amstelodami	31	6	25	19,4	3	28	9,7	3	28	9,7	0	62	0
A.fumigatus	15	0	15	0				0	15	0	25	5	83,3
C.herbarum	29	5	24	17,2	1	28	3,5	4	25	13,8	0	58	0
P.chrysogenum	34	0	34	0	2	32	5,9	0	34	0	9	59	13,2
W.sebi	30	0	30	0	14	16	46,7	0	30	0	0	60	0

Abweichungen der Analysewiederholungen

Um die Messabweichungen der verschiedenen Analyseverfahren und spezifischen Assays zu vergleichen, wurden die relativen Standardabweichungen von Messwiederholungen berechnet.

Da die Sporenzahl nicht in Wiederholungen bestimmt wurde, ist für diesen Wert keine Messungenauigkeit berechnet. Da an einem Versuchstag bis zu zwölf Proben ausgezählt werden mussten und der individuelle Zählfehler bei zu langer Arbeit mit dem Mikroskop durch Müdigkeit der Augen stark zunimmt, war es nicht möglich alle Proben mehrfach zu bestimmen. Die Sporenzählung wurde im gesamten Projekt von nur einer Person durchgeführt, um den Zählfehler möglichst gering zu halten. Mit wiederholten Zählungen von einer Suspension von *Penicillium chrysogenum* wurde der individuelle Zählfehler dieser Person bestimmt.

Für die anderen Analyseverfahren konnte durch Messung von Verdünnungsreihen, Messwiederholungen bzw. das mehrfache Ausplattieren die Abweichungen für jede einzelne Proben bestimmt werden. Diese wurden in relativen Standardabweichungen (%) angegeben. In Abbildung 12 sind die relativen Standardabweichungen dargestellt.

Die Grafiken zeigen deutlich, dass die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten hohe Standardabweichungen von bis zu 200% hat. Dabei ist zu beachten, dass es sich dabei um eine Poisson-Verteilung handelt, und daher die relative Standardabweichung sehr stark von der Zahl der Kolonien pro Platte abhängig ist. Eine hohe Koloniezahl ist jedoch wiederum nachteilig für die Zählung der Kolonien, da diese schwerer zu unterscheiden sein können. Generell setzt sich der Fehler bei Kultivierungsverfahren aus mehreren Faktoren zusammen: Plattenfehler (Unterschiede der Medienplatten zueinander), Clusterbildung von Sporen, Verdünnungs- und Pipettierfehler sowie Zählfehler.

Die Analyseverfahren der ELISA zeigen deutlich geringere Standardabweichungen, die in keinem Fall 50% erreichen. Die Grafiken zeigen die Abweichungen der jeweiligen spezifischen ELISA. Es gibt Unterschiede zwischen den verschiedenen ELISA und leichte Unterschiede mit und ohne Zellaufschluss der Proben vor dem ELISA. Diese Unterschiede in der Vorbereitung wirken sich jedoch meistens nicht auf den Median aus.

Bei den qPCR Assays gibt es hohe Variationen zwischen den Messwiederholungen. Die größten Abweichungen zeigen das Assay für *Cladosporium* und auch das FungiQuant Assay hat viele Ausreißer. In den verwendeten Assays ist *Cladosporium* der am wenigsten sensitive, der viele sehr hohe Ct Werte ausgegeben hat. Je höher der Ct Wert und geringer damit nachgewiesenes Material, desto höher sind die Schwankungen innerhalb der qPCR.

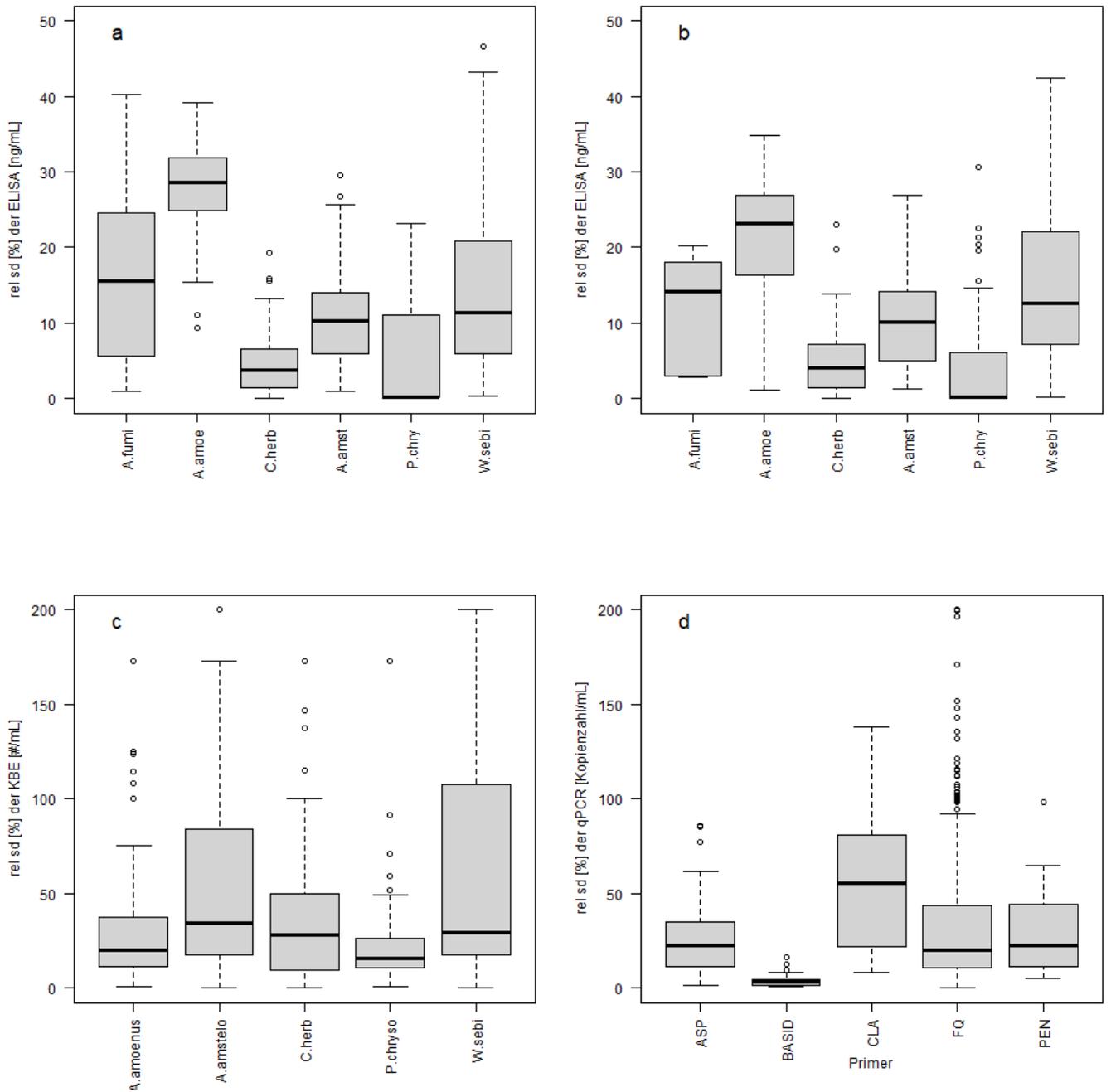


Abbildung 12 – Darstellung der Abweichungen zwischen Messwiederholungen für ELISA, KBE und qPCR). a – ELISA Assays mit Zellaufschluss, b – ELISA Assays ohne Zellaufschluss, c – Koloniebildende Einheiten nach Organismen, d – Kopienzahlen der qPCR Assays

Vergleich der Ergebnisse zwischen den Analysemethoden

Da das Hauptziel der vorliegenden Studie der Vergleich der spezifischen ELISA mit anderen Analysemethoden ist, wurden die Ergebnisse für jede Probe gegeneinander aufgezeichnet. Dabei sind sowohl die Ergebnisse der Filterproben, als auch die von Aerosolstrom und Ausgangsmaterial aufgetragen. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der ELISA mit denen der anderen Methoden vergleichend dargestellt. In Abbildung 14 sind die anderen Methoden untereinander verglichen worden. In diesen Darstellungen sind alle Daten von allen Organismen aufgezeichnet, für die ELISA sind die Werte für die wässrige Extraktion verwendet worden. Im Annex sind die Darstellungen für jeden einzelnen Organismus und mit beiden Extraktionsverfahren aufgezeichnet.

Um die Korrelationen (Spearman) der Methoden für die jeweiligen Organismen zusammenfassend darzustellen sind in Abbildung 15 die Korrelationskoeffizienten (ρ) farblich dargestellt. Je dunkler das Grün desto höher ist die Korrelation zwischen den Methoden.

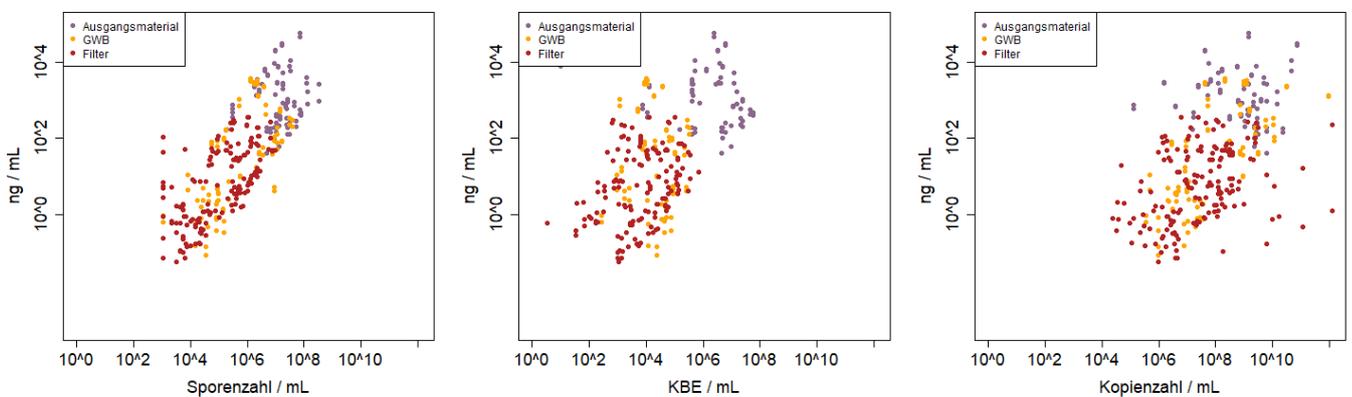


Abbildung 13 – Darstellung der ELISA Ergebnisse (ng/mL) gegen die anderen Analyseverfahren (KBE, qPCR, Sporenzahl); lila – Ausgangsmaterial, gelb – Aerosol direkt nach dem Generator, rot – Filter wässrige Extraktion,

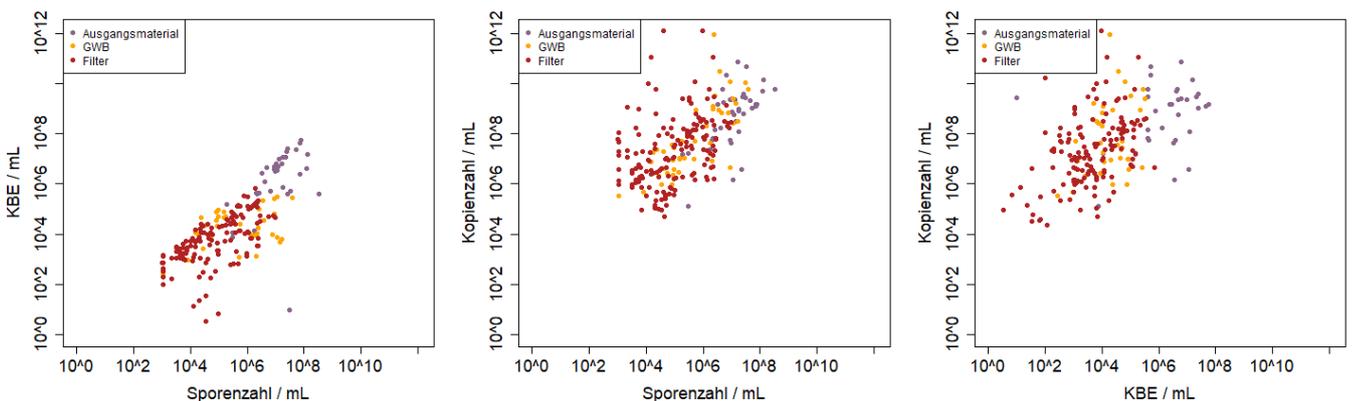


Abbildung 14 – Darstellung der Ergebnisse der Sporenzahl gegen Daten von KBE und qPCR; lila – Ausgangsmaterial, gelb – Aerosol direkt nach dem Generator, rot – Filter wässrige Extraktion,

Die Korrelationen zwischen den Analysemethoden zeigen sehr gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der ELISA und der Sporenzahl für alle Organismen. Die Korrelation zwischen ELISA und qPCR bzw. KBE schwankt

zwischen den Organismen. Bis auf *Wallemia sebi* zeigt die Anzahl der KBE und die Sporenzahl ebenfalls eine gute Übereinstimmung. Aufgrund der Inaktivierung der *Aspergillus fumigatus* Sporen sind für diesen Organismus keine KBE Vergleichsdaten vorhanden.

<i>A.amoenus</i>	CFU	qPCR	ELISA V	ELISA ZA
SC	0,791	0,934	0,812	0,92
CFU		0,76	0,663	0,744
qPCR			0,776	0,937
<i>A.amstelodami</i>	CFU	qPCR	ELISA V	ELISA P
SC	0,834	0,267	0,866	0,874
CFU		0,442	0,911	0,91
qPCR			0,455	0,475
<i>A.fumigatus</i>	CFU	qPCR	ELISA V	ELISA P
SC		0,871	0,909	0,855
CFU				
qPCR			0,965	0,8
<i>C.herbarum</i>	CFU	qPCR	ELISA V	ELISA P
SC	0,833	0,634	0,943	0,958
CFU		0,454	0,832	0,854
qPCR			0,486	0,53
<i>P.chrysogenum</i>	CFU	qPCR	ELISA V	ELISA P
SC	0,622	0,54	0,956	0,961
CFU		0,327	0,576	0,517
qPCR			0,607	0,644
<i>W.sebi</i>	CFU	qPCR	ELISA V	ELISA P
SC	0,097	0,411	0,905	0,907
CFU		0,024	-0,042	-0,049
qPCR			0,477	0,463

Abbildung 15 – Korrelationskoeffizienten nach Spearman (ρ) der Analysevergleiche je Organismus. Für alle vorhandenen Proben wurden die Analysen jeweils miteinander verglichen und der Korrelationskoeffizient berechnet. Die dazugehörigen Grafiken befinden sich im Anhang. Je dunkler grün der Wert eingefärbt ist, desto höher ist der Zusammenhang zwischen den Analysen; ELISA V – wässrige Extraktion mit vortexing; ELISA ZA – ELISA mit Zellaufschluss

Aus den Grafiken und den berechneten linearen Modellen, kann die theoretische Nachweisgrenze der ELISA abgelesen werden. Diese liegt zwischen ca. 10^2 bis ca 10^6 Sporen/mL.

- *A. amoenus* – ca. 10^4 Sporen / mL
- *A. amstelodami* – ca. 10^2 Sporen / mL
- *A. fumigatus* – ca. 10^6 Sporen / mL
- *C. herbarum* – ca. 10^3 Sporen / mL
- *P. chrysogenum* – ca. 10^4 Sporen / mL
- *W. sebi* – ca. 10^3 Sporen / mL

Vergleich von zwei spezifischen *Aspergillus versicolor* ELISA

Da im komplementären Projekt „AntigenSampling“ ebenfalls mit dem Testorganismus *Aspergillus amoenus* gearbeitet wurde, ergab sich die Möglichkeit einen Teil der Proben mit zwei ELISA zu messen und die Ergebnisse zu vergleichen. Der in diesem Projekt vorgestellte *Aspergillus versicolor* ELISA des IPA wurde mit dem in AntigenSampling eingesetzt AVeX von Indoor Biotechnologies verglichen. Für diese Proben wurde von den Suspensionen des Ausgangsmaterials und der Filterproben jeweils ein weiteres 1 mL Aliquot entnommen, tiefgefroren und an das BMA Labor versandt. Es handelt sich daher um die gleichen Proben für beide ELISA. Die Extraktion erfolgte ohne Zellaufschluss.

Die Ergebnisse für die Proben von *Aspergillus amoenus*, Abbildung 16, zeigen keinen deutlichen Zusammenhang der beiden ELISA zu einander. Die Ergebnisse des IPA ELISA steigen mit höherer Sporenzahl an, wobei der AVeX nicht mit der Sporenzahl korreliert.

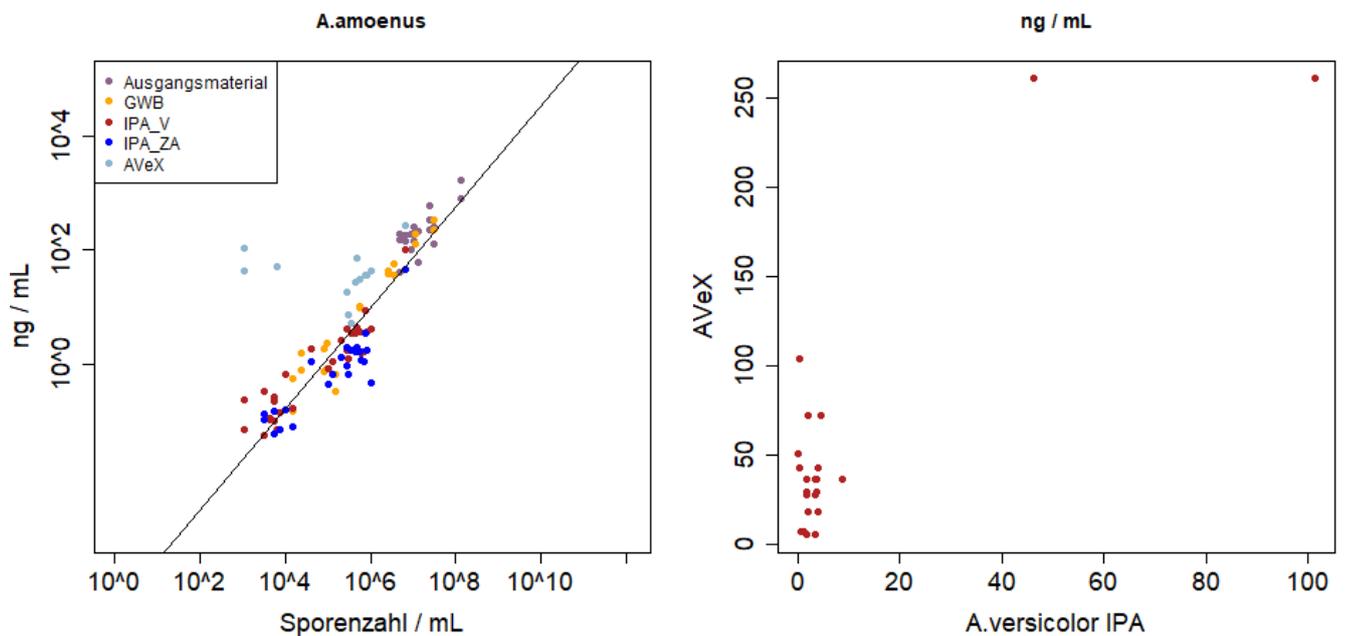


Abbildung 16 – Vergleich des spezifischen *Aspergillus versicolor* ELISA des IPA und dem AVeX (Indoor Biotechnologies). Links - Darstellung der ELISA Ergebnisse gegen die Sporenzahl; rot – IPA ELISA wässrige Extraktion (vortex), blau – IPA ELISA Extraktion mit Zellaufschluss, hellblau – AVeX, wässrige Extraktion. Rechts – IPA ELISA gegen AVeX

Analyse der Mischproben

Neben den Proben mit einzelnen Organismen wurden auch Versuche in der Bioaerosolkammer mit einem Mix aus fünf verschiedenen Pilzen durchgeführt. Neben diesen Proben mit bekannten Organismen, wurden im komplementären Projekt „AntigenSampling“ Proben in Betrieben genommen. Diese Proben wurden ebenfalls mit allen vorhandenen Analysemethoden und auch den pilzspezifischen ELISA des IPA analysiert.

Kontrollierte Proben der Bioaerosolkammer

Für die Mischproben wurde eine Konzentration mit dem Flüssigdispergierer LSA und drei Konzentrationen aus Staub hergestellt.

Bei der Erstellung von flüssigem Material ist es möglich vor dem Mischen für jeden Organismus die Sporenzahl zu bestimmen und ein Aliquot auszuplattieren um die Keimrate festzustellen. Die Sporenzahl kann dann für jeden Organismus auf die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

Ausgangsmaterial

Für die Mischung des Staubs wurde die Anzahl der Sporen pro Milligramm Staub für jeden Organismus bestimmt. Die Mischung des Staubes wurde dann durch Wägung der einzelnen Komponenten hergestellt.

In Tabelle 8 sind die Mischungsverhältnisse für das flüssige Material und den Staub angegeben. Der Anteil der Organismen wurde so gewählt, dass trotz der unterschiedlichen Sporengrößen und Sensitivitäten der ELISA messbare Konzentrationen für alle Organismen erzielt werden.

Tabelle 8 – Mischungsverhältnisse der Testorganismen im Ausgangsmaterial für Mix-Versuche - Angaben als Anteil der Sporenzahl; sowie die Sporenzahl pro mg Staub der einzelnen Organismen

Versuche	<i>A. amoenus</i>	<i>A. amstelodami</i>	<i>C. herbarum</i>	<i>P. chrysogenum</i>	<i>W. sebi</i>
Flüssig 1 2021-08-25	34,7 %	0,7 %	0,7 %	55,9 %	8 %
Flüssig 2 2021-09-08	33,7 %	0,5 %	0,5 %	59,9	5,4 %
Staub 2021-09-09 2021-09-10	43 %	1,7 %	6,6 %	20,1 %	28,8 %
Sporen/mg	$5,1 \times 10^{10}$	$8,9 \times 10^8$	$3,1 \times 10^9$	$3,8 \times 10^{10}$	$1,8 \times 10^{10}$

Wie bereits für die einzelnen Testorganismen wurde ebenfalls für den Mix das Ausgangsmaterial analysiert. Für die Suspensionen (2021-08-25, 2021-09-08) waren die Konzentrationen der einzelnen Sporen zu gering um eine Unterscheidung im Mikroskop (Sporenzahl) zu ermöglichen. Der Staub wurde am 9. September für beide Versuchstage vorbereitet und nach dem Füllen des Aerosolgenerators gleich belassen. Für den Staub konnte bei der Sporenzählung, 2021-09-09, eine Unterscheidung von *Aspergillus amstelodami* und *Cladosporium herbarum* zu den anderen Organismen getroffen werden.

Die Analyse mittels ELISA und qPCR ermöglicht den Einsatz von spezifischen Assays. Für die Gattung *Aspergillus* ist ein gemeinsamer Primer publiziert, deshalb konnte mit qPCR nicht zwischen *A. amoenus* und *A. amstelodami* unterschieden werden. Weiterhin sind die Kopiezahl für die *Cladosporium* qPCR sehr hoch. Die Verhältnisse der Kopiezahl zwischen *Cladosporium*, *Aspergillus* und *Penicillium* sind nicht übereinstimmend mit den pilzspezifischen ELISA.

Die Ergebnisse der ELISA passen am besten mit den Ergebnissen der Koloniezahlen zusammen.

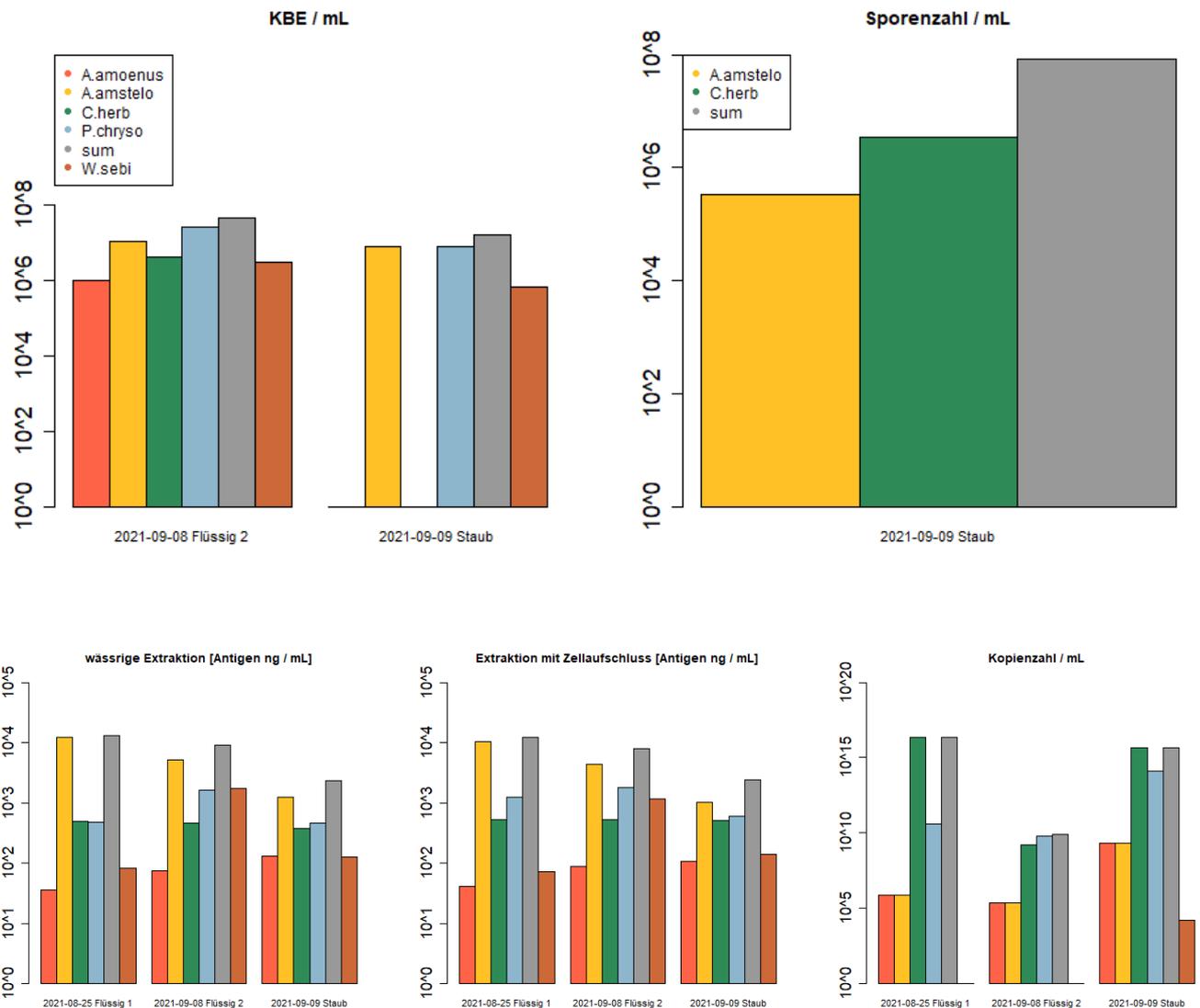


Abbildung 17 – Darstellung der Verhältnisse der Testorganismen in gemischten Ausgangsmaterial für die verschiedenen Analysemethoden.

Filterproben

Neben dem Ausgangsmaterial wurden ebenfalls Ergebnisse der Analysen für die Filterproben verglichen. Die Betrachtung der spezifischen ELISA im Vergleich zur Sporenzahl zeigt, Abbildung 18, dass es sehr gut gelungen ist für alle Konzentrationen ausreichend Material für alle Assays bereitzustellen. Nur in den geringen Konzentrationen sind keine Daten für *Aspergillus amoenus* vorhanden. Wie aus den Daten der Einzelorganismen erwartet, kam es trotz eines hohen Sporenteils von *Aspergillus amoenus* zu geringen Ergebnissen im Antigengehalt. Das galt umgekehrt für *Wallemia sebi* mit einer geringen Sporenkonzentration und hohem nachgewiesenen Antigengehalt.

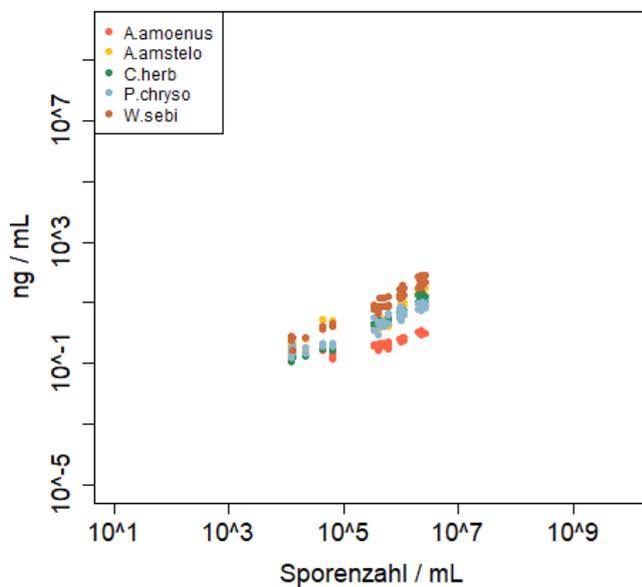


Abbildung 18 – Vergleich der spezifischen ELISA mit der gesamten Sporenzahl der Probe. Die Sporen sind nicht bezüglich Testorganismus eingeteilt.

Für die hohen Konzentrationen konnte bei der Sporenzählung der Filterproben zwischen *A. amstelodami*, *C. herbarum* und der Summe der anderen Organismen unterschieden werden, Abbildung 19 a. Eine Zunahme, vor allem der anderen Organismen, mit höherer Konzentration ist zwar erkennbar, aber die Streuung der Werte ist sehr stark. Bei der Interpretation ist zu beachten, dass die Sporenkonzentration von *A. amstelodami* und *C. herbarum* sehr gering war und sich damit der gesamte Zählfehler erhöht.

Die ELISA wurden ebenfalls mit den KBE verglichen, Abbildung 19 b, die den jeweiligen Testorganismen zugeteilt wurden. Hier zeigt sich ein besserer Zusammenhang und die Konzentration an spezifischen Pilzproteinen nimmt mit der Zahl der Kolonien zu.

Der Vergleich der ELISA Ergebnisse mit den Ergebnissen der qPCR, Abbildung 19 c, zeigt für die jeweiligen Pilze, außer *Wallemia sebi*, einen guten Zusammenhang. Durch den starken Unterschied der berechneten Kopiezahlen je Organismus kommt es zur Verzerrung der Punktwolken. Besonders für *Penicillium chrysogenum* und *Cladosporium herbarum* ist ein linearer Anstieg deutlich ersichtlicher.

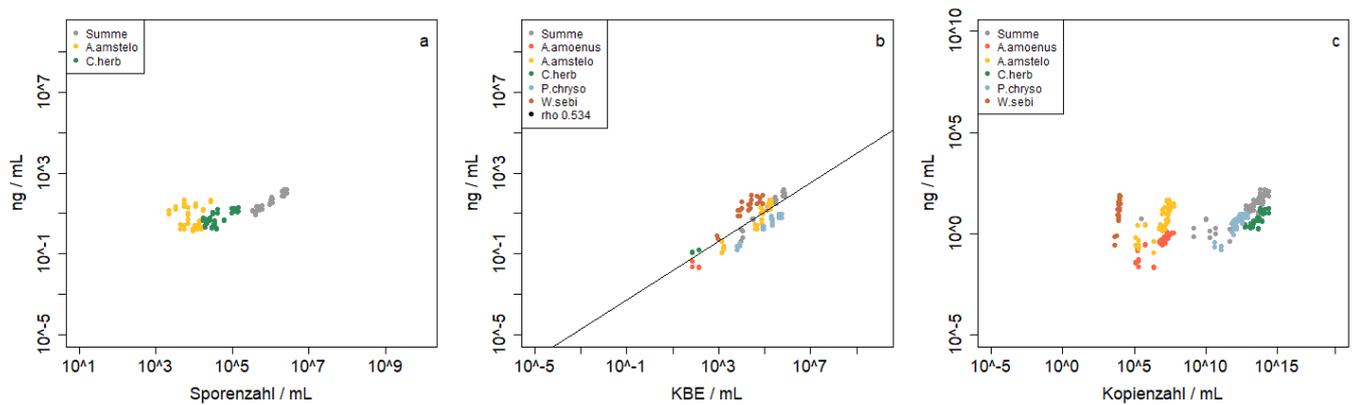


Abbildung 19 – Vergleich spezifische ELISA mit den anderen Nachweismethoden mit Organismenzuordnung; dargestellt sind nur jene Werte für die eine Einteilung bezüglich Testorganismus möglich war; a – Sporenzählung vs. ELISA; b – Koloniebildende Einheiten vs. ELISA; c – Kopienzahl (qPCR) vs. ELISA

Betriebsproben

Im komplementären Projekt „AntigenSampling“ sind Messungen in Betrieben in Österreich durchgeführt worden. Diese Proben wurden ebenfalls vom IPA mit den spezifischen ELISA vermessen. Eine Zählung der Sporen in diesen Proben war aufgrund der hohen Belastung mit anderen Aerosolen (z.B. Glasstaub) nicht möglich. Koloniebildende Einheiten wurden als Gesamtzahl bestimmt und in Leitorganismen eingeteilt, daher steht nur ein Summenparameter zum Vergleich mit den ELISA Ergebnissen zur Verfügung. Für die qPCR wurden spezifische Assays für *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* und Basidiomycota verwendet.

Die Ergebnisse der ELISA, Abbildung 20, zeigen eine sehr geringe Konzentration an Pilzantigenen in den Betriebsproben. Bei einer KBE-Konzentration zwischen 10^3 und 10^5 pro mL sind die meisten ELISA an ihrer Nachweisgrenze. Die Ergebnisse der qPCR zeigen wie schon bei den Proben aus der Bioaerosolkammer hohe Unterschiede in den Kopienzahlen je nach Organismus. Ein leichter Zusammenhang ist zwischen der Summe der ELISA und der Summe der Kopienzahlen zu erkennen. Ebenfalls für die Gattung *Penicillium*, die auch als Leitorganismus in den Betrieben festgestellt werden konnte, ist die Korrelation zwischen den Methoden besser als für *Aspergillus* oder *Wallemia*.

Mit einer Zunahme der Kolonie- und Kopienzahl sind auch die Ergebnisse des Antigengehalts gestiegen.

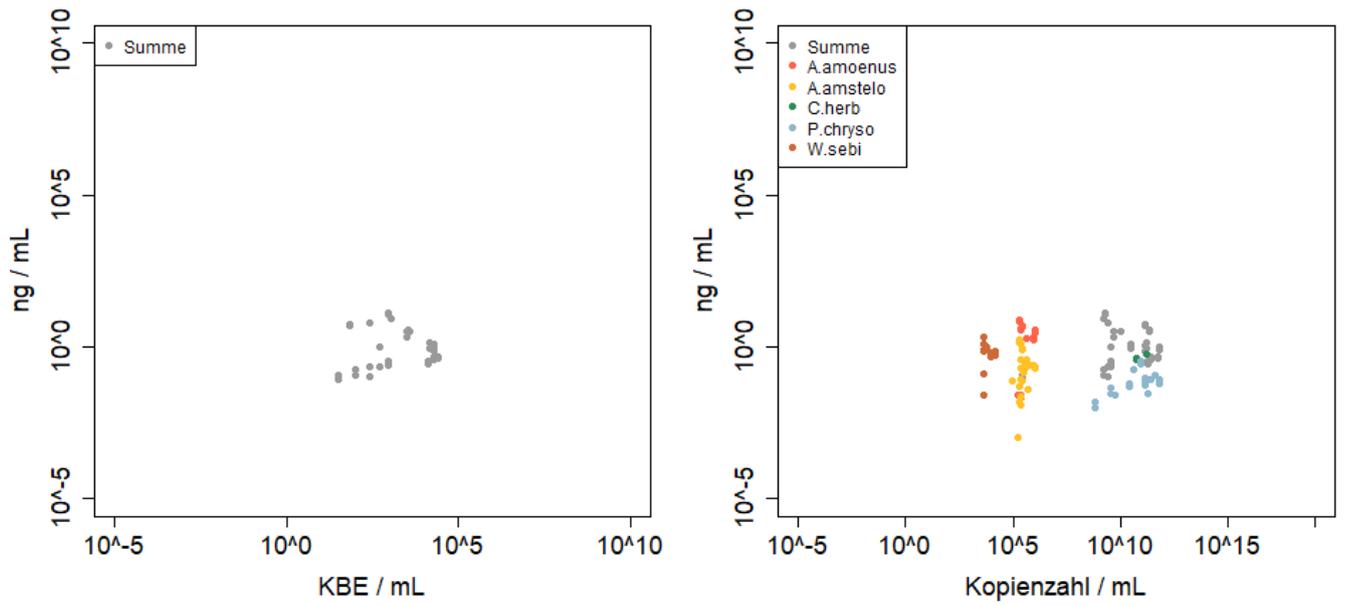


Abbildung 20 – Vergleich spezifische ELISA mit koloniebildenden Einheiten und der Genom-Kopienzahl für Proben aus zwei Betrieben. Aufgrund der Konzentration von anderen Aerosolen war keine Sporenzählung möglich. Koloniebildende Einheiten wurden nur als Gesamtzahl bestimmt. Für qPCR wurden spezifische Assays (ASP, CLA, PEN, Basid) verwendet und den Testorganismen zugeteilt.

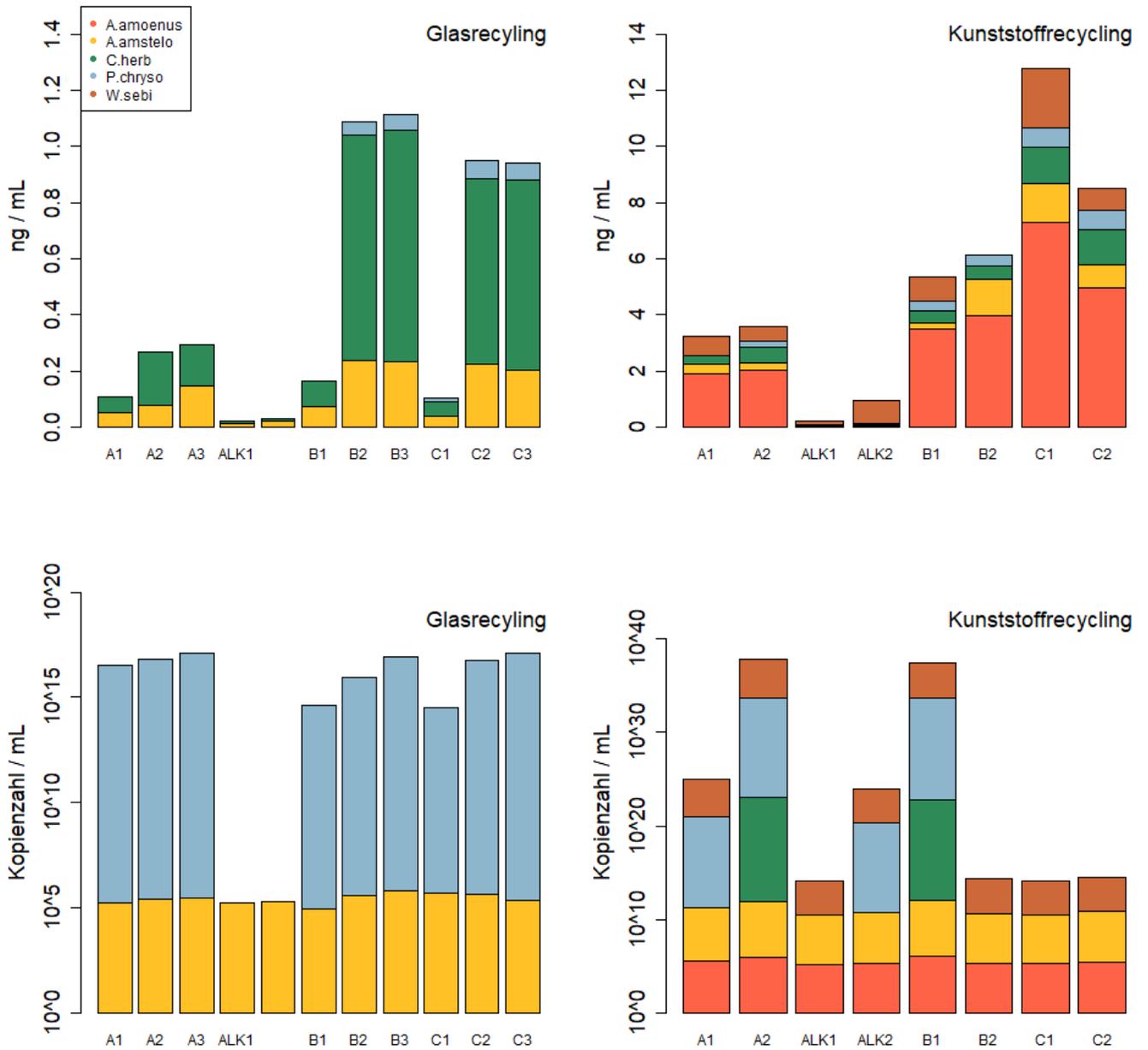


Abbildung 21 – Ergebnisse der spezifischen ELISA und qPCR Assays für die Betriebsproben, Ergebnisse in ng / mL (oben) bzw. logarithmierte Kopienzahl / mL (unten); Farben entsprechen den verschiedenen Testorganismen (siehe Legende links oben)
 ALK – Außenluftkontrolle; A, B, C – verschiedene Sammelpositionen im Betrieb; 1, 2, 3 - Sammelwiederholungen

Veröffentlichungen der Ergebnisse

Zu Beginn des Projektes wurde die Zielsetzung und die Projektpläne von AntigenSampling und SchimmelAntigenDetect gemeinsam mit den ersten Ergebnissen beim Biostoffseminar des IFA der DGUV vorgestellt – 2019-12-04, Dresden.

In einer Posterpräsentation beim BOKU DocDay 2021 – 2021-11-04, Tulln – wurden bisherige erzielte Ergebnisse der beiden Projekte vorgestellt.

Die vorläufigen Ergebnisse der beiden Projekte wurden beim Biostoffseminar des IFA der DGUV 2021 vorgestellt – 2021-12-08/09, St. Augustin.

Es ist geplant, nach der Abnahme des Endberichtes durch die DGUV, die hier dargestellten Ergebnisse in einer gemeinsamen Publikation von AIT und dem IPA in einem internationalen, peer-review Journal zu veröffentlichen.

Schutzrechte

Da es sich bei den verwendeten Verfahren um bereits publizierte Analysen, Protokolle und Arbeitsabläufe handelt, ist kein Schutz beantragt oder geplant.

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

Den Autoren sind keine Arbeiten bekannt, in denen neue ELISA für die Detektion von Bioaerosolen publiziert wurden. Auch sind keine Studien veröffentlicht worden, in denen solche ELISA mit anderen Methoden verglichen werden.

Von der Firma Indoor Biotechnologies werden ELISA für die Detektion von Pilzantigenen Vertrieben. Seit Projektbeginn hat sich die Palette auf zwei Pilzantigene (Alt a1, Asp f1) reduziert.

Es wurden in der Projektlaufzeit verschiedene Studien und Reviews zu gesundheitlichen Auswirkungen von Pilzen, Detektionsmethoden im menschlichen Gewebe / Proben und zu qPCR Detektionsmechanismen veröffentlicht.

Verschiedene Studien haben sich seit Projektbeginn 2019 weiter mit der gesundheitlichen Auswirkung von Pilzen in der Atemluft und der Entwicklung von Allergien beschäftigt.

D'Amato G, Chong-Neto HJ, Monge Ortega OP, Vitale C, Ansotegui I, Rosario N, Haahtela T, Galan C, Pawankar R, Murrieta-Aguttes M, Cecchi L, Bergmann C, Ridolo E, Ramon G, Gonzalez Diaz S, D'Amato M, Annesi-Maesano I. The effects of climate change on respiratory allergy and asthma induced by pollen and mold allergens. *Allergy*. 2020 Sep;75(9):2219-2228. doi: 10.1111/all.14476. Epub 2020 Aug 5. PMID: 32589303.

Murrison LB, Brandt EB, Myers JB, Hershey GKK. Environmental exposures and mechanisms in allergy and asthma development. *J Clin Invest*. 2019 Apr 1;129(4):1504-1515. doi: 10.1172/JCI124612. Epub 2019 Feb 11. PMID: 30741719; PMCID: PMC6436881.

Agarwal R, Sehgal IS, Dhooira S, Muthu V, Prasad KT, Bal A, Aggarwal AN, Chakrabarti A. Allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Indian J Med Res*. 2020 Jun;151(6):529-549. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1187_19. PMID: 32719226; PMCID: PMC7602921.

Schuler Iv CF, Montejó JM. Allergic Rhinitis in Children and Adolescents. *Pediatr Clin North Am*. 2019 Oct;66(5):981-993. doi: 10.1016/j.pcl.2019.06.004. Epub 2019 Aug 5. PMID: 31466686.

Neue Detektionsmethoden um die Verursacher für Erkrankungen in Patienten zu finden wurden publiziert. Teilweise wurden dafür auch ELISA eingesetzt.

Gu W, Deng X, Lee M, Sucu YD, Arevalo S, Stryke D, Federman S, Gopez A, Reyes K, Zorn K, Sample H, Yu G, Ishpuniani G, Briggs B, Chow ED, Berger A, Wilson MR, Wang C, Hsu E, Miller S, DeRisi JL, Chiu CY. Rapid pathogen detection by metagenomic next-generation sequencing of infected body fluids. *Nat Med*. 2021 Jan;27(1):115-124. doi: 10.1038/s41591-020-1105-z. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33169017.

Peng T, Zong Y, Johnson MD, Menghani SV, Lewis ML, Galgiani JN. A quantitative enzyme-linked immunoassay (ELISA) to approximate complement-fixing antibody titers in serum from patients with coccidioidomycosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021 Jan;99(1):115198. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115198. Epub 2020 Sep 4. PMID: 32987245.

Martin-Souto L, Buldain I, Areitio M, Aparicio-Fernandez L, Antoran A, Bouchara JP, Martin-Gomez MT, Rementeria A, Hernando FL, Ramirez-Garcia A. ELISA Test for the Serological Detection of *Scedosporium/Lomentospora* in Cystic Fibrosis Patients. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 26;10:602089. doi: 10.3389/fcimb.2020.602089. PMID: 33324582; PMCID: PMC7726441.

Für die Quantifizierung von Pilzen in der Luft, wurden neue qPCR Assays entwickelt, getestet und publiziert.

Géry A, Delanoë A, Heutte N, Chosson E, Bonhomme J, Garon D. A novel qPCR based-method for detection and quantification of three recurrent species of *Penicillium* isolated from bioaerosols in mold-damaged homes. *J Microbiol Methods*. 2021 Jul;186:106236. doi: 10.1016/j.mimet.2021.106236. Epub 2021.

Maza-Márquez P, Aranda E, González-López J, Rodelas B. Evaluation of the Abundance of Fungi in Wastewater Treatment Plants Using Quantitative PCR (qPCR). *Methods Mol Biol*. 2020;2065:79-94. doi: 10.1007/978-1-4939-9833-3_7. PMID: 31578689.

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

Die Herstellung von kontrollierten Probenmaterial mit einzelnen Organismen und einem Mix aus fünf Organismen konnte in dem vorliegenden Projekt erreicht werden und die parallel gesammelten Filter zeigten guten Übereinstimmung für den Antigengehalt, die Sporenzahl und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten.

Der umfassende Vergleich der Extraktion von Proben für die ELISA Analyse mit und ohne Zellaufschluss, zeigte nur leichte Unterschiede zwischen den beiden Methoden, abhängig von dem verwendeten Testorganismus. Diese Daten decken sich teilweise mit den Ergebnissen der Vorversuche in denen, Unterschiede je nach Organismus ersichtlich waren. Die Empfehlung der Autoren lautet daher, einen Zellaufschluss nur dann durchzuführen, wenn sich daraus Synergien mit anderen Nachweisverfahren ergeben. Da in dem vorliegenden Projekt ELISA zur Bestimmung des Gesamt-Antigengehalts von spezifischen Pilzen eingesetzt wurden, könnte der Nachweis von spezifischen Proteinen (Antigene oder Allergene) jedoch auch von einem Aufschluss beeinflusst sein. Dies wäre zum Beispiel der Fall, wenn es sich um intrazelluläre Proteine handelt, die nicht durch das wässrige Milieu aus der Spore ausgeschleust werden.

Die Vergleiche der Analyseverfahren untereinander zeigten sehr gute Übereinstimmung zwischen den pilzspezifischen ELISA und der Sporenzahl der Organismen, sowie der Zahl der koloniebildenden Einheiten. Die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der molekularbiologischen Untersuchung war am geringsten. Diese Methode zeigte in der vorliegenden Studie generell die höchsten Variationen, was bereits im Vergleich der Filterduplikate ersichtlich wird. Da sich der molekularbiologische Nachweis aus verschiedenen Verfahren – Verarbeitung der Filterextrakte, DNA Aufschluss und Extraktion, sowie qPCR – zusammensetzt, kann diese Varianz eine Summe aus verschiedenen Fehlerquellen darstellen. Für die in dieser Studie verwendete Kombination an Verfahren ist es am wahrscheinlichsten, dass die Verarbeitung (Gefriertrocknung) sowie die anschließende Extraktion in einem Hochdurchsatzverfahren, ausschlaggebend für die Varianz ist. Eine höhere Varianz als z.B. bei den ELISA zeigt sich jedoch auch bei der Betrachtung der relativen Standardabweichungen der qPCR Ergebnisse (Messwiederholungen) selbst.

Für die verschiedenen ELISA zeigten sich unterschiedliche Sensitivitäten und Nachweisgrenzen zwischen 10^2 bis 10^5 Sporen / mL. Bezüglich der Detektionsgrenze gibt es Vorteile der Bestimmung der Kolonienzahl und des qPCR Assays FungiQuant gegenüber den ELISA. Bei den koloniebildenden Einheiten spielt jedoch die Keimrate eine wesentliche Rolle. Bei Proben, in denen ein hoher Anteil der Sporen nicht keimfähig ist, können auch keine Kolonien erkannt werden. Da bei Umwelt- und Arbeitsplatzproben die Keimrate nicht bekannt ist, kann es hier potentiell zu einer sehr starken Fehleinschätzung kommen. Die Bestimmung der Genom-Kopienzahl mittels qPCR und FungiQuant ist zwar unabhängig von der Lebensfähigkeit der Pilzzellen, hat aber den Nachteil, dass nicht zwischen Organismen unterschieden werden kann. Hier kann also nur ein Gesamtwert ausgegeben werden.

Die spezifischen qPCR Assays haben wiederum eine geringere Sensitivität und starke Unterschiede in den Ergebnissen der Genom-Kopienzahlen im Verhältnis zur Sporenzahl. Sie eignen sich gut um festzustellen, welche Organismen vorhanden sind, aber nicht alle Assays sind, anhand der hier präsentierten Ergebnisse, für eine Quantifizierung mit der Sporenzahl vergleichbar.

Die Sporenzählung selbst, stellt unter kontrollierten Bedingungen und auch bei Umweltproben mit geringer Aerosolbelastung eine gute Methode zur Bestimmung der Gesamtsporenzahl dar. Durch die sehr ähnliche Sporenmorphologie von vielen Schimmelpilzen ist jedoch eine Unterscheidung in, für gesundheitliche Aspekte, relevante Taxa nur durch entsprechend spezialisiertes Personal auf einer höheren taxonomischen Ebene möglich. Genaue Bestimmungen benötigen selektives Kultivieren und mikroskopieren von koloniebildenden Einheiten. Bei

Arbeitsplatzproben kann zusätzlich eine hohe Hintergrundbelastung mit anderen Aerosolen eine Sporenzählung erschweren oder unmöglich machen.

In den Proben vom Glasrecycling Betrieb, waren die Ergebnisse der ELISA nur knapp über der Nachweisgrenze. In den Koloniezahlen konnte die Gattung *Penicillium* als Leitorganismus festgestellt werden. Im spezifischen ELISA für *Penicillium chrysogenum* konnten jedoch keine hohen Werte gemessen werden. Das kann einerseits an der geringeren Sensitivität dieses ELISA liegen, andererseits kann eine andere *Penicillium* Art an dem Standort vorherrschend sein. Die Dominanz von *Penicillium* konnte bei diesen Proben mittels spezifischem qPCR Assay bestätigt werden.

Im Kunststoffrecycling Betrieb herrschte eine starke Dominanz von *Aspergillus* vor. Mit den spezifischen ELISA des IPA konnte zwischen *Aspergillus amoenus* und *Aspergillus amstelodami* unterschieden werden. Die Ergebnisse der qPCR zeigen ebenfalls hohe Zahlen von *Aspergillus*, es war aber keine weitere Unterscheidung möglich. Die Quantifizierung der Belastung war in den vorliegenden qPCR Daten nicht übereinstimmend mit den Werten der KBE und der ELISA. Dies könnte auf die Extraktion der DNA zurückzuführen sein, die in einem Format durchgeführt wurde, in der 96 Proben gleichzeitig verarbeitet werden. Obwohl die Methode in vorherigen Vorversuchen vielversprechend erschien, scheint diese die Daten nochmals zu verzerren. Wie bereits in unseren früheren Arbeiten analysiert, spielt die DNA Extraktion bei der Quantifizierung mittels PCR eine entscheidende Rolle und in verschiedenen Schritten kann Material verloren gehen (Unterwurzacher et al. 2018). Der Umstand, dass für die hier getesteten pilzspezifischen ELISA kein Zellaufschluss nötig ist, stellt einen deutlichen Vorteil dar, da damit eine Quelle des Materialverlusts vermieden wird.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die vom IPA entwickelten, pilzspezifischen ELISA eine sehr gute Ergänzung zu klassischen Methoden darstellen und ein Einsatz bei Messungen an Arbeitsplätzen befürwortet wird, allerdings mit der Einschränkung einer relativ hohen Nachweisgrenze für einige Pilzspezies und damit geringeren Sensitivität. Die Kombination mit routinemäßigen durchgeführten, sensitiven Methoden, wie z.B. der Erfassung koloniebildender Einheiten, würde eine große analytische Breite abdecken und die Spezifität der Daten und damit die Aussagekraft der Analyse erhöhen.

In weiterer Folge, nach Abschluss der Versuche wäre es sicherlich interessant, weitere Matrixeffekte (z.B. durch Staub) zu untersuchen. Diese Versuche müssten in einem Nachfolgeprojekt eingeplant werden.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die getesteten ELISA, werden von dem IPA zu Forschungszwecken bereits eingesetzt. Generell ist ein Einsatz in der Arbeitsplatzmessung zu befürworten, die hier durchgeführten Tests auf Sensitivität und Spezifität sind dabei aber zu berücksichtigen. Die Kosten der ELISA Messungen im Vergleich zu Kultivierungsmethoden, sowie die Sensitivität und Spezifität der Verfahren, werden im Einzelfall über den Einsatz der verschiedenen Nachweismethoden entscheiden.

Literatur

- Alsved, Malin, Lydia Bourouiba, Caroline Duchaine, Jakob Löndahl, Linsey C. Marr, Simon T. Parker, Aaron J. Prussin II, and Richard J. Thomas. 2020. "Natural Sources and Experimental Generation of Bioaerosols : Challenges and Perspectives." *Aerosol Science and Technology* 54(5):547–71.
- Bogart, H. G. G. Van Den, G. Van Den Ende, P. C. C. Van Loon, and L. J. L. D. Van Griensven. 1993. "Mushroom Worker ' s Lung : Serologic Reactions to Thermophilic Actinomycetes Present in the Air of Compost Tunnels." *Mycopathologia* 122:21–22.
- Dellinger, Lorenz. 2020. "Bioaerosol Generators- Characteristics , Impact on Organisms and Areas of Application."
- Douwes, J., P. Thorne, N. Pearce, and D. Heederik. 2003. "Bioaerosol Health Effects and Exposure Assessment : Progress and Prospects." *Annals of Occupational Hygiene* 47(3):187–200.
- Goebes, Marian D., Lynn M. Hildemann, Elmira Kujundzic, and Mark Hernandez. 2007. "Real-Time PCR for Detection of the Aspergillus Genus." *Journal of Environmental Monitoring* 9:599–609.
- Gutarowska, Beata, Justyna Skóra, Łukasz Stępień, Bogumiła Szponar, Anna Otlewska, and Katarzyna Pielech-Przybylska. 2015. "Assessment of Microbial Contamination within Working Environments of Different Types of Composting Plants." *Journal of the Air & Waste Management Association* 65(4):466–78.
- Van Kampen, Vera, Ingrid Sander, Verena Liebers, Anja Deckert, Heinz Dieter Neumann, Martin Buxtrup, Eckart Willer, Christian Felten, Udo Jäckel, Kerstin Klug, Tomas Brüning, Monika Raulf, and Jürgen Bünger. 2014. "Concentration of Bioaerosols in Composting Plants Using Different Quantification Methods." *Annals of Occupational Hygiene* 58(6):693–706.
- Konlechner, Anja, Sabine Goller, Markus Gorfer, Leander Mölter, and Joseph Strauss. 2013. "Konlechner et Al (2013)EMA_005_GrDL_Evaluierung Einer Prüfkammer Für Bioaerosolsammelsysteme_73_2013.Pdf." *Gefahrstoffe - Reinhaltung Der Luft* 73(11/12):471–76.
- Liu, Cindy M., Sergey Kachur, Michael G. Dwan, Alison G. Abraham, Maliha Aziz, Po-Ren Hsueh, Yu-Tsung Huang, Joseph D. Busch, Louis J. Lamit, Catherine A. Gehring, Paul Keim, and Lance B. Price. 2012. "FungiQuant: A Broad-Coverage Fungal Quantitative Real-Time PCR Assay." *BMC Microbiology* 12(1):255.
- Lynch, Michael D. J. and R. Greg Thorn. 2006. "Diversity of Basidiomycetes in Michigan Agricultural Soils ☐." *Applied and Environmental Microbiology* 72(11):7050–56.
- Marple, Virgil A. 2004. *History of Impactors—The First 110 Years*. Vol. 38.
- Méheust, Delphine, Pierre Le Cann, Tiina Reponen, Jennie Wakefield, Stephen Vesper, and Jean Pierre Gangneux. 2013. "Possible Application of the Environmental Relative Moldiness Index in France: A Pilot Study in Brittany." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216(3):333–40.
- Neumann, H. D., M. Buxtrup, V. Liebers, M. Raulf, and I. Sander. 2015. "Staub- , Endotoxin- Und Antigenkonzentrationen Bei Der Abfallsammlung." *Gefahrstoffe - Reinhaltung Der Luft* 75(7):275–84.
- Pepys, J., P. A. Jenkins, G. N. Festenstein, P. H. Gregory, M. E. Lacey, and F. A. Skinner. 1990. "Farmer's Lung: Thermophilic Actinomycetes as a Source of 'Farmer's Lung Hay' Antigen." *Allergy Proc* 11(2):101–2, discussion 97–99.
- Pogner, Clara, Markus Gorfer, and Annette Kolk. 2020. "Evaluierung von Endotoxin Proben - Vergleich von Analysen Sowie Transport- Und Lagerungsbedingungen Durch Standardisierte Proben." *Gefahrstoffe - Reinhaltung Der Luft* 80(9):335–41.
- Pogner, Clara, Anja Konlechner, Verena Unterwurzacher, Annette Kolk, Manfred Hinker, Leander Mölter, Joseph Strauss, Markus Gorfer, and Sabine Strauss-Goller. 2019. "A Novel Laminar-Flow-Based Bioaerosol Test System to Determine Biological Sampling Efficiencies of Bioaerosol Samplers." *Aerosol Science and*

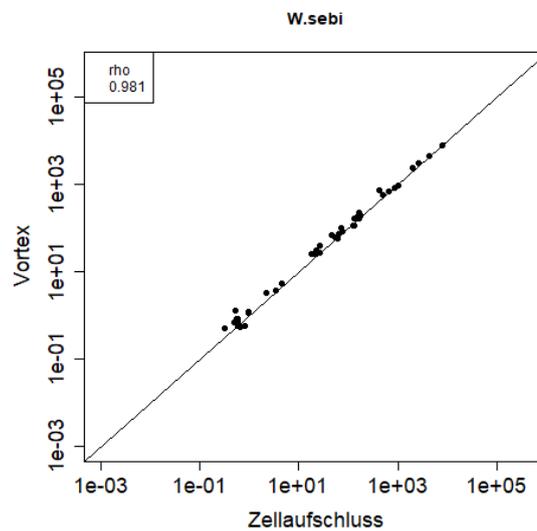
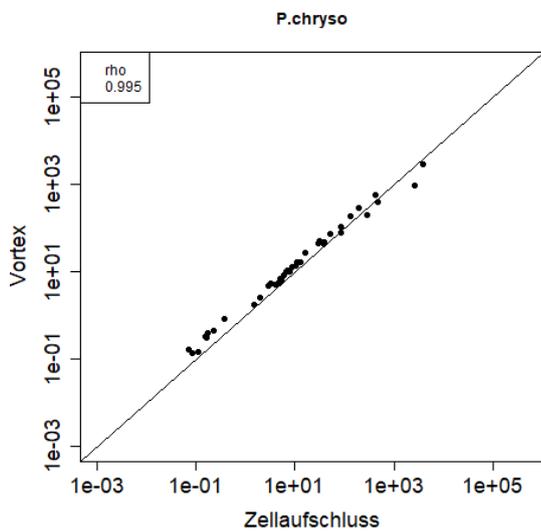
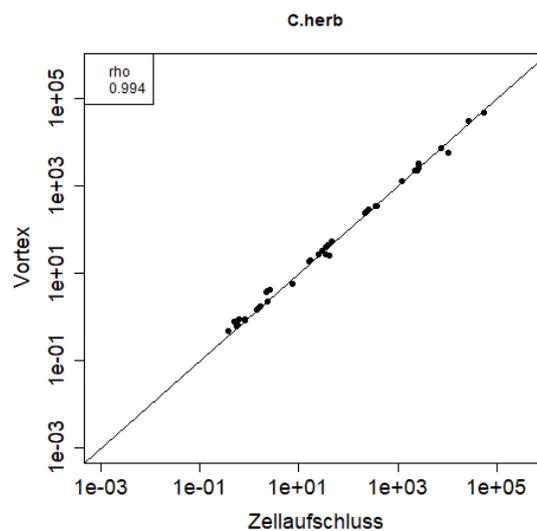
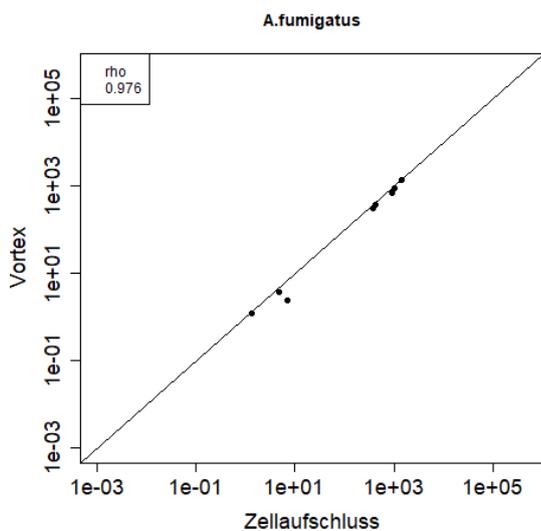
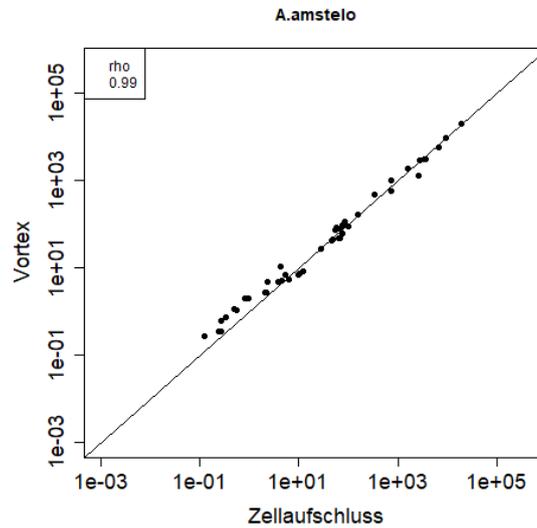
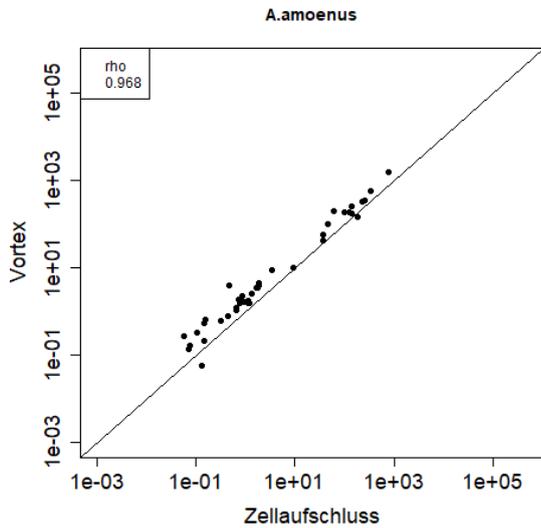
Technology 53(4):355–70.

- Poulsen, O. M., N. O. Breum, N. Ebbehøj, A. M. Hansen, U. I. Ivens, D. van Lelieveld, P. Malmros, L. Matthiassen, B. H. Nielsen, and E. M. Nielsen. 1995. "Sorting and Recycling of Domestic Waste. Review of Occupational Health Problems and Their Possible Causes." *The Science of the Total Environment* 168(1):33–56.
- Raulf-Heimsoth, Monika, Vera Van Kampen, Sabine Kespohl, Ingrid Sander, R. Merget, and Thomas Brüning. 2012. "Inhalationsallergien Am Arbeitsplatz - Aktuelle Entwicklungen." *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 55(November 2018):363–72.
- Raulf, Monika, Ingrid Sander, E. Zahradnik, V. Liebers, and T. Brüning. 2014. "Inhalationsallergien Am Arbeitsplatz : Bedeutung , Diagnostik Und Prävention." *ASU Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin* 49:284–92.
- Reboux, Gabriel, Renaud Piarroux, Frédéric Mauny, Anne Madroszyk, Laurence Millon, Karine Bardonnnet, and Jean-charles Dalphin. 2001. "Role of Molds in Farmer ' s Lung Disease in Eastern France." *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163:1534–39.
- Sander, Ingrid, Eva Zahradnik, Vera Van Kampen, Sabine Kespohl, Heike Stubel, Guido Fischer, Thomas Brning, Jrgen Bnger, and Monika Raulf-Heimsoth. 2012. "Development and Application of Mold Antigen-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (Elisa) to Quantify Airborne Antigen Exposure." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues* 75(19–20):1185–93.
- Schröder, Bianca, Klaus Klus, and Ute Stephan. 2017. "Schimmelpilze in Archiven - Konzentrationen Und Arten in Der Raumluft Im Jahresverlauf." *Gefahrstoffe - Reinhaltung Der Luft* 77(6):237–48.
- Soler, Zachary M. and Rodney J. Schlosser. 2012. "The Role of Fungi in Diseases of the Nose and Sinuses." *American Journal of Rhinology and Allergy* 26(5):351–58.
- Unterwurzacher, Verena, Clara Pogner, Harald Berger, Joseph Strauss, Sabine Strauss-Goller, and Markus Gorfer. 2018. "Validation of a Quantitative PCR Based Detection System for Indoor Mold Exposure Assessment in Bioaerosols." *Environmental Science Processes & Impacts* 20:1454–68.
- Zahradnik, Eva, Sabine Kespohl, Ingrid Sander, Ursula Schies, Janett Khosravie-Hohn, Wolfgang Lorenz, Steffen Engelhart, Annette Kolk, Gerd Schneider, Thomas Brüning, and Monika Raulf-Heimsoth. 2013. "A New Immunoassay to Quantify Fungal Antigens from the Indoor Mould *Aspergillus Versicolor*." *Environmental Science Processes & Impacts* 15(6):1162–71.

Zusätzliche Daten

Korrelationen der Extraktionsmethoden je Organismus

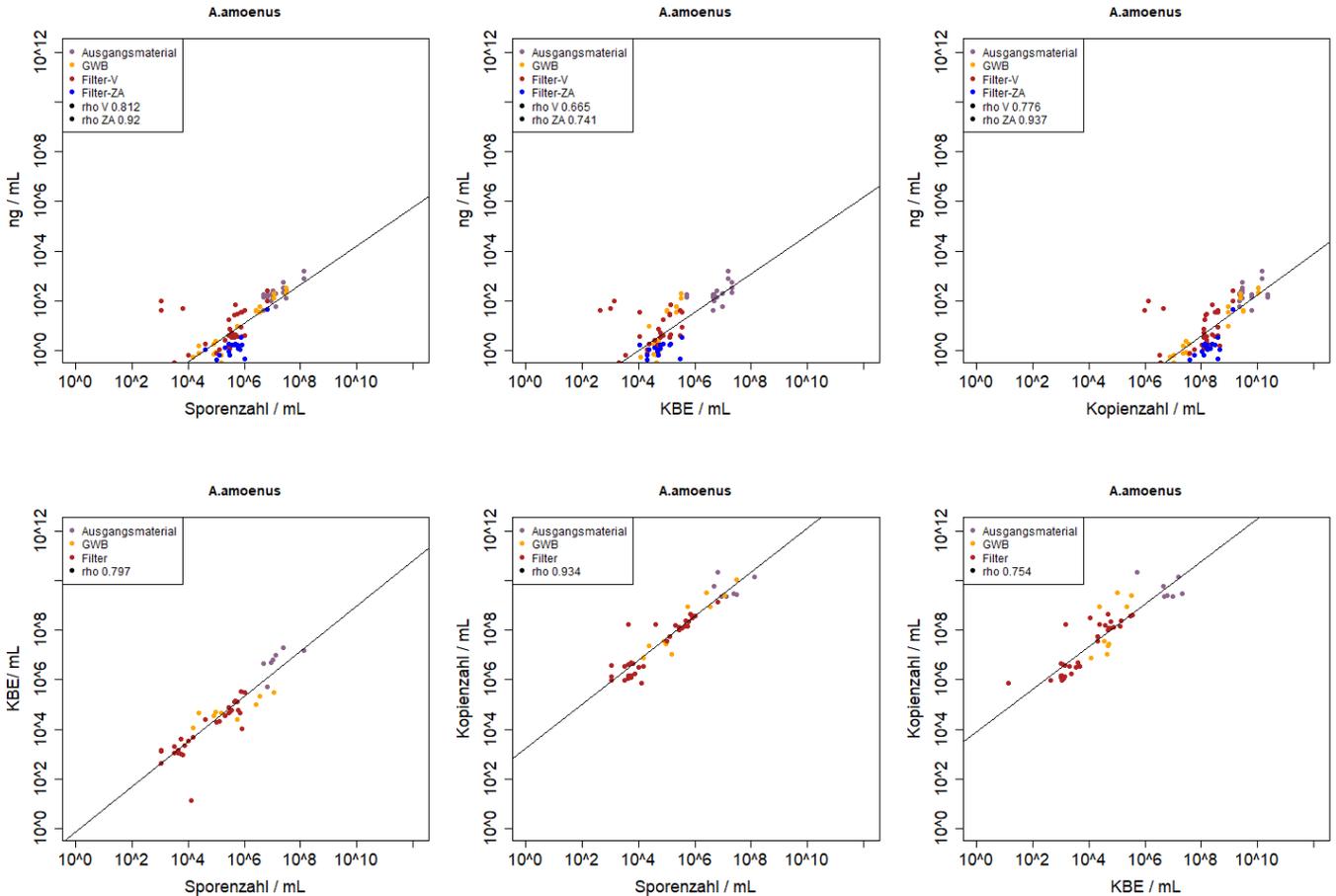
Ergebnisse der jeweils spezifischen ELISA Assays für Reinkulturproben mit und ohne Zellaufschluss. Ohne Zellaufschluss wurde nur gevortext. Die schwarze Linie zeigt die Ideallinie bei gleichen Ergebnissen an. In jeder Grafik ist der Korrelationskoeffizient (ρ nach Spearman) angegeben



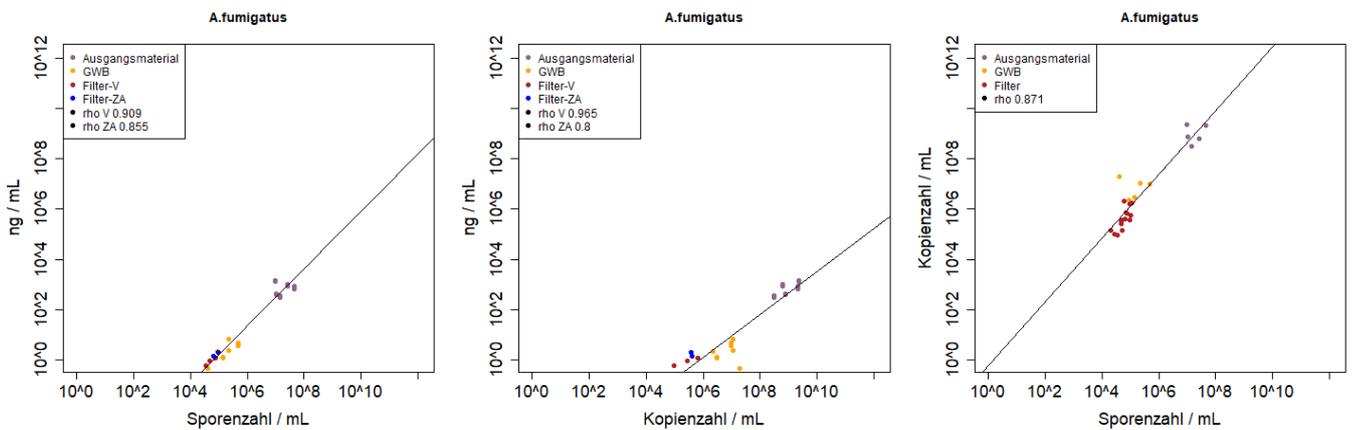
Korrelationen der Analysemethoden je Organismus

Ergebnisse der Reinkulturproben der verschiedenen Analyseverfahren. Für ELISA sind für Filterproben Ergebnisse mit (Filter-ZA) und ohne (Filter-V) Zellaufschluss angegeben. Lila – Ausgangsmaterial, gelb – Aerosol direkt nach dem Generator, rot – Filterproben gevortext, blau – Filterproben mit Zellaufschluss; Linie – Lineares Modell des Zusammenhangs; in der Legende ist der Korrelationskoeffizient nach Spearman angegeben

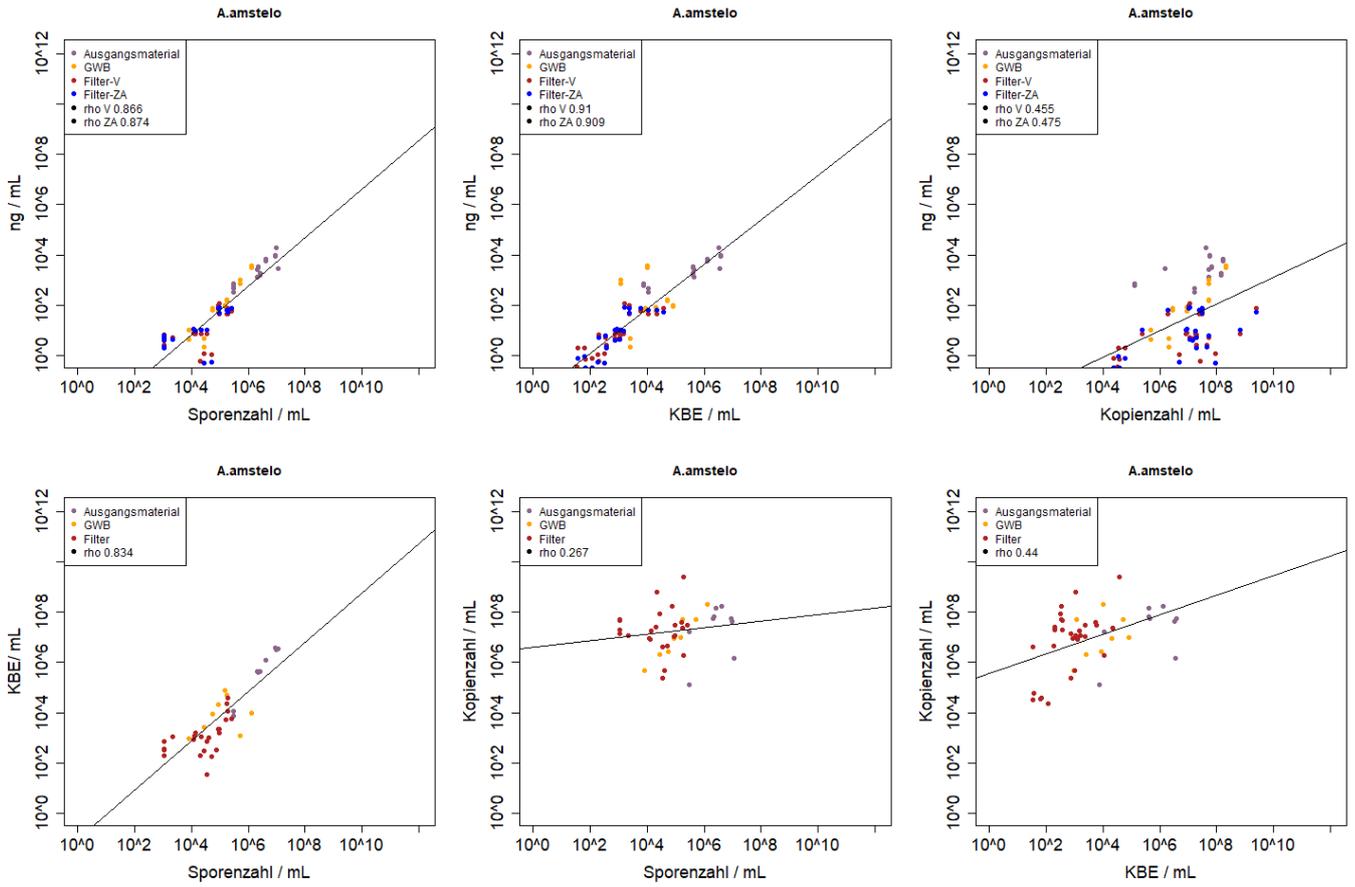
Aspergillus amoenus



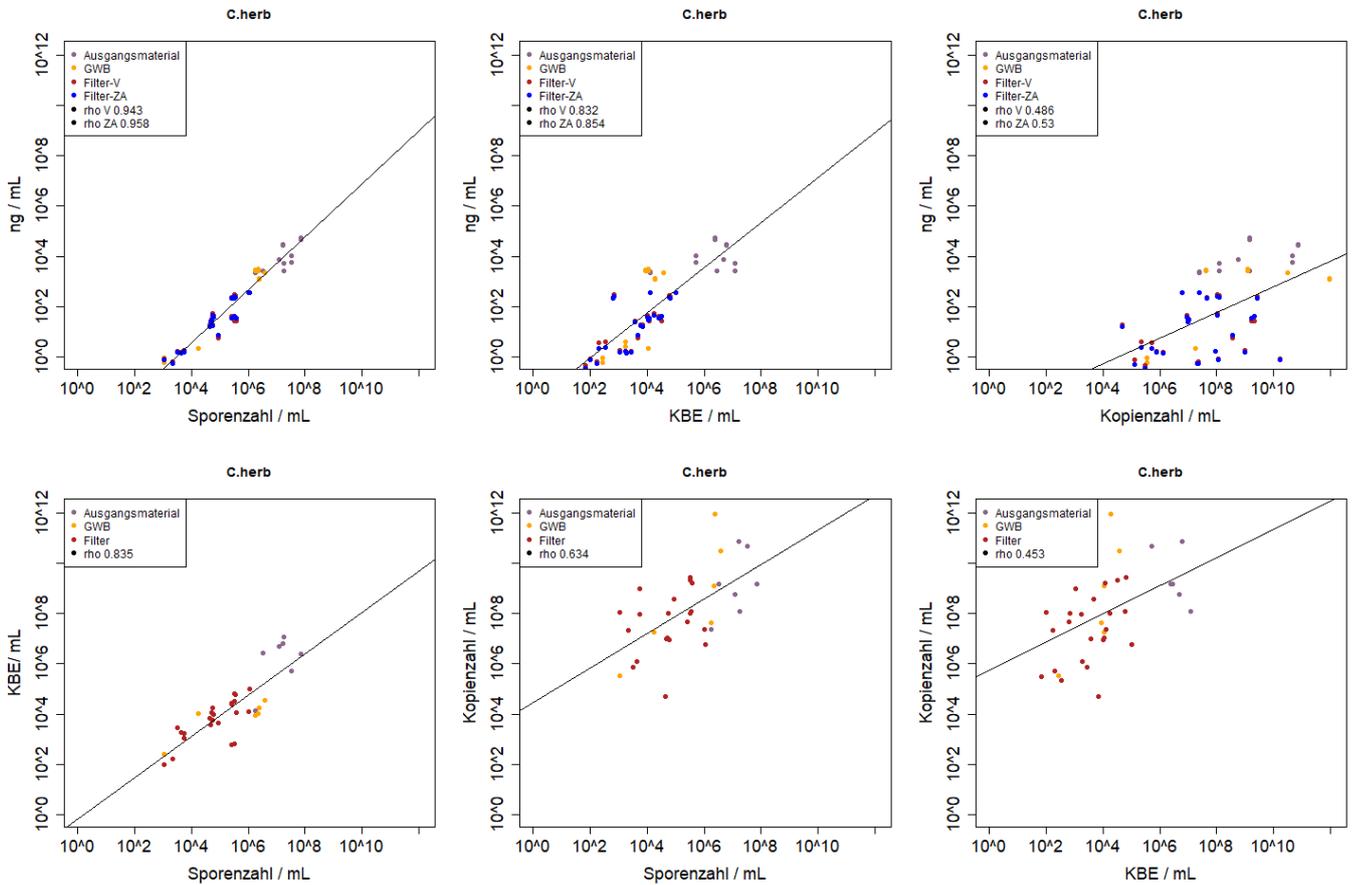
Aspergillus fumigatus



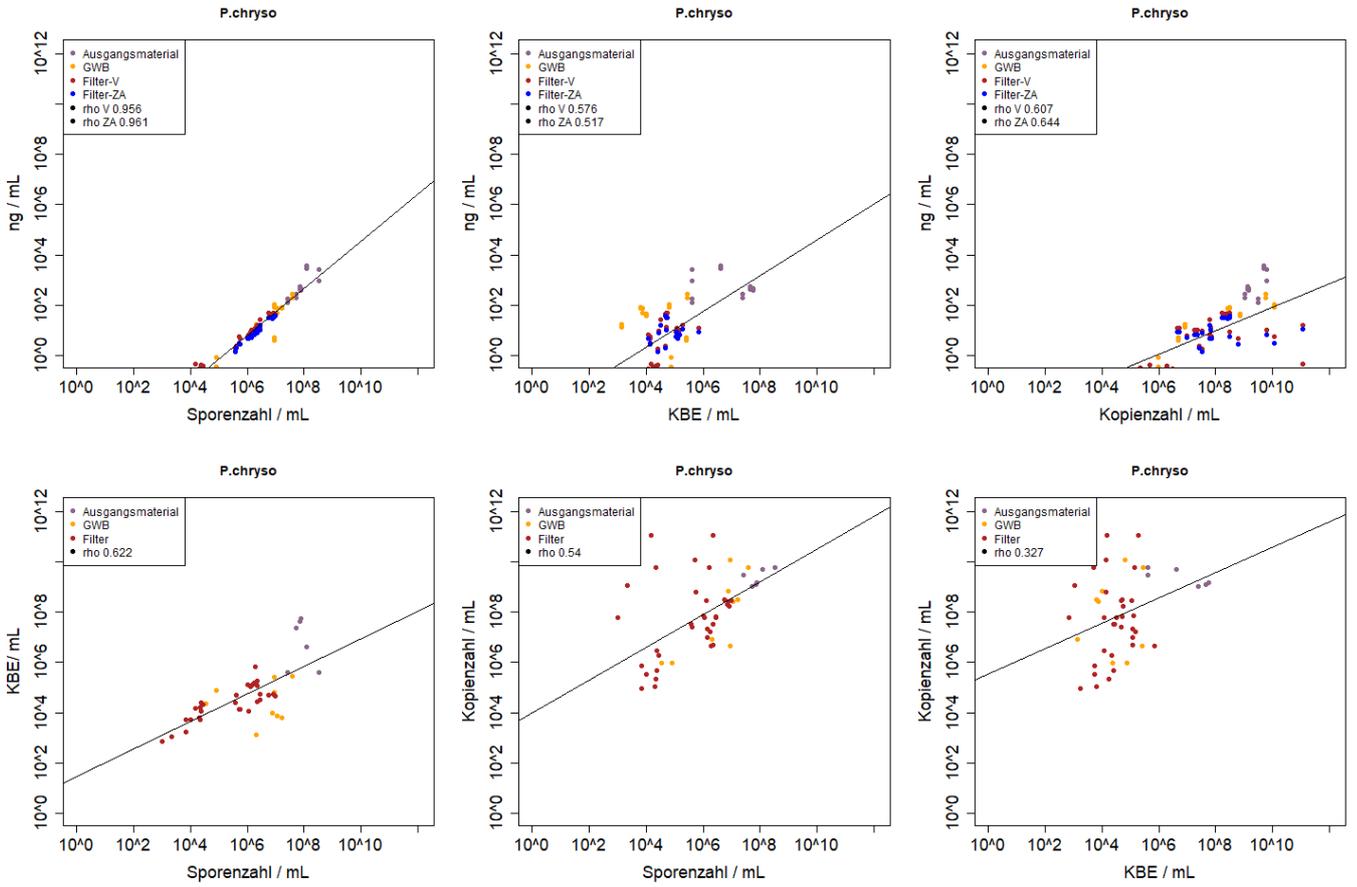
Aspergillus amstelodami



Cladosporium herbarum



Penicillium chrysogenum



Wallemia sebi

