



A B S C H L U S S B E R I C H T

„EVALUIERUNG EINER PRÜFKAMMER UND VALIDIERUNG VON VERSCHIEDENEN SAMMEL- UND ANALYSESYSTEMEN FÜR BIOAEROSOLE“

Verfasst von Dr. Sabine Strauss-Goller und DI Clara Pogner

unter Mitarbeit von Mag. Verena Unterwurzacher und Mag. Anja Konlechner
in Kooperation mit der Universität für Bodenkultur Wien

Projektleitung: Univ. Prof. Dr. Joseph Strauss

Abschlussbericht zum Vorhaben
„Evaluierung einer Prüfkammer und
Validierung von verschiedenen
Sammel- und Analysesystemen für
Bioaerosole“ (FP337)

Laufzeit

01.05.2012 – 31.12.2015

Bericht vom 18.05.2016

Autoren

Dr. Sabine Strauss-Goller, DI Clara Pogner, Mag. Verena Unterwurzacher,
Mag. Anja Konlechner und Prof. Dr. Joseph Strauss

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung deutsch

Kurzfassung englisch

1. Problemstellung

2. Forschungszweck/-ziel

3. Methodik

Übersicht über die geplanten Arbeits- und Zeitabläufe

Übersicht über die Arbeitspakete

Abweichungen vom Zeitplan

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Übersicht über die Arbeitspakete

Arbeitspaket 1

Arbeitspaket 2

Arbeitspaket 3

Arbeitspaket 4

Arbeitspaket 5

Arbeitspaket 6

Arbeitspaket 7

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

Bewertung der Ergebnisse anhand des Forschungsziels

Bewertung der Ergebnisse anhand der Praxisrelevanz

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

8. Anhang/Anhänge

Literatur

Kurzfassung deutsch

Das vorliegende Forschungsprojekt hatte zum Ziel konstante und damit standardisierte Bioaerosolkonzentrationen in einer neu entwickelten Messkammer zu generieren und dadurch die Möglichkeit zu schaffen, gängige Bioaerosol-Sammelgeräte darauf zu testen, inwiefern sie Bioaerosole mit definierten Eigenschaften und Konzentrationen quantitativ abbilden können. Dazu wurde eine Bioaerosolmesskammer mit den erforderlichen Eigenschaften konzipiert und von der Fa. PALAS® GmbH in Karlsruhe konstruiert. Die Messkammer basiert auf konstanter, laminar fließender Strömung, die eine möglichst schonende und gleichmäßige Verteilung der biologischen Partikel an allen Punkten des Messraumes auch bei in Betrieb befindlichen Sammelgeräten gewährleisten sollte. Die Kammer wurde auf alle definierten Parameter zuerst physikalisch validiert und diese Arbeiten, welche in „Air Quality Control“ im Jahr 2013 publiziert wurden, konnten die erfolgreiche Umsetzung des Messkammerkonzeptes nachweisen.

Die anschließenden biologischen Validierungsarbeiten beinhalteten die Herstellung und schonende Vernebelung von standardisierten Bioaerosolen mit definierten Konzentrationen und Keimraten, wobei 8 Pilzarten, 2 Bakterienarten und eine Virusart verwendet wurden. Die Validierung wurde anhand von fünf Kontrollpunkten durchgeführt. Diese wurden jeweils vor und nach der Aerosolisierung (jeweils Konzentration und Lebensfähigkeit), sowie während des Transportes (Partikelzählung) und nach der Sammlung durch ein ausgewähltes Referenz-Sammelgerät (MAS-100 NT) erhoben. Die erhaltenen Ergebnisse haben gezeigt, dass alle geforderten biologischen Parameter in dem Kammer-System nachvollziehbar und Sammelgeräte damit auch quantitativ biologisch überprüfbar sind. Unter den gewählten experimentellen Parametern wurden anschließend 7 unterschiedliche Sammelsysteme, die 4 Sammelprinzipien repräsentieren und in der Praxis eingesetzt werden, in wiederholten Ansätzen untersucht. Die Auswertung erfolgte sowohl auf Basis von klassischen mikrobiologischen Analyseparametern (Lebendkeimzählung, KBE) als auch durch mikroskopische und molekularbiologische Methoden, mit denen auch die nicht-keimfähigen Mikroben und Viren erfasst werden können. Einige Bioaerosol-Sammelsysteme wurden außerdem durch biochemische Tests auf ihre Eignung zur Erfassung von pyrogenen (entzündungsauslösenden) Komponenten überprüft. Die Daten der mikrobiologischen Auswertungen zeigten, dass bei Schimmelpilzen die durchschnittliche Erfassungsrate bei ungefähr 50% der lebensfähigen und bei ca. 20% der gesamt vorliegenden Pilz- oder Bakteriensporen liegt, wobei bis zu dreifache Abweichungen zwischen den einzelnen Sammelsystemen gemessen wurden. Bei sensitiven Hefen und Gram-negativen Bakterien waren die gemessenen Abweichungen zwischen den Sammelsystemen noch größer. Mit den molekularbiologischen Auswertungen konnten zwar auch die nicht-lebensfähigen Keime nachgewiesen werden, allerdings muss vor allem bei den Pilzsporen, bei welchen der Zellaufschluss zur DNA-Isolierung zum Teil sehr ineffizient war, die Sensitivität der quantitativen Analyse noch weiter verbessert werden. Aus diesen Arbeiten konnte eine Empfehlung der am besten geeigneten Geräte und Analysemethoden für die unterschiedlichen Bioaerosolgruppen gegeben werden.

Die Projektergebnisse wurden im Rahmen einer durch das Projekt Team und der Förderstellen organisierten Tagung vor internationalen Experten/innen präsentiert wobei auch durch die anderen Vorträge bzw. Diskussionsbeiträge der Experten/innen klar ersichtlich wurde, dass unsere quantitativen biologischen Validierungsarbeiten direkte Auswirkungen haben und Verbesserungen für die zukünftige Bewertung von Bioaerosol-Messergebnissen an Arbeitsplätzen darstellen werden.

Abstract

The aim of the project was to develop a bioaerosol calibration system which should allow the generation and constant supply of bioparticles with defined concentrations and viability evenly over the whole testing volume for a direct comparison of bioaerosol samplers under controlled and standardized conditions. To ensure this, the project team together with PALAS GmbH conceived and built a bioaerosol chamber in which these parameters can be strictly met even when bioaerosol sampling devices are operating inside the running calibration chamber. Physical validation of the system was carried out with inorganic particles and the results of this validation, published in "Air Quality Control" in 2013, clearly showed that, using low-velocity laminar flow, the strict requirements defined at the beginning, are met. In particular, even particle distribution and negligible influence of operating sampling devices was demonstrated.

The biological validation started with the development of SOPs for the production of standardized bioaerosol types encompassing 8 different fungal species, two bacterial and one viral specimen. Five control points were implemented including aerosolization (concentration and viability each before and after the nebulizer), transport (particle counter) and sampling (MAS-100-NT sampler for validation purpose). The results of this validation runs showed that all required biological parameters can be controlled and that this test system is suitable to quantitatively determine the biological sampling efficiency of a given sampler. Next, 7 different samplers representing 4 different sampling principles were compared under the determined chamber parameters in repetitive experiments. Sampler efficiencies were compared by classical microbiological methods (CFU-based viable counts) as well as microscopically and by molecular-biological methods. Both of the latter allowed also the determination of the non-viable portion of bioparticles collected by the different sampling devices. Some sampling systems were tested also for their ability to collect and display pyrogenic bioparticles. Viability-based analyses showed that in average samplers detected around 50% of all viable fungal or bacterial spores in the test air and taking into account a roughly 50% germination rate of such spores, the overall detection capacity for these specimens was around 20% of all spores present in the controlled environment. An up to three-fold deviation between different samplers was observed. More sensitive microbes such as yeast cells or gram-negative bacteria had an even much higher rate of deviation between sampling systems in which impingement were superior over other collection principles. Although molecular-biological systems allowed the detection of also non-viable microbes, the low DNA extraction efficiency from fungal spores led to a generally low sensitivity of the method which clearly needs improvement before it can be used to quantitatively determine fungal cells in aerosols. Summarizing the data obtained in this project allowed to present a guideline of which methods and sampling systems may be best suitable and thus be recommended when as certain type of bioaerosol component has to be analyzed.

The project and its results have been presented at a meeting held in Vienna and Tulln organized by the project team composed of personnel from the funding bodies and the research institutions. International experts were discussing our data and their own work during this workshop and from the in-depth discussions it became fairly clear that the possibility to quantitatively determine the biological sampling efficiency of bioaerosol samplers will certainly influence and improve the assessment of bioaerosol loads by health authorities in outdoor and indoor settings.

1. Problemstellung

Bioaerosole können Ursache mehrerer Berufskrankheiten in verschiedenen Branchen wie etwa im Bau- und Sanierungsgewerbe, Lagerhaltung, Lebensmittelproduktion, oder Abfallbeseitigung und –bearbeitung, sein. Bei Bioaerosolen handelt sich meist um lebende oder tote Mikroorganismen sowie ihre toxischen oder allergenen Bestandteile, wie Viren, Bakterien, Pilzsporen, Myzelfragmente, Hefezellen, usw., aber auch Blütenpollen höherer Pflanzen und Sporen von Farnen oder Moosen gehören zu dieser höchst diversen Gruppe. Bioaerosole beinhalten weiters Bruchstücke von Organismen wie z.B. Hautschuppen oder Exkremente von Milben und assoziieren mit anderen organischen und anorganischen Stoffen (v.a. Stäuben) zu komplexen Mikroaggregaten, die je nach Art, Größe, Form und Löslichkeit zu einer Beeinträchtigung unserer Gesundheit führen können. Besonders die Atemwege, und zu einem geringeren Teil die Haut, sind durch diese Partikel gefährdet.

Biologische Belastungen der Luft spielen in vielen Lebensbereichen eine gesundheitliche Rolle. Die vermutlich bekannteste Form dieser Art von Belastung ist der Heuschnupfen, hervorgerufen durch an sich harmlose Pollen verschiedenster Pflanzen. Für Allergiker führt dies jedoch zu einer enormen Beeinträchtigung der Lebensqualität und kann selbst lebensgefährliche Ausmaße annehmen. Einer ähnlichen gesundheitsgefährdenden Situation können Menschen an ihrem Arbeitsplatz durch mikrobielle Belastungen wie z.B. Pilzsporen, Bakterien und Viren ausgesetzt sein. Während Pollen über das Allergiepotential hinaus keine weitere Gefährdung stellen, können mikrobielle Luftbelastungen am Arbeitsplatz neben Allergien auch Infektionen und toxikologisch relevante Exposition von Giften verursachen. In diesem Zusammenhang ist es oft nicht entscheidend, ob die mikrobiellen Keime vermehrungsfähig (lebend) sind oder nicht, da auch tote Pilzsporen Allergien auslösen können, bzw. tote Bakterienzellen immunologische funktionelle Lipopolysaccharide an ihrer Oberfläche tragen.

Gemäß seriösen wissenschaftlichen Erhebungen leiden in Europa mittlerweile mehr als 25% der Bevölkerung an verschiedensten Allergien, wobei Gräserpollen und Schimmelsporen die wichtigsten Auslöser sind. Unbehandelt können Allergien häufig in schwere Formen wie Asthma übergehen. Für Österreich gelten ähnliche Werte (Referenz von Statistik Austria 8.924-173/07i). Einzelne oder gemischte Allergene aus Pollen, Haaren, Mikroben, Hausstaub und Nahrungsmitteln lösen bei Allergikern verschiedene Krankheitsbilder aus, die vom Heuschnupfen, Asthma, allergischen Haut- und Darmerkrankungen bis hin zu lebensbedrohlichen Schockzuständen reichen können. Viele Pilze, die in der Umwelt gefunden werden, können nicht nur Allergien auslösen, sondern im Gegensatz zu Pollen und Milben den Körper kolonisieren und/oder über die Produktion von Toxinen, Proteasen, Enzymen und gasförmigen organischen Komponenten dem Organismus Schäden zuführen.

Eine von der EU in Auftrag gegebene europaweite aktuelle Studieⁱⁱ kam zu dem Ergebnis, dass der Großteil der asthmatischen Fälle durch Schimmelsporen und nicht durch Pollen ausgelöst wird, der Anteil der Schimmelpilze an Allergien also bisher deutlich unterschätzt wurde. Mittlerweile sind an die 150 verschiedene Pilzallergene aus ca. 80 Pilzarten identifiziert, welche typischerweise folgende Krankheitsbilder auslösen können: Allergische Bronchopulmonare Mycose (ABPM), Hypersensitive Pneumonitis, Pilz-Sinusitis, Toxische Pneumonie. Zusätzlich können lebensbedrohende primäre und sekundäre Infektionen in Immungeschwächten Personen auftretenⁱⁱⁱ.

Ein weiterer wichtiger Auslöser von Allergien sind die Exkremente von Hausstaubmilben. Es handelt sich dabei um Inhalationsallergene, da sie an feinste Staubpartikel gebunden vorkommen und damit für den Atemtrakt verfügbar werden.

Bis jetzt konnten 10 verschiedene allergene Proteine (Der p1-10) der in Mitteleuropa am weitesten verbreiteten Art *Dermatophagoides pteronyssinus* identifiziert werden^{iv}.

Die dem Milbenkot und Milbenkörper entstammenden Allergene behalten ihre Allergenität unter Umständen über Jahre, unabhängig von der Vitalität der Milbe^v. Betroffen von Milbenallergien sind in etwa 21,7% der durchschnittlichen Bevölkerung in Europa.

Aufgrund der großen Bedeutung von Bioaerosolen und den von ihnen ausgelösten Krankheitsbildern, ist die Beurteilung von Bioaerosolen und ihrer allergenen und toxischen Bestandteile für die gesundheitliche Bewertung von Arbeitsplätzen und für die Prävention von Berufskrankheiten hoch relevant.

Als besonders betroffene Arbeitsplätze sind dabei folgende zu nennen

- Abfallentsorgung sowie –verarbeitung, vor allem Bioabfall trägt hohe mikrobielle Kontaminationen
- Sanierungsgewerbe in der Bauwirtschaft, die mit der Entsorgung bzw. Sanierung von schimmelbefallenen Bauflächen beauftragt sind; hier fallen auch Wasser- und Brandschadensanierer darunter
- Gesundheitsdienste und andere Bereiche der öffentlichen Aufgaben und Verwaltung
- Reinigungsgewerbe, die mit Hochdruckreinigern kontaminierte Flächen reinigen und daher belasteten Bioaerosolen (v.a. aus Biofilmen) ausgesetzt sind
- Lagerhaltung, Speditionen, vor allem von organischen Stoffen, die potentiell hohe mikrobielle Kontaminationen enthalten können, z.B. Getreide, Textil, Fasern, Papier
- Be- und -verarbeitung von Naturstoffen: Holz, Textil, Fasern, Floristen, Gärtner
- Spezielle Betriebe der Lebensmittelverarbeitung, v.a. Käseereien, Salamihersteller
- Unterrichtsarbeitsplätze v.a. in Schulen, Kindergärten und anderen pädagogischen Einrichtungen, bei denen es v.a. in den Winterzeiten zu hohen Belastungen kommen kann (v.a. Viren, Bakterien)

Für die gesundheitliche Bewertung von Arbeitsplätzen sind standardisierte und validierte Verfahren nötig. Allerdings gibt es keine entsprechenden Bewertungsmaßstäbe für die Wirkung von Bioaerosolen auf den Menschen und keine standardisierten Erfassungsmethoden für die Bestimmung der Konzentration der darin enthaltenen Biopartikel. Dadurch sind gesicherte Aussagen über die Auswirkungen einer oder mehrerer dieser potentiellen Gefahrenquellen am Arbeitsplatz schwierig.

Bioaerosolmessgeräte und anschließende Bio-Analysen sind bis heute nicht standardisierbar und validierbar. Viele Einzelstudien sowie Übersichtsartikel sind zu diesem Thema publiziert worden wobei die Standardisierung der Messmethoden bei diesen Publikationen immer als wichtiger offener Punkt angesehen wird (siehe Übersichtsartikel von A.L. Pasanen^{vi}).

Ein großes Thema bei Vergleichsmessungen in Räumen mit einer hohen Bioaerosolbelastung (ohne Standardisierbarkeit der Belastung) ist die beträchtliche Streuung der jeweils ermittelten Konzentrationswerte an luftgetragenen Mikroorganismen. Folgende Ursachen können für diese Streuung verantwortlich sein:

- (1) Zusammensetzung und Verteilungshomogenität des Aerosols
- (2) Technische Ausführung Einlass-System („cut-off“)
- (3) Grad der physikalischen Abscheidung
- (4) Biologische Sammeleffizienz
- (5) Unterschiede im detektierbaren Konzentrationsbereich des verwendeten Gerätes
- (6) Nachfolgender Analyse- bzw. Anzuchtschritt

Die Problematik der beträchtlichen Streuung der mit den verschiedenen Geräten erzielten Messergebnisse beginnt bereits mit der (1) Zusammensetzung und homogenen Verteilung des Aerosols. Der Anteil biogener/abiogener Bestandteile hat dabei einen nicht zu vernachlässigen Einfluss auf die Ergebnisse der Untersuchung, da sich einzelne Komponenten des Aerosols stabilisierend auf anhaftende Mikroorganismen auswirken können (e.g. Proteine). Im gegensätzlichen Fall können zum Bsp. Salze im Aerosol enthalten sein, welche die Inaktivierung biogener Bestandteile im Aerosol beschleunigen^{vii}. Punkt (2) bis (5) der möglichen Streuungsursachen sind in der Bauart und Wirkungsweise des verwendeten Gerätes zu finden.

Unabhängig vom verwendeten Sammelgerät ist eine weitere Fehlerquelle der nachfolgende Anzuchtschritt (6), wo prinzipiell ausschließlich vermehrungsfähige Organismen nachgewiesen werden können. Geschädigte oder tote Mikroorganismen, die aber sehr wohl allergenes oder toxisches Potential aufweisen können, werden nicht erfasst. Zudem ist dieser Schritt der Kultivierung eine potentielle Gefahrenquelle für zusätzliche Streuung, da verwendete StandardMedien ein nie absolut richtiges Ergebnis der tatsächlich im Aerosol enthaltenen Organismen liefern. Die Beschränkung auf ausschließlich lebensfähige Mikroorganismen kann durch eine molekularbiologische Erfassung der Aerosolbestandteile aufgehoben werden.

Um die Streuung aufgrund der technischen und methodischen Unterschiede der verwendeten Geräte identifizieren zu können, ist ein standardisiertes und validiertes Verfahren zur Kalibration von Bioaerosol Messgeräten und –Methoden nötig.

Es existiert bereits ein physikalisches Kalibrationsverfahren nach europäischer Norm prEN13205^{viii}, hier wird allerdings lediglich die physikalische Effizienz beim Abscheiden von luftgetragenen Partikeln ermittelt. Diese fehlende Standardisierbarkeit und Validierung von Messgeräten für die Bioanalyse erlaubt damit keine sichere Aussage über die Arbeitsplatzgefährdung. Für die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Ergebnisse ist also eine Standardisierung der in der Praxis eingesetzten Probenahmegeräte unbedingt erforderlich.

Die exakte Erfassung, Messung und Bio-Analyse von Biopartikeln in Aerosolen ist allerdings eine essentielle Voraussetzung für die sichere Arbeitsplatzbewertung: Für die Organisationen der Unfallverhütung (AUVA und DGUV) sind die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes daher für die zukünftige Beratung, Arbeit in Normungsausschüssen, Arbeitsplatzmessungen und Schulungen relevant.

2. Forschungszweck/-ziel

Das vorliegende Forschungsprojekt hatte zum Ziel konstante und damit standardisierbare Bioaerosolkonzentrationen in einer Messkammer zu generieren und dadurch die Möglichkeit zu schaffen, gängige Bioaerosol-Sammelgeräte auf ihre biologische Effizienz zu testen. In der Messkammer sollte es möglich sein standardisierte Bioaerosolkonzentrationen von Viren, Bakterien, Schimmelpilzen, Milbenallergenen und Endo- bzw. Mykotoxinen zu generieren. Die Evaluierung der Messkammer erfolgte mittels Partikelzählung und Erfassung von biogenen Luftbestandteilen durch Bioaerosol-Messgeräte.

Durch das standardisierte System wurde die Vergleichbarkeit der verschiedenen Sammelgeräte entscheidend verbessert. Die durchgeführten Untersuchungen bieten die Möglichkeit:

- (1) zur Validierung dieser etablierten Messverfahren unter standardisierten Prüfbedingungen.
- (2) Weiterhin können mit Blick auf bestimmte Fragestellungen hin neu entwickelte Messverfahren geprüft und validiert werden.
- (3) Als Drittes besteht die Möglichkeit standardisierte Probenräger zur Durchführung von Ringversuchen herzustellen. Damit könnte die Qualitätssicherung von Analyseergebnissen für Proben aus Arbeitsbereichen gewährleistet werden. Hier muss bisher auf Angebote aus anderen Bereichen zurückgegriffen werden (z. B. Schimmelpilzanalytik in Innenräumen oder Endotoxin-Belastung von pharmazeutischen Produkten), die die Konzentrationsbereiche von Arbeitsbereichsproben häufig nur unzureichend abdecken.

Nach dem Etablieren von standardisierten Verfahren wurden Bioaerosol-Messgeräte auf ihre Sammeleffizienz für die verschiedenen Biopartikel verglichen.

Obwohl viele Belastungsbewertungen nur auf Lebendkeimzahlen beruhen, ist es für die allergene oder toxische Wirkung der Biopartikel meist nicht relevant, ob sie in lebensfähigem Zustand vorliegen. Daher wurden in weiteren Arbeitspaketen die herkömmlichen mikrobiologischen Analyseparameter basierend auf Lebendkeimzählung (KBE) mit denen der mikroskopischen Methoden sowie mit der quantitativen-genetischen und biochemischen ELISA-Analyse verglichen.

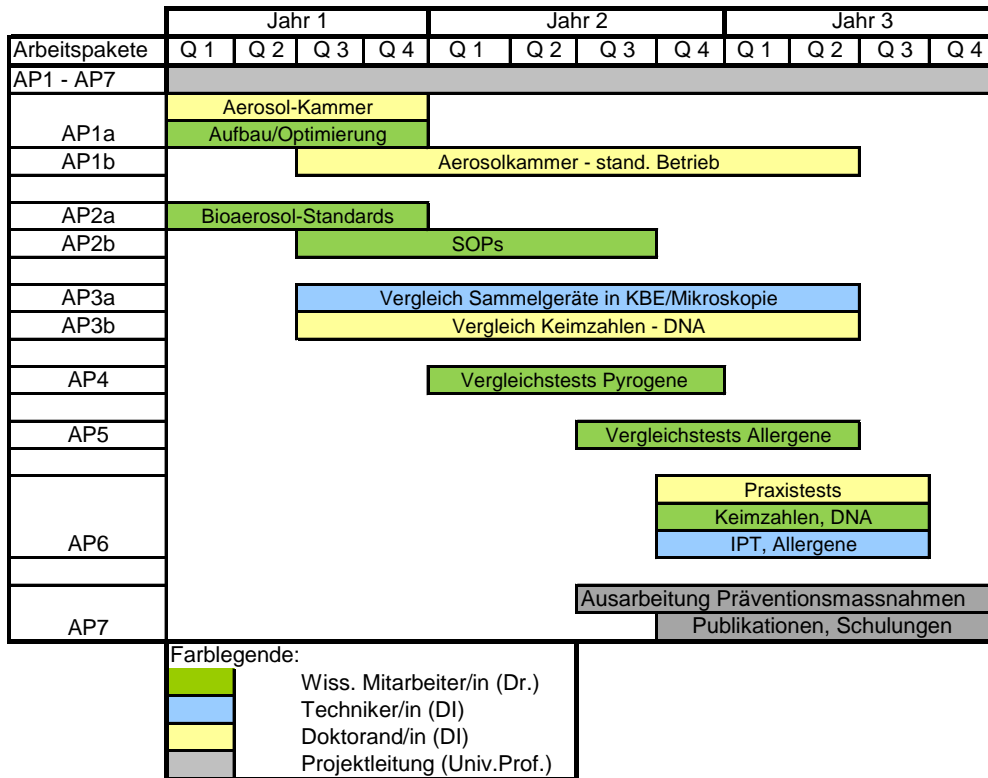
Nach dieser Entwicklungs- und Validierungsphase erfolgte die ersten kombinierten Analysen auf alle mikrobiologischen, genetischen und biochemischen Parameter unter praxisrelevanten Bedingungen in ausgewählten Betrieben, in denen eine relevante Bioaerosolexposition zu erwarten ist. Abschließend erfolgte eine Gesamtbewertung der praxisrelevanten Bioaerosol-Sammelgeräte.

Durch die Validierung der Sammelsysteme und Optimierung der Analyseverfahren verbessern sich die Möglichkeiten der umfassenden Risikoabschätzung für die AUVA und DGUV.

3. Methodik

Übersicht über die geplanten Arbeits- und Zeitabläufe

Zur Erreichung des Projektziels wurde das Projekt in 3 Projektphasen und 7 Arbeitspakete gegliedert. Die folgende Abbildung zeigt einen Überblick über die Arbeitspakete. Danach folgt eine detailliertere Beschreibung der Projektphasen. Anschließend werden Abweichungen von diesem Arbeits- und Zeitplan beschrieben und begründet.



Projektphasen:

1. Phase 1: Physikalische und biologische Validierung der Prüfkammer (AP 1 und AP 2)
2. Phase 2: Vergleich der Sammeleffizienzen und Analyseverfahren (AP 3, AP 4, AP 5)
3. Phase 3: Praxistests und Dissimination (AP 6, AP 7)

Übersicht über die Arbeitspakete

- AP1.** Validierungs- und Optimierungsarbeiten der von AIT und BOKU in Kooperation mit der Fa. PALAS® GMBH entwickelten Bioaerosol-Prüfkammer mittels integrierter Partikelmessung. Diese Prüfkammer wird im Projekt zur Herstellung und Erhaltung von standardisierten Konzentrationen von Bioaerosolen verwendet, um die Sammeleffizienz der am Markt befindlichen Geräte und Methoden zur Bioaerosol-Messung zu vergleichen.
- AP2.** Herstellung definierter Mengen relevanter Bioaerosole. Zur Validierung der Prüfkammer sowie der Sammelgeräte werden definierte und reproduzierbar herstellbare Mischungen der gängigen biogenen Aerosolbestandteile wie Viren, Bakterien, Schimmelpilze und Milben benötigt. In diesem AP werden auch standardisierte Durchführungsbeschreibungen (Standard Operating Procedures, SOPs) erstellt.
- AP3.** Vergleich und Validierung der Sammeleffizienz der gängigen Sammelsysteme in der Bioaerosol-Prüfkammer.
- 3a)** Vergleich der Sammeleffizienz durch Auswertung mittels Lebendkeimzahlen (Bakterien und Pilze) und mikroskopische Analyse (Bakterien, Pilze).
- 3b)** Vergleich der Sammeleffizienz durch Auswertung mittels DNA-basierter Analyse von allen biogenen Bestandteilen des Aerosols: Bakterien, Pilze, Viren. Durch die Einbeziehung von molekularbiologischen Methoden werden erstmals direkte Vergleiche von lebensfähigem mit nicht-lebensfähigem Material möglich sein. Dieser Vergleich erlaubt damit erstmals die Erfassung der wirklichen biogenen Gesamtbelastung eines Arbeitsplatzes. Die Ergebnisse ermöglichen außerdem eine Einstufung, wie sich verschiedene Sammelsysteme auf die Lebensfähigkeit von Viren, Bakterien und Schimmelpilzen auswirken.
- AP4.** Vergleich der Sammeleffizienz für entzündungsauslösende Stoffe. Mithilfe der Bioaerosol-Prüfkammer soll die Fähigkeit verschiedener Bioaerosol-Sammelsysteme überprüft werden, pyrogen-wirksame Bestandteile der Aerosole zu erfassen. Darüber hinaus wird eine Aussage möglich sein, wie gut sich einzelne Sammelsysteme für eine anschließende quantitative Messung durch gängige ELISA Testsysteme eignen.
- AP5.** Vergleich der Sammeleffizienz von allergenen Stoffen. Bioaerosol Sammelsysteme können innerhalb dieses Projektes erstmals hinsichtlich ihrer Fähigkeit allergen-wirksame Bestandteile der Aerosole (z.B. Hausstaubmilben-Allergen) zu erfassen, beurteilt werden.
- AP6.** Praxistests: Das im Laufe des Projektes erarbeitete Know-How und die zur Verfügung stehende validierte technische Ausrüstung wird zur Analyse von Indikator-Arbeitsplätzen verwendet. Dadurch ergibt sich die neue Möglichkeit einer umfassenden Bewertung von Arbeitsplätzen (z.B. Abfallwirtschaft, Lebensmittelverarbeitung) hinsichtlich einer Belastung durch Bioaerosole. Diese Belastung sollte hinsichtlich aktuell gültigen Richtlinien (TRBA 212, 213 und 214) diskutiert und bewertet werden.

AP7. Gesamteinstufung der Geräte, Präventionsvorschläge Beratung, und Schulung. **Das gewonnene Know-How bzw. die technische Ausrüstung wird ein „Kompetenzzentrum Bioaerosole“ schaffen, das zur Verbesserung der Präventionsarbeit wesentlich beitragen wird. Die erhaltenen Messresultate werden sowohl in deutschsprachigen Zeitschriften, als auch in internationalen Journalen publiziert. Die neuen Möglichkeiten für Arbeitsplatzmessungen werden weiters in Form von Workshops, Beratungen und Schulungen für Multiplikatoren (z. B. Messtechniker, Aufsichtspersonen, Sicherheitsfachkräfte und Arbeitsmediziner) angeboten werden. Dadurch wird die Qualität der Präventionsarbeit weiter verbessert**

Abweichungen vom Zeitplan

Im Folgenden sind Abweichungen vom Zeitplan anhand der Arbeitspakete aufgeführt.

- AP1 Der ursprünglich vorgesehene Zeitplan hat sich verzögert, da die Bioaerosolkammer erst im Februar 2013 am UFT in Tulln in Betrieb genommen werden konnte. Die Validierung der Kammer wurde sowohl mit nicht biologischen wie mit biologischen Aerosolen abgeschlossen (Ende 2014). Aufgrund der starken Hydrophobizität der Sporen von *A. brasiliensis* musste zur Herstellung einer homogenen Sporensuspension und anschließenden Vernebelung ein entsprechendes Detergens eingesetzt werden. Dieses Detergens (0,01% Tween²⁰-Lösung) führte aber zu einem negativen Effekt auf die Ergebnisse Partikelzählung, da die Anzahl der vom Vernebler generierten Detergens-Partikel enorm hoch war und sogar den Bereich der Partikel „Tween + Sporen“ überlagerte. Für die Biologische Validierung der Prüfkammer wurde auf Schimmelpilzsporen von *Trichoderma longibrachiatum* zurückgegriffen. Dies führte zu einer Verzögerung des Zeitplanes. Die Aerosolerzeugung mit dem Flüssigdispergierer AGK2000 und dem Bürstendispergierer RBG1000 führte zu einer erheblichen Schädigung der Sporen von *A. brasiliensis*. Es wurde nach einem alternativen Aerosolerzeuger gesucht und das System auf den Liquid Sparkling Aerosolizer (CH Technologies) umgestellt und erneut ein Standardbetrieb etabliert.
- AP2 Die SOPs der Testaerosole Pilze, Bakterien und Viren wurden erstellt. Eine SOP zur Verwendung vom Milbenallergenen in der Messkammer konnte in der Projektlaufzeit nicht erarbeitet werden, da der zur Verfügung stehende Mix an Trägersubstanz und Milbenbestandteilen weiter zu einem Teststaub verarbeitet werden müsste (Verdünnung mit weiterem Trägermaterial auf bestimmte Allergenpotentiale, Homogenisierung und Größenbestimmung zur Teststaub Erstellung) bzw. einer optimierten Aerosolerzeugung (zurzeit nicht am Markt erhältlich) bedarf.
- AP3 Aufgrund des nötigen Einsatzes von Detergenzien und eines anderen Bioaerosolgenerators kam es zu einer Verzögerung der biologischen Validierung der Bioaerosolkammer. Aus diesem Grund konnte der Vergleich der Luftkeimsammelgeräte verzögert gestartet, jedoch in den Projektjahren 3 und 4 erfolgreich abgeschlossen werden.
- AP4/AP5 Die Erfassung von pyrogenen Bestandteilen stellt eine eigene Herausforderung dar, da es für die gängigen Sammelsysteme keine Möglichkeit gibt, ohne pyrogene Störfaktoren zu sammeln. Aus diesem Grund wurde am Projektbeginn das Sammelsystem MBAS30 + AS100 Sammelkopf für die Erfassung von allergenen und pyrogenen Bestandteilen aufgrund von Publikationen (Stephan und Putz 2012^{ix}) ausgewählt. Während den Projektarbeiten stellte sich allerdings heraus, dass das beschriebene Sammelsystem grundlegend auf seine physikalische und biologische Sammeleffizienz getestet werden muss, um Aussagen über den Allergengehalt treffen zu können. Für die Sammlung von pyrogenen Bestandteilen wurden Filter (für das PGP-GSP Sammelsystem) und 8-well-Streifen (für das MBAS30 + AS100 Sammelsystem) als pyrogenfreie Sammelmedien

erstellt bzw. adaptiert und Tests in der Bioaerosolkammer durchgeführt. Es konnten Unterschiede zwischen beladenen und unbeladenen Sammelmedien detektiert werden, diese waren jedoch nicht signifikant. Detaillierte Beschreibung der Experimente sowie Resultate siehe Endbericht Kapitel 4.4.

- AP6 Aufgrund der Verzögerungen im Arbeitspaket AP1, AP2 und AP3 wurden die im Projektjahr 2 begonnenen Praxistest erst in der Verlängerungsphase (Projektjahr 4) mit allen in der Bioaerosolkammer getesteten Geräten in mehreren Wiederholungen durchgeführt.
- AP7 Die Validierung der Kammer mit einem nicht biologischen Testaerosol wurde bereits publiziert. (Konlechner A, Goller S, Gorfer M, Molter L, Strauss J (2013) Evaluation of a calibration chamber for bioaerosol measurement devices. Gefahrstoffe Reinhaltung Der Luft 73:471–476.) Es wurden Abstracts für Vorträge bei der Bioaerosol Chamber Conference (Veranstaltet durch die AUVA/DGUV) erstellt. Ein weiteres Abstract wurde für die 22. European Aerosol Conference in Tours (Frankreich) eingereicht, bei der ein Vortrag oder eine Posterpräsentation angestrebt wird. Weiters gibt es bereits Entwürfe für die Publikation der biologischen Validierung der Prüfkammer und der Vergleiche der Sammelgeräte. Weitere Details dazu siehe Endbericht Kapitel 4.7.

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Kommentare:

(i) Diese Beschreibung enthält eine Zusammenfassung der erreichten Ergebnisse, die detaillierten Projektergebnisse mit Tabellen und Abbildungen sind dem Endbericht zu entnehmen (Anhang).

(ii) Die gesammelten, detaillierten Projektergebnisse wurden bei den bisherigen halbjährlichen Projekttreffen präsentiert und diskutiert. Als externer, unabhängiger Experte zur kritischen Diskussion der Konzepte und Ergebnisse war bei allen diesen Projekttreffen Prof. Dr. Helmuth Horvath, emProf. für Biophysik der Universität Wien (<http://aerosols.univie.ac.at/people/horvath-helmuth/>), eingeladen und anwesend.

Übersicht über die Arbeitspakete

- Arbeitspaket 1 Validierungs- und Optimierungsarbeiten einer für das Projekt entwickelten Bioaerosol-Prüfkammer (AIT, PALAS® GmbH)
- Arbeitspaket 2 Herstellung definierter Mengen relevanter Bioaerosole (Schimmelpilze, Bakterien, Viren, Milbenbestandteile)
- Arbeitspaket 3 Vergleich und Validierung der Sammeleffizienz der gängigen Sammelsysteme in der Bioaerosol-Prüfkammer
- Arbeitspaket 4 Vergleich der Sammeleffizienz für entzündungsauslösende Stoffe
- Arbeitspaket 5 Vergleich der Sammeleffizienz von allergenen Stoffen
- Arbeitspaket 6 Praxistests
- Analyse von Indikator-Arbeitsplätzen
- Arbeitspaket 7 Gesamteinstufung der Geräte, Präventionsvorschläge, Beratung und Schulung, Schaffung eines Kompetenzzentrums Bioaerosole

Arbeitspaket 1

- Entwicklung und Test der Bioaerosolkammer am Betriebsgelände der Fa. PALAS GmbH in Karlsruhe
- Installation am Institut in Tulln im Februar 2013
- Validierung der Bioaerosolprüfkammer mit nichtbiologischem Teststaub hinsichtlich Partikelkonzentrationsverteilung und Volumenstrom (Ergebnisse wurden bereits publiziert)
- Validierung der Kammer mit einem ersten biologischem Testaerosol (Sporen von *A. brasiliensis*):
 - Umstellung der Sporenvernebelung auf einen Flüssigdispersier AGK2000 (PALAS®)
 - Überprüfungen zur Bestimmung der absoluten Anzahl an Sporen in der Bioaerosolkammer
 - Bestimmung der Vernebelungsrate abhängig vom Druck
 - Auswahl und Bestimmung des Einflusses des verwendeten Sporendetergens auf die Partikelgrößengenerierung und -Erfassung
 - Dokumentation der Temperatur und rel. Luftfeuchtigkeit in der Kammer und daraus resultierend Definition der Vorlaufzeit vor Beginn der Probenahme
- Validierung der Kammer mit Sporen von *T. longibrachiatum*
 - Etablierung von Kontrollpunkte zur Überprüfung von Sporenzahl und Keimfähigkeit
 - Standardisierte Vernebelung mit dem LSA-Liquid Sparkling Aerosolizer (CH Technologies)
 - Erstellung der Sporensuspension in reinem H₂O um optische Partikelmessung zu ermöglichen
 - Dokumentation aller Einstellungen, Parameter, Temperatur und Luftfeuchte
 - Überprüfung von Sporenkonzentration und Keimfähigkeit an Kontrollpunkten

Arbeitspaket 2

- (1) Herstellung von Testaerosolen Pilze:
 - Identifizierung optimaler Sporenbildner
 - Optimierung der Anzucht und Sporengewinnung verschiedener Pilzspezies
 - Wahl des richtigen Detergens und Überprüfung der Haltbarkeit der Sporensuspension von *A. brasiliensis* (Unterschiede in KBE je nach Alter der Sporen)
 - Optimierung der Vorbereitung vor der Sporenvernebelung und dem Auszählen der Sporen
 - Vergleich der Sporenmasse zu Sporenanzahl und KBE von *A. brasiliensis*, *D. microsporus* und *T. longibrachiatum*
 - Bestimmung der Anzahl der Kerne von *A. brasiliensis*, *D. microsporus* und *T. longibrachiatum* mit Fluoreszenz-Mikroskopie
 - Untersuchung unterschiedlicher Aufschluss-Methoden (7 verschiedene Aufschluss-Matrizes) zur DNA-Isolierung von *A. brasiliensis*, *D. microsporus*, *T. longibrachiatum*, *Tritirachium sp.* und *P. commune*
 - DNA-Isolierung von Sporen von *A. brasiliensis*, *D. microsporus*, *T. longibrachiatum* und *P. commune* mit verschiedenen DNA-Isolierungskits
 - Erstellung von SOPs für die Herstellung von Sporensuspensionen für:
Trichoderma longibrachiatum, *Aspergillus brasiliensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium commune*, *Fusarium fujikuroi*, *Ulocladium botrytis/oudemansii*, *Tritirachium sp*, *Doratomyces microsporus*
- (2) Herstellung von Testaerosolen Bakterien:
 - 2 Bakterienstämme (*E. coli*; Modell für coliforme Keime und *B. subtilis*, Modell für Bacillen und Micrococcus) wurden als lyophilisiertes quantitatives Mikroorganismenpräparat von der Firma Microbiologics (USA) gekauft.
 - Bei *B. subtilis* wurde beschlossen in der Luft typische Sporen und nicht lebende Zellen zu vernebeln, weshalb auf ein Flüssigpräparat von *Bacillus amyloliquefaciens* (früher *B. subtilis*) (Fa. APITEP GmbH, Berlin) zurückgegriffen wurde.
 - Erstellung von SOPs zur Produktion von Suspensionen von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Escherichia coli*.
- (3) Herstellung von Testaerosolen Viren:
 - -Ein Arbeitsprotokoll zur Herstellung von Bacteriophage λ (Modell für Virus mit doppelsträngiger linearer DNA) wurde etabliert und ein SOP erstellt.
- (4) Herstellung von Testaerosolen Milbenallergenen:
 - Milbenallergene wurden in Form von einer Mischung aus toten Milben und Milbenkot vom BMA-Labor in Bochum erhalten. 2 Hersteller von ELISA-Systemen mit unterschiedlicher Sensitivität wurden ausgewählt (Indoor Biotechnologies; Citeq biologics).
- (5) Erhebung der genauen Konzentration der einzelnen Bestandteile der Testaerosole mittels molekularbiologischen Techniken (PCR, qPCR):
 - Universal einsetzbare Primerpaare wurden Datenbank-unterstützt (silva Datenbanken) ausgewählt, um DNA, welche aus Sporen extrahiert wurde, zu quantifizieren. Bis jetzt gelang es, unterschiedlich große Gruppen an Spezies zu detektieren (Detektion verschiedener getesteter Eukaryonten; Genus-spezifische Detektion von *Penicillium ssp.* und *Aspergillus ssp.*)

- (6) Weitere Primerkombinationen und PCR-Konditionen wurden für einen Präamplifikationsschritt und eine nachfolgende quantitative Analyse (qPCR) getestet
 - der Einfluss der Größe des Präamplifikationsproduktes auf eine nachfolgende qPCR wurde verglichen
 - die Sensitivität der Messung (qPCR) wurde nicht durch einen Präamplifikationsschritt gesteigert
 - Vortests zur Evaluierung des Einflusses komplexer DNA-Gemische auf die Ergebnisse der PCR wurden durchgeführt

Arbeitspaket 3

- Überprüfung der in AP1 etablierten Kontrollpunkte mit allen Testorganismen für die SOPs erstellt wurden.
- Vorversuche zur Aufarbeitung von Filtern, die im PGP-GSP Sammelsystem eingesetzt werden sollen, wurden ausgeführt.
 - Die Wiederfindung von Sporen von *Aspergillus sydowii*, *Alternaria alternata/tenuissima*, *Cladosporium macrocarpum*, *Trichoderma longibrachiatum* und *Tritirachium sp.* wurde auf 2 verschiedene Arten von Membranen (Versapor®-1200 und Fiberfilm™ T60A20) mikrobiologisch und molekularbiologisch untersucht. Die Filter wurden entweder direkt auf Nährmedium aufgelegt oder es wurde versucht, die Sporen nach der Sammlung vom Filter abzuschwemmen. Zur Durchführung der molekularbiologischen Untersuchungen wurden Sporen von *A. brasiliensis* und zusätzlich zu den beiden oben genannten Filtern ein Versapor®-3000 und ein Zeflour PTFE Filter verwendet. Bisher sind die mikrobiologischen Wiederfindungsraten sehr variabel (zwischen ca. 5% - 80%) und es müssen hier weitere Versuche mit anderen Detergentien, Abschwemm- und Aufbaumethoden durchgeführt werden. Bei der molekularbiologischen Untersuchung liegt die Wiederfindungsrate wesentlich besser (zwischen 80%-100%) weil hier die gesamten Filter ohne Abschwemmen oder Auflegen zur Extraktion der DNA verwendet werden.
- 7 verschiedene Aerosolsammelgeräte (Biotest RCS High Flow, Merck MAS 100 NT®, Holbach MBASS30, Sartorius MD-8 airscan, Coriolis Luftpartikelsammler, PGP-GSP Sammelkopf, SKC Biosampler) mit 4 verschiedenen Sammelprinzipien wurden mit den Testaerosolen *A. brasiliensis*, *T. longibrachiatum*, *C. cladosporioides*, *P. commune*, *S. cerevisiae*, *B. amyloliquefaciens* und soweit die Sammlung möglich war mit *Bacteriophage Lambda* in der Bioaerosolkammer getestet.
 - Vergleichend zu den Sammelsystemen wurden Sedimentationsschalen an verschiedenen Positionen in der Kammer positioniert und die KBE/Zeiteinheit bestimmt. Hier ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen KBE/Zeiteinheit und der berechneten Anzahl an Sporen in der Kammer.

Arbeitspaket 4

- Adaption bzw. Produktion von pyrogenfreien Sammelmedien (8-well-Streifen, Glasfaserfilter) für die Sammlung von pyrogenen Stoffen
- Vernebelung von *E. coli* in Bioaerosolkammer als pyrogene Quelle
- Versuchstest zur Sammlung von Bakterien und Pilzen mit dem MBASS30 + AS100 Sammelsystems
- Sammlung von *E. coli* auf Glasfaserfiltern und in 8-well Streifen zur vergleichenden Auswertung
- Auswertung der Ergebnisse mittels LAL-Test und PyroDetect System
 - Ersichtliche Unterschiede zwischen negativ Kontrolle und beaufschlagtem Sammelmedium
 - Unterschied jedoch nicht signifikant

Arbeitspaket 5

- Es gibt zwar erste Test der Sammlung von allergenen Stoffen mit dem MBASS30 + AS100 System jedoch keine standardisierte Etablierung. Tests mit dem System in der Bioaerosolkammer lieferten mit Pilzsporen keine reproduzierbaren Ergebnisse.
- Für die Etablierung eines standardisierten Protokolls für die Validierung einer Milbenallergen Sammlung fehlen:
 - Eine standardisierte physikalische und biologische Validierung des MBASS30 + AS100 Systems
 - Ein standardisierter Teststaub von Milbenallergenen in verschiedenen Konzentrationen (homogenisiert, Größenfraktionen bestimmt, getestet mit geeigneten Aerosolgeneratoren)

Arbeitspaket 6

- Als Standort eines Praxistests wurde ein Sektkellerei Betrieb in Klosterneuburg ausgewählt
- In den Projektjahren 1 und 2 wurden drei Probenahmen zu unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt. Innerhalb dieser Probenahmen wurden 4 Sammelgeräte (RCS High Flow, MD-8 Airscan, Coriolis μ Luftpartikelsammler, MAS-100 NT[®]) an 4 verschiedenen Standorten eingesetzt (Sekt Keller mit hoher zu erwartender Belastung, Besprechungsraum mit niedriger Belastung, Lagerhalle mit mittlerer Belastung, Außenluft-Kontrolle).
- In den Projektjahren 3 und 4 wurden in Kooperation mit dem MoldMold Projekt und einer Masterarbeit weitere vier umfangreiche Probenahmen durchgeführt.
- Es wurden alle in der Bioaerosolkammer getesteten Geräte mit dem Standardmedium in mehreren Wiederholungen miteinander verglichen.
- Ähnlich wie in der Bioaerosolkammer wurden Unterschiede in der Sammeleffizienz je nach Sammelgerät gefunden.

Arbeitspaket 7

- Daten zur physikalischen Validierung der Bioaerosolkammer wurden publiziert.
- Das Forschungsvorhaben wurde neben den UFT-internen Seminaren in 8 Vorträgen (national und international) präsentiert.
- Mitarbeiter des Projekts haben sich weiters an der Plattform „meine Raumlufat.at“ und an der VDI Arbeitsgruppensitzung für Bioaerosole beteiligt.
- Es wurden 4 Abstracts zu Vorträgen erarbeitet wobei einer bei einer internationalen Konferenz als Vortrag oder Poster präsentiert werden soll.
- Es wurden 3 Vorträge beim „Bioaerosol Chamber Expertenmeeting“, organisiert von der AUVA und der DGUV, gehalten (April 2016).
- Bei dem 30. Aerosol Technologie Seminar, veranstaltet von Palas[®] GmbH, werden die Ergebnisse im Rahmen von einem Vortrag präsentiert (September 2016).
- Konzepte für die Veröffentlichung der biologischen Validierung (Kontrollpunkte) und dem Vergleich der Sammelgeräte sind erstellt und Rohfassungen erarbeitet.

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

Die gemeinsam mit der Fa. PALAS® entwickelte Bioaerosolkammer am UFT Tulln ist unseren Wissens die einzige zugängliche Aerosolkammer, in welcher Luftkeim-Sammelgeräte getestet werden können. Wie auszugweise nachstehend aufgelistet, ist gerade die Allergenforschung im Gesundheitsbereich ein stark wachsendes Forschungsgebiet mit vielen jährlich neu publizierten Beiträgen (1;2), es gibt aber auch aktuelle Publikationen zu Gesamterfassungen von Bioaerosolen an bestimmten Messplätzen (3;4), neuen Sammelgeräten (5), Sammelgerätevergleichen (6;7), bzw. zu anderen methodischen Ansätzen zum Nachweis von Bioaerosolen und ihrer Zusammensetzung (8).

- (1) The role of molds in the relation between indoor environment and atopy in asthma patients. Emel Ceylan, Sibel Doruk, Sebahat Genc, Ayşe Aydan Ozkutuk, Fisun Karadag, Gul Ergor, Bahriye Oya Itil, and Arif Hikmet Cimrin. J. Res Med Sci. Dec 2013; 18(12): 1067–1073.
- (2) The role of fungi in diseases of the nose and sinuses. Zachary M. Soler, M.D., M.Sc. and Rodney J. Schlosser, M.D. Am J Rhinol Allergy. Sep-Oct 2012; 26(5): 351–358.
- (3) Bioaerosols from composting facilities—a review. Nathalie Wéry. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4: 42.
- (4) Temporal Variability of the Bioaerosol Background at a Subway Station: Concentration Level, Size Distribution, and Diversity of Airborne Bacteria. Marius Dybwad, Gunnar Skogan, and Janet Martha Blatny. Anal Bioanal Chem. Jan 2013; 405(1): 351–357.
- (5) Collection efficiencies of an electrostatic sampler with superhydrophobic surface for fungal bioaerosols. Han T., Nazarenko, Y., Liroy, P.J., and Mainelis, G. Indoor Air 2011; 21(2): 110-120.
- (6) A systematic comparison of four bioaerosol generator: Effect on culturability and cell membrane integrity when aerosolizing *Escherichia coli* bacteria. Zhen, H., Han, T., Fennell, D. E., Mainelis, G. Journal of Aerosol Science. 2014; 70: 67-79
- (7) Review of bioaerosols in indoor environment with special reference to sampling, analysis and control mechanisms. Ghosh B, Lal H, Srivastava A Environ. Int. 2015; 85:254–272.
- (8) Identifying indoor environmental patterns from bioaerosol material using HPLC. Sarah J. R. Staton, Josemar A. Castillo, Thomas J. Taylor, Pierre Herckes, and Mark A. Hayes. Anal Bioanal Chem. Jan 2013; 405(1): 351–357.

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

Bewertung der Ergebnisse anhand des Forschungsziels

Das Forschungsziel konnte mit dem Projekt in fast allen Punkten positiv erfüllt werden.

- Es konnte erfolgreich eine Bioaerosolkammer mit konstanten und standardisierten Bioaerosolkonzentrationen etabliert und getestet werden. Für den Betrieb wurden standardisierte Bedingungen etabliert.
- Es wurden standardisierte Protokolle für die Herstellung von Suspensionen verschiedener Organismen erarbeitet und diese unter kontrollierten Bedingungen als Aerosole in die Messkammer eingebracht.
- In der Bioaerosolkammer wurden verschiedene Luftkeimsammelsysteme mit unterschiedlichen Organismen getestet und die erhaltenen koloniebildenden Einheiten miteinander verglichen. Aus diesen Ergebnissen konnten verschiedene Eignungen zur Sammlung von Organismen abgeleitet werden.
- Durch die in der Biologischen Validierung der Messkammer etablierten Kontrollpunkte ist es möglich die biologische Sammeleffizienz von Sammelgeräten zu bestimmen und Messverfahren zu Überprüfen.
- Mit den etablierten Standardprotokollen ist es bereits möglich einheitliche Probeträger für Ringversuche herzustellen. Um die Palette an möglichen Testorganismen zu Erweitern und definierte Sporengemische reproduzierbar auf Probeträger zu bringen sind weitere Optimierungsschritte und das Ausarbeiten von Standardprotokollen nötig.
- In der Bioaerosolkammer konnten erfolgreich Sammelsysteme für die quantitative Sammlung und Weiterverarbeitung mittels DNA-Aufschluss getestet werden. In den Praxistest wurde gezeigt, dass ein großer Teil von Pilzen nicht über die Kultivierung nachgewiesen werden kann (siehe Endbericht Arbeitspaket 6).
- Der Vergleich der Kultivierungsmethoden mit Methoden die allergene oder pyrogene Substanzen nachweisen konnte nicht vollständig durchgeführt werden. Hierzu ist die Etablierung von weiteren standardisierten und getesteten Verfahren für den Allergen und Pyrogen Nachweis nötig. Nötige Schritte, Forschungsfragen und Ansatzpunkte konnte im Rahmen dieses Projektes erarbeitet und formuliert werden.

Bewertung der Ergebnisse anhand der Praxisrelevanz

Durch die Validierung der Sammelsysteme und Optimierung der Analyseverfahren entstehen erstmals die Möglichkeiten der standardisierten Beurteilung von Sammelmethoden hinsichtlich **quantitativer biologischer Sammeleffizienz und damit eine umfassenden Risikoabschätzung** bei der Bewertung von Arbeitsplätzen.

Die Forschungsergebnisse zeigen, dass der Organismus/ die Organismengruppe, die nachgewiesen werden soll, einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis einer Arbeitsplatzbewertung hat. Die Möglichkeit, die vorhandenen Organismen mittels Kultivierungsverfahren nachzuweisen (Keimrate, Anzuchtbarkeit auf Nährmedium, Empfindlichkeit gegenüber der Sammlung) ist von entscheidender Bedeutung. Die ausführlichen Keimraten-Bestimmungen zeigen, dass diese meist zwischen 30% bis 60%, oft aber auch nur 20% beträgt. Dies ist unbedingt bei der Beurteilung von gesammelten Proben zu beachten. Außerdem können viele Arten und Gattungen nicht mittels Anzuchtmethoden nachgewiesen werden. (vergl. Endbericht Arbeitspaket 6).

Aufgrund der unterschiedlichen biologischen Sammeleffizienzen der Luftkeimsammelgeräte für unterschiedliche Organismen hat die Wahl des Sammelgerätes ebenfalls einen großen Einfluss auf die und die unterschiedlichen Eignungen müssen bei der Risikoabschätzung berücksichtigt werden.

Im Endbericht Kapitel 3a wurde der Vergleich der Luftkeimsammelgeräte für jeden Organismus einzeln dargestellt. Die Messungen haben gezeigt, dass die Unterschiede zwischen den Sammelgeräten von den Eigenschaften der Organismen abhängen. Aus diesem Grund wurden die Organismen für die folgenden Graphen und Bewertungen in drei Gruppen zusammengefasst: **filamentöse Pilze** (*A. brasiliensis*, *T. longibrachiatum*, *C. cladosporioides*, *P. commune*), **Bakterien und Hefen** (*B. amyloliquefaciens*, *S. cerevisiae*, *E. coli*) und **Viren** (*BP. Lambda*).

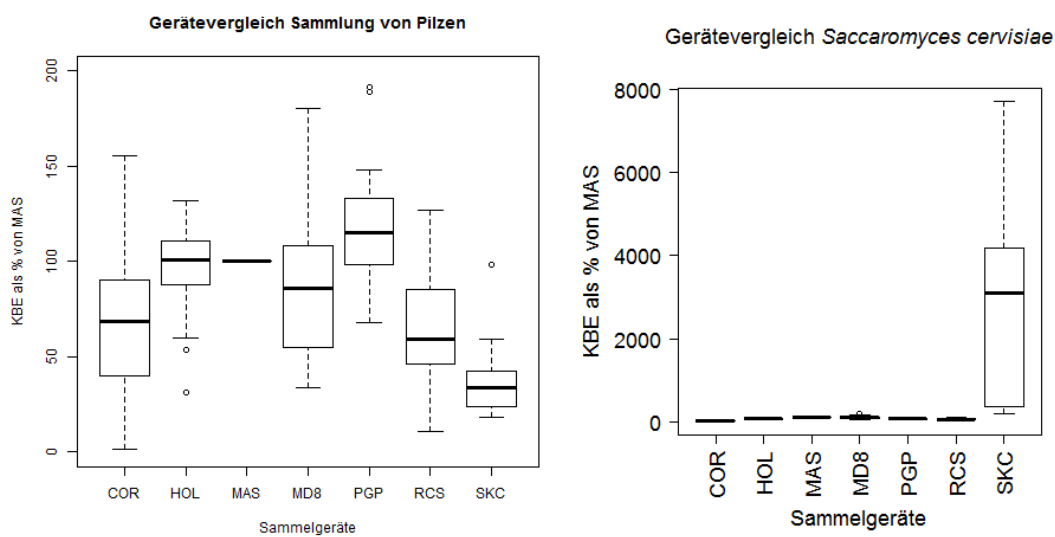


Abbildung 1 Vergleich der Sammeleffizienz der getesteten Luftkeimsammler bezogen auf das Referenzgerät MAS-100 NT® (Median MAS entspricht 100%), links: filamentöse Pilze (*A. brasiliensis*, *T. longibrachiatum*, *C. cladosporioides*, *P. commune*); rechts: *Saccharomyces cerevisiae*; COR – Coriolis μ , HOL – MBASS30, MAS – MAS-100 NT®, MD8 - MD8 Airscan, PGP – PGP-GSP Sammelkopf, RCS – RCS High Flow, SKC – SKC Biosampler

In Tabelle 1 ist die Gesamtbeurteilung der Geräte bezüglich ihrer Sammeleffizienz von verschiedenen Mikroorganismen und bezüglich des Aufwandes zur Probennahme und -verarbeitung schematisch dargestellt.

Gerät	Sammlung für Mikrobiologische Analyse von			Sammlung für molekularbiologische Analyse	Aufwand zur Probennahme und -verarbeitung
	filamentöse Pilze	Bakterien/Hefen	Viren		
MAS-100 NT					
Coriolis μ					
SKC Biosampler					
MBASS30					
RCS High Flow					
MD8 Airscan					
PGP-GSP Sammelkopf					

Tabelle 1 Zusammenfassung der getesteten Geräte zur Sammlung von Organismengruppen und für die molekularbiologische Analyse und der Handhabbarkeit (Handling). Einschätzung der Handhabbarkeit anhand der Erfahrungen im vorliegenden Projekt zur Mikrobiologischen Untersuchung; grün – beste Eignung, hellgrün – gute Eignung; Aufwand zur Probennahme und -verarbeitung: hellblau – geringer Aufwand, mittelblau – erhöhter Aufwand, dunkelblau – höchster Aufwand der getesteten Geräte

Die unterschiedlichen biologischen Sammeleffizienzen bei den getesteten Luftkeimsammelgeräten mit Kultivierungsverfahren und das Fehlen bzw. die geringe Abdeckung von Methoden zur Erfassung von allergenen Potentialen mittels geeigneter Sammelgeräte zur Weiterverarbeitung mittels ELISA oder DNA-Aufschluss erschweren die Beurteilung und die Risikoabschätzung auf Arbeitsplätzen.

Durch die Ergebnisse in diesem Projekt ist es möglich die biologische Sammeleffizienz von Luftkeimsammelgeräten zu bestimmen und das Gesundheitsrisiko anhand dieser Ergebnisse zu bewerten. Methoden zur Erfassung der Arbeitsplatzbelastung mit biologischen Stoffen, die nicht auf Kultivierung angewiesen sind, können mithilfe der Forschungsergebnisse getestet und validiert werden und bei der Entwicklung und Weiterentwicklung solcher Methoden kann auf die Forschungsergebnisse und entwickelten Methoden zurückgegriffen werden.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die aus dem Forschungsprojekt gewonnenen Informationen wurden und werden in Form von Publikationen veröffentlicht und zugänglich gemacht.

Die Etablierung des Betriebs einer dynamischen Bioaerosolkammer unter standardisierten Bedingungen ermöglicht:

- Die Validierung von verschiedenen Sammelsystemen auf Ihre Eignung zur Sammlung von biologischen Organismen (Pilze, Bakterien, Viren)
- Die Bestimmung der Effizienz von verschiedenen Sammelsystemen für den Nachweis von biologischen Organismen
- Den standardisierten Vergleich von Sammelsystem, Sammelmethode und Betriebsparametern von Sammelgeräten
- Die Erweiterung von standardisierten Testorganismen und Organismus-Gemischen
- Die Etablierung von standardisierten Protokollen zur Erstellung von einheitlichen Filtern oder anderen Sammelmedien für Ringversuche oder Verarbeitungs-Vergleichstests

Aus den gefundenen Ergebnissen müssen weitere Forschungsschwerpunkte formuliert und Richtlinien für den Nachweis und die Bewertung von Bioaerosolbelastungen überarbeitet werden.

- Formulierung von geeigneten Bioaerosolsammelgeräten für verschiedene Organismen
- Einbezug von Keimrate und biologischer Sammeleffizienz in Bewertungsprotokolle
- Bestimmung der Sammeleffizienz für Sammelgeräte (z.Bsp. für die Sammlung von allergenen und pyrogenen Stoffen oder die standardisierte Sammlung für quantitative PCS)

8. Anhang/Anhänge

- Anhang 1** **Kurzfassung in Deutsch**
- Anhang 2** **Kurzfassung in English**
- Anhang 3** **Umfassender Endbericht mit detailliertem Ergebnisteil**
- Anhang 4** **Publikation: „Evaluierung einer Prüfkammer für Bioaerosole“**
- Anhang 5** **Abstract's zu Vorträgen 2016**
„A new bioaerosol chamber for validation of bioaerosol samplers“ für EAC2016
“Tulln Bioaerosol Chamber” und „Comparison of Air Samplers” für AUVA-DGUV
Expertenmeeting April 2016

Literatur

ⁱ 8.924-173/07 aus Statistik Austria. Mehr gesunde Lebensjahre; Wirbelsäulenbeschwerden, Bluthochdruck und Allergien bereiten die größten Probleme. Ergebnisse der Gesundheitsbefragung 2006/2007.

ⁱⁱ Zureik, M., Neukirch, C., Leynaert, B., Liard, R., Bousquet, J., Neukirch, F. 2002. Sensitisation to airborne moulds and severity of asthma: cross sectional study from European Community respiratory health survey. *Bmj* 325:411-414.

ⁱⁱⁱ Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenbach, M. 2008. The Spectrum of Fungal Allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 145: 58-86.

^{iv} Milian, E., Diaz, A.M. 2004. Allergy to house dust mites and asthma. *P R Health Sci J.* 23(1):47-57.

^v Tovey, E.R., Chapman, M.D., Platts-Mills, T.A. 1981. Mite faeces are a major source of house dust allergen. *Nature* 289: 592-593.

^{vi} Pasanen, A.L. 2001. A review: Fungal Exposure Assessment in Indoor Environments. *Indoor Air* 11 (2001), 87-98

^{vii} Hofmann, R., Beck, E.M., Böhm, R., Danneberg, G., Gerbl-Rieger, S., Göttlich, E., Koch, A., Kühner, M., Kummer, V., Liebl, K., Martens, W., Missel, T., Neef, A., Palmgren, U., Rabe, R., Schilling, B., Tilkes, F., Wieser, P. 1999. Erfassung von luftgetragenen kultivierbaren Mikroorganismen aus Kompostierungsanlagen –Emission und Immission-. Schriftenreihe Kommission Reinhaltung der Luft im VDI und DIN, Band 30, 245-320.

^{viii} prEN 13205: Arbeitsplatzatmosphäre – Bewertung der Leistungsfähigkeit von Geräten für die Messung der Konzentration luftgetragener Partikel. Berlin: Beuth 1998.

^{ix} Stephan, U., Putz, S. 2012. Probenahme und Quantifizierung von antigenen und allergenen Schimmelpilzproteinen in der Luft. *Gefahrenstoffe – Reinhaltung der Luft*, Nr.6 2012, 274-281