

Evaluierung von Endotoxinproben – Vergleich von Analysen sowie Transport- und Lagerungsbedingungen durch standardisierte Proben

C. Pogner, M. Gorfer, A. Kolk

ZUSAMMENFASSUNG Die Inhalation von Endotoxinen in hohen Konzentrationen kann zu akuten und chronischen Erkrankungen führen. Deshalb ist vor allem an Arbeitsplätzen die Erhebung und – wenn möglich – die Reduktion der Konzentration wichtig. Für die Sammlung, Verarbeitung (Transport, Lagerung, Extraktion) und Analyse von Endotoxinen aus Luftproben an Arbeitsplätzen gibt es zurzeit jedoch keine umfassenden oder aktuell veröffentlichten Verfahren zu qualitätssichernden Kriterien und Maßnahmen. Das führt zu unterschiedlichen Methoden und nicht vergleichbaren Ergebnissen. In der Qualitätssicherung sind Ringversuche ein wichtiger Bestandteil für die Überwachung der Einhaltung von Standardverfahren bei der Analyse. Um die quantitative Nachweise von Endotoxinen zu vergleichen und Einflüsse durch Lagerung und Transport zu untersuchen, sind Proben notwendig, die kontrolliert und wiederholbar mit definierten Mengen an endotoxinhaltiger Luft beaufschlagt werden. Das in dieser Publikation beschriebene, entwickelte Prozedere erlaubt die gleichzeitige Sammlung von acht Proben unter kontrollierten Bedingungen in einer Bioaerosoltestkammer. Durch Wiederholungen kann damit eine Vielzahl von einheitlich beaufschlagten Filterproben hergestellt werden. Mithilfe solcher Proben konnten Einflüsse von Lagerungszeit und -bedingungen untersucht werden. In einem anschließenden Testringversuch bestimmten neun Labore die Endotoxinaktivitäten von Proben mit verschiedenen Staubkonzentrationen. Die Labore verwendeten zur Analyse jeweils das in ihrem Haus etablierte Standardverfahren. Während eine Lagerung bei Raumtemperatur von bis zu 14 Tagen keinen Einfluss auf das Ergebnis hat, konnte eine deutliche Reduktion der gemessenen Endotoxingehalte nach einer Lagerung der Extrakte bei -80 °C ermittelt werden.

1 Einleitung

Luft enthält eine Vielzahl von flüssigen oder festen Stoffen, die als Aerosole transportiert werden. Einige Aerosole biologischen Ursprungs, sogenannte Bioaerosole, können zu Beeinträchtigungen der Gesundheit führen. Zu diesen luftgetragenen Stoffen zählen auch Endotoxine, die sowohl am Arbeitsplatz als auch in der Umweltmedizin von gesundheitlicher Bedeutung sein können. Endotoxine sind Zellwandbestandteile von gramnegativen Bakterien, die bei deren Absterben freigesetzt werden [1]. Die Inhalation von Endotoxinen über die Atemluft kann zu Husten, Beeinträchtigung der Lungenfunktion, Fieber und grippeähnlichen Symptome führen. Eine wiederholte oder andauernde Belastung

Production of standardized endotoxin dust samples for comparison of transport, storage and analysis of workplace relevant samples

SUMMARY The inhalation of high concentrations of endotoxins can lead to acute and chronic diseases. Until now there are no extensive and up-to-date criteria and measures for quality control of sampling, processing (transport, storage, extraction) and analysis of endotoxin containing air samples. For quality control purposes, standardized samples have to be produced in a controlled and reproducible way with defined concentrations or endotoxin containing bioaerosols. In this project we developed a setup to produce eight samples simultaneously in a reproducible way to obtain a high number of uniform filter samples, by the use of a bioaerosol test chamber. Using these samples, we investigated storage and transport conditions. After that in a testrun of an interlaboratory trial endotoxin activity of the test samples was determined by nine laboratories. All participants of this trial used the well established method of their lab for extraction and analysis. Our results show, that storage of dust filter samples up to two weeks on room temperature had no significant reduction, but storage of extracts at -80°C showed clear reduction of measured endotoxin activity.

mit Endotoxinen in höherer Konzentration kann in akuten und chronischen Erkrankungen resultieren [2; 3]. Arbeitsplätze, an denen erhöhte Konzentrationen an Endotoxinen in der Luft auftreten können, befinden sich im Kräuter- und Getreideumschlag, in der Gemüse- und Baumwollverarbeitung, in landwirtschaftlichen Betrieben und in Biogas- und Bioethanolanlagen. Ebenso können Arbeitsplätze in abwassertechnischen Anlagen sowie Recycling- und Wertstoffsammlung erhöhtes Auftreten von Bakterien und deren Zerfallsprodukten aufweisen [4 bis 6].

Um die Gefährdung durch Endotoxine an Arbeitsplätzen abschätzen zu können, ist es notwendig, ihre Konzentration vor Ort zu erheben. Dafür sind die Sammlung vor Ort, die Verarbeitung der Proben im Labor und die Analyse notwendig. Als Standard-

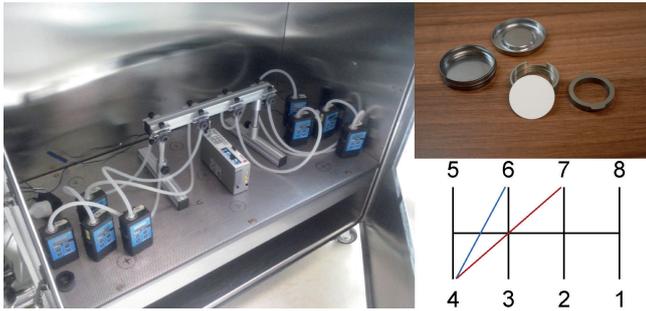


Bild 1 Aufbau der Sammelkopfhalterung mit angeschlossenen Pumpen in der Bioaerosolkammer CCB3000. Rechts oben: Filter mit Filterhalter und Transportdöschen; rechts unten: Schema der Position der Probenahmeköpfe und der kurzen (blau) und der mittleren (rot) Diagonale; Quelle: Autoren

verfahren für die Erfassung von Endotoxinen in der Arbeitsplatzatmosphäre in Deutschland gilt das in der IFA-Arbeitsmappe veröffentlichte Verfahren [7]. Die Luftprobe wird hier mittels Filtration gewonnen und die Endotoxinaktivität mit dem Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL)-Verfahren bestimmt. Aus Gründen des Tierschutzes, der Nachhaltigkeit und der besseren Reproduzierbarkeit durch geringere Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen wurden in den letzten Jahren alternative Verfahren zum LAL entwickelt, wie der rekombinante-Faktor-C (rFC)-Test oder der Monozyten-Aktivierungs-Test (MAT) [8; 9]. Da der rFC auf dem Faktor C der Gerinnungskaskade des LAL basiert, sind die Ergebnisse in einem gewissen Rahmen vergleichbar. Die neuen Verfahren sind jedoch noch nicht in der IFA-Arbeitsmappe oder dem internationalen Standard [10] eingearbeitet. Zurzeit gibt es außerdem noch keine vorgeschriebenen qualitätssichernden Kriterien und Maßnahmen für die Messung von Endotoxinen der Arbeitsplatzatmosphäre. Ringversuche, mit denen die Analysequalität von Laboren, die solche Messungen durchführen, überprüft werden kann, fehlen bisher gänzlich. Lediglich im Bereich der pharmazeutischen und medizinischen Produkte werden für den Nachweis von Endotoxinen regelmäßig Ringversuche zur Qualitätssicherung durchgeführt. Aufgrund der sehr unterschiedlichen Konzentrationsbereiche und Matrizes sind diese für die Überprüfung der Analysequalität von Arbeitsplatzproben nur bedingt geeignet.

Analyseergebnisse von Umweltproben können sehr stark schwanken; dadurch kann es zu signifikanten Variationen bei der Belastungsbeurteilung kommen [2; 6]. Auch die Lagerung und der Transport von Proben oder Extrakten können die Ergebnisse beeinflussen. Obwohl es sich hier um entscheidende Kriterien für die Qualität der Analysen handelt, sind diese Themen bisher nur ungenügend betrachtet worden [5; 11]. Um Qualitätskontrollen des Sammel- und Analyseverfahrens durchführen zu können und Einflüsse von Transport, Lagerung und Extraktion zu untersuchen, sind standardisierte Proben nötig, die kontrolliert und wiederholbar mit bestimmten Mengen an endotoxinhaltigen Aerosolen beaufschlagt wurden.

In dem hier vorgestellten Projekt wurden Methoden entwickelt, mit denen kontrolliert und reproduzierbar eine Vielzahl an Proben mit einem Prüfstaub von Arbeitsplätzen beladen werden konnten. Mit diesen künstlich hergestellten, standardisierten Proben wurden die Einflüsse von Transport-, Lagerungsdauer und -bedingungen untersucht. Anschließend wurden in einem Test-

ringversuch äquivalente Testproben von neun Laboren untersucht und die Analyseergebnisse miteinander verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau und Bioaerosolkammer

Um eine Vielzahl von Proben mit gleichem Endotoxingehalt herstellen zu können, wurde das Multisammelsystem (Fa. MOTEC) in der Bioaerosoltestkammer CCB 3000 (Fa. PALAS) verwendet. Die Kammer und ihre Eigenschaften sowie ihre Eignung zur Herstellung einer homogenen Verteilung an Bioaerosolen für Testzwecke wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben [12 bis 14]. Nachdem die Kammer mit einer neuen Tür ausgestattet worden war, wurde die gleichmäßige Partikelverteilung mit der gleichen Methode wie 2013 [12] überprüft.

Für die Produktion von endotoxinhaltigem Staub wurde Schweinestallstaub als Prüfstaub eingesetzt. Dieser wurde durch die Sozialversicherung für Landwirtschaft, Forst und Gartenbau (SVLFG) gesammelt, homogenisiert und gemahlen. Die Korngrößenverteilung und Zusammensetzung des Schweinestallstaubes sind gut charakterisiert. Er enthält nachweislich Endotoxine und eine natürliche Mischung aus Substanzen, die an belasteten Arbeitsplätzen vorzufinden sind, und ist dadurch ein geeigneter Prüfstaub. Für die Produktion von luftgetragenen Schimmelpilzsporen wurden Sporen von *Cladosporium sphaerospermum* (ARWT1704) in 0,01 % Tween 20 (Sigma Aldrich) eingesetzt. Zur Herstellung der Sporensuspension wurden die Sporen mittels Filtration durch Glaswolle vom Myzel getrennt, durch vortexen (3 min, 2 700 rpm) vereinzelt und die Konzentration wurde anschließend durch mikroskopische Zählung bestimmt (C-Chip, Neubauer improved, INCYTO Co). Zur Erzeugung der Bioaerosole wurden die Aerosolgeneratoren RGB 1 000 für Staub (Fa. PALAS) und LSA für Sporen (CH Technology) verwendet [12; 13].

Das Multisammelsystem besteht aus einem Träger für acht Probenahmeköpfe, einem Ventilsystem (Fa. MOTEC) und einer Pumpe. Damit können alle acht Probenträger gleichzeitig beaufschlagt werden. Für die Sammlung von aerosolisiertem Staub wurden die Sammelköpfe GSP 3,5 (Fa. Laschke Messtechnik) eingesetzt und entweder mit acht einzelnen personengetragenen Pumpen (Gilian 5000, Fa. DEHA Haan & Wittmer) oder mit einer gemeinsamen Pumpe betrieben (RV3 Vakuumpumpe, Edwards). Die Aerosolsammlung erfolgte auf Quarzfaserfiltern für Staubproben (37 mm QMA, Whatman) oder Polycarbonatfilter für die Sammlung von Pilzsporen (37 mm, 0,4 µm Porengröße HTTC, Milipore).

2.2 Verarbeitung und Analyse der Proben

Für die Endotoxinmessung wurden Filter in Metall Dosen, Sammelköpfe, Glaswaren und Werkzeuge zunächst durch Backen bei trockener Hitze von 200 °C für 4 h von möglicherweise anhaftenden Endotoxinen befreit. Die Oberflächen der Aerosolkammer, Pumpen und der Aerosolgeneratoren wurden vor und nach jedem Versuch mit 70 % Ethanol gereinigt.

Zum Transport wurden die mit Staub beladenen Filter in passende Metall Dosen verpackt (Bild 1). Mit Prüfstaub beladene Filter und Negativkontrollen wurden in Erlenmeyerkolben im Horizontalschüttler mit 10 ml endotoxinfreiem Wasser extrahiert, 2 h schütteln bei 28 °C und 100 rpm. Die Extrakte wurden in Eproutvetten überführt (15 ml, Schott Duran), 10 min bei 28 °C und 1 000 rpm abzentrifugiert und die Überstände anschließend mit

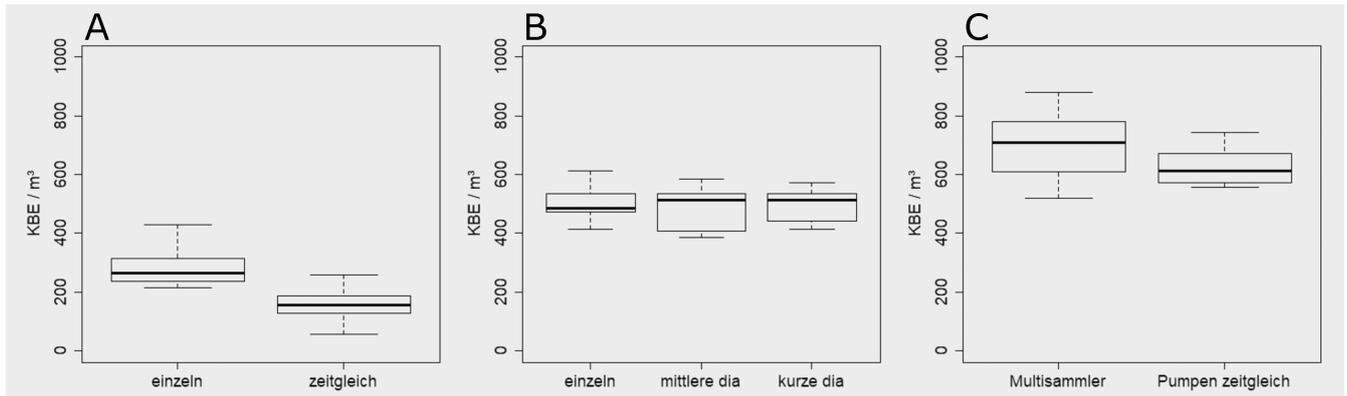


Bild 2. Ergebnisse der Evaluierung der Sammelkopfhaltung in der CCB3000 mit *Cladosporium sphaerospermum* und Gillian 5000 Pumpen, je Versuchsaufbau (Boxplot) wurden acht Filter getestet. A) Vergleich der Sammlung mit Pumpen zeitgleich bzw. nacheinander ($n = 16$); B) Vergleich der Sammlung einzeln bzw. über die mittlere und kurze diagonale ($n = 24$); C) Vergleich der zeitgleichen Sammlung mit dem Multisammler und acht einzelnen Pumpen ($n = 16$) Quelle: Autoren

dem Haemotox rFC Kit vermessen (Haemochrom Diagnostica AB). Die Fluoreszenzmessung erfolgte in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Synergy MX, BioTek am Austrian Institute of Technology (AIT) bzw. FLx808, BioTek am IFA). Die Messung wurde nach 60 min Inkubationszeit mit einer eingestellten RFU von 2 000 beim 0,05 EU/ml Standard durchgeführt.

Mit Sporen beladene Filter wurden auf festen Nährböden aufgelegt (MEA, Fa. Merck) und für fünf Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl an koloniebildenden Einheiten (KBE) pro Platte bestimmt und daraus die KBE/m³ berechnet [13].

2.3 Durchgeführte Versuche

Zur Evaluierung des Testaufbaus wurde zunächst die stabile und gleichmäßige Sammlung bei parallelem und seriellem Betrieb der Sammelköpfe mit Aerosolen von Schimmelpilzsporen überprüft. Anschließend wurde der Testaufbau mit Schweinestallstaub und Analyse mittels rFC überprüft (parallele Sammlung, eine Pumpe).

Für die Evaluierung von Transport und Lagerung wurden 16 Proben für den Versuch zum Transport und 64 Proben für den Lagerungsversuch mit der gleichen Konzentration an Schweinestallstaub beladen. Vier Transportproben blieben im AIT, die restlichen Proben wurden bei zwei verschiedenen Bedingungen, bei Raumtemperatur (RT) und gekühlt bei ca. 4 °C, versandt. Je acht Transportproben wurden nach drei Tagen gleichzeitig am AIT und am IFA analysiert.

Die Lagerungsproben wurden bei drei Bedingungen gelagert, in der Metalldose bei RT und 4 °C, sowie im Glasgefäß bei 4 °C (Überführung in die Glasgefäße direkt nach Eintreffen im Labor). Je vier Proben pro Lagerungsbedingung wurden nach drei, sieben, zehn bzw. 14 Tagen entnommen und gleichzeitig analysiert. Die Kontrollproben wurden direkt am Tag ihrer Herstellung am AIT extrahiert und analysiert (Lagerungsdauer = d0).

Für den Vergleich der Analyseergebnisse verschiedener Labore wurde ein Testringversuch durchgeführt. Dafür wurden 70 Filter mit drei verschiedenen Konzentrationen an endotoxinhaltigem Staub hergestellt. 22 Negativproben wurden direkt nach dem Backen verpackt, 24 Filter wurden mit einer geringen Konzentration von durchschnittlich 120 EU/m³ pro Referenzfilter und 24

mit einer hohen Konzentration von durchschnittlich 650 EU/m³ pro Referenzfilter, beaufschlagt. Bei jedem Sammelvorgang wurden acht Filter gleichzeitig beladen, davon wurden zwei Filter als Referenzfilter analysiert (insgesamt sechs Filter je Konzentration, vier Negativkontrollen). Neun Labore aus vier Ländern (Österreich, Deutschland, Frankreich und Vereinigtes Königreich) haben sich am Testringversuch beteiligt. Sie erhielten je zwei Filter jeder Konzentration (insgesamt sechs Filter). Zur Extraktion und Analyse der Proben wurden die in den jeweiligen Laboren etablierten Standardverfahren zur Bestimmung der Endotoxinaktivität verwendet.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Evaluierung des Versuchsaufbaus

Zur Evaluierung von Lagerungs- und Transporteinflüssen sowie zum Vergleich von Analysemethoden sind vergleichbare und reproduzierbare Probenträger nötig. Dafür sollten in einer Bioaerosolkammer mit einem Multisammler möglichst viele Filter ohne Störung des Systems und unter reproduzierbaren Bedingungen beaufschlagt werden. Für die Herstellung von möglichst gleichen Filtern sind geringe Abweichungen zwischen den Filtern einer Beladung sowie geringe Abweichung zwischen Wiederholungen des gleichen Experiments nötig.

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob zwischen zeitlich versetzter und gleichzeitiger Sammlung ein Unterschied bei der Beladung der Probenträger besteht. Dazu wurde ein Versuchsaufbau mit dem Multisammler und acht einzeln ansteuerbaren Pumpen gewählt (Bild 1). Als Testaerosol wurden Sporen von *Cladosporium sphaerospermum* verwendet, die auf Polycarbonatfiltern gesammelt wurden. Bei der Verwendung der gleichen Sporensuspension wurden bei zeitlich versetzter Sammlung im Mittel 20 KBE/Filter bzw. 290 KBE/m³ gesammelt und bei gleichzeitiger Sammlung durchschnittlich 12 KBE/Filter bzw. 170 KBE/m³ (Bild 2A). Die Standardabweichungen waren mit 28 bzw. 24 % bei beiden Versuchsanordnungen vergleichbar.

Anschließend wurde getestet, ob die Entfernung von zwei Probenahmeköpfen den Einfluss verstärkt. Als Abstände wurden die kurze und die mittlere Diagonale gewählt (Bild 1). Damit können bei gleichzeitiger Beaufschlagung von jeweils zwei Filtern nacheinander alle acht Positionen verwendet werden. Bei der

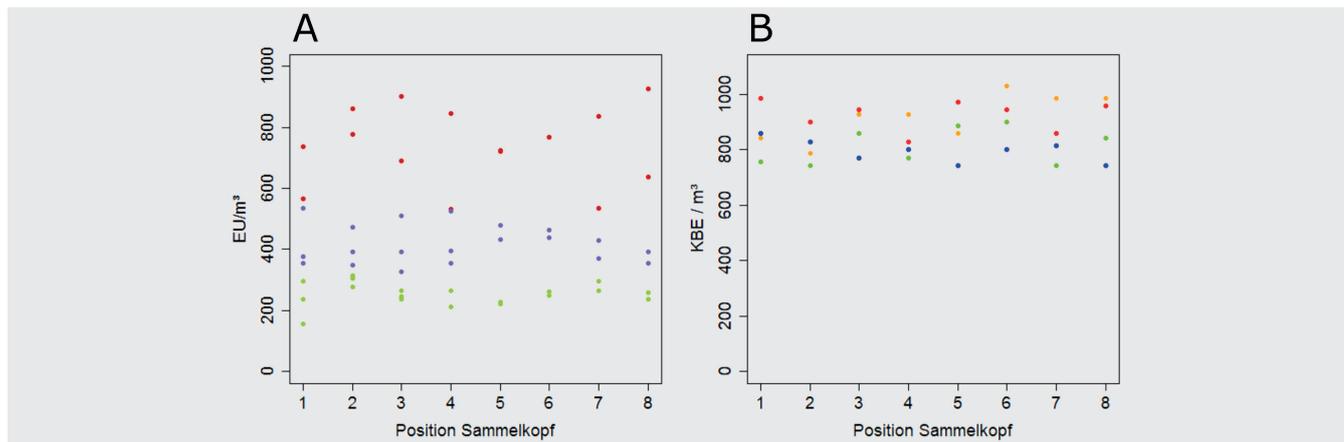


Bild 3. Ergebnisse der wiederholten Sammlung und Analyse von beaufschlagten Filtern. A) Drei Beaufschlagungen zu je acht Filtern mit unterschiedlichen Mengen an Schweinestallstaub; Je Filter wurden zwei Messungen mit dem Analysesystem Haemotox rFC durchgeführt; B) Vier Beaufschlagungen zu je acht Filtern mit der gleichen Konzentration von *Cladosporium sphaerospermum*; angegeben ist die Position des Sammelkopfes im Multisammler (x-Achse). Die Wiederholungen sind farblich gekennzeichnet. Jeder Punkt stellt das Ergebnis einer Einzelmessung dar. *Quelle: Autoren*

Verwendung der langen Diagonale zwischen den Positionen 4 und 8 wäre das nicht möglich.

Bild 2B zeigt die Ergebnisse aus der gleichzeitigen Sammlung mit zwei Pumpen bei unterschiedlichem Abstand zueinander (kurze und mittlere Diagonale). Es wurde kein Unterschied zwischen der Sammlung einzeln (35 KBE/Filter) oder parallel über die kurze (35 KBE/Filter) bzw. mittlere Diagonale festgestellt. Der Vergleich des Betriebes der Sammelköpfe gleichzeitig und getrennt zeigte keinen Unterschied in der Streuung der Ergebnisse (13, 12 bzw. 72 % relative Standardabweichung, standard deviation, sd). Im nächsten Schritt wurde die Sammlung mit acht Einzelpumpen mit dem Multisammler verglichen. **Bild 2C** zeigt, dass die Variation der KBE zwischen den Sammelköpfen beim Multisammler etwas höher war als bei den Einzelpumpen (relative sd: 17 bzw. 11 %).

Wir haben ebenfalls die Variation zwischen den Sammelköpfen untersucht. Bei gleichzeitiger Beaufschlagung war sowohl bei *Cladosporium* (**Bild 3B**, relative sd 6, 5, 8 bzw. 9 % für die vier Wiederholungen), als auch bei endotoxinhaltigem Schweinestaub gering (**Bild 3A**, relative sd 10, 12 bzw. 8 % für die drei Wiederholungen). Für die Unterschiede zwischen den Sammelköpfen konnte kein Muster erkannt werden, die Schwankungen scheinen nicht von der Position des Sammelkopfes abhängig zu sein. Die angegebenen Standardabweichungen stellen die Summe der Abweichungen dar, die sich durch die Verteilung in der Kammer, die Sammlung, Verarbeitung und Analyse der Proben ergeben. Eine Abweichung von 10 % liegt innerhalb der natürlichen Schwankungsbreite biologischer Systeme. Für die Herstellung von biologischen Prüfaerosolen stellt eine Abweichung dieser Größenordnung sehr gute Versuchsbedingungen dar. Aufgrund der Ergebnisse des Tests des Versuchsaufbaues, wurden alle folgenden Versuche mit gleichzeitigem Betrieb aller acht Probenahmeköpfe mit einer Pumpe und endotoxinhaltigem Prüfstaub durchgeführt.

3.2 Evaluierung von Lagerungs- und Transportbedingungen

Um den Einfluss des Transports auf den Endotoxingehalt von Filterproben zu überprüfen, wurden acht Filter bei zwei unter-

schiedlichen Temperaturen, ungekühlt und gekühlt bei ca. 4 °C, an das IFA versandt. Diese Proben wurden gleichzeitig mit den Kontrollproben am AIT extrahiert und analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass am IFA deutlich weniger Endotoxineinheiten gemessen werden konnten als bei den Proben ohne Transport (**Bild 4A**). Durch die Erschütterungen beim Transport wurden einige Döschchen teilweise geöffnet und es wird vermutet, dass dadurch Endotoxinmaterial verloren gegangen ist.

Um die Lagerungsbedingungen zu testen, wurden 64 Filter hergestellt, die Kontrollfilter (zwei je Sammelwiederholung) wurden am selben Tag am AIT extrahiert und gemessen (d0). Die restlichen Proben wurden versandt (ungekühlt bei Raumtemperatur (RT) und gekühlt bei ca. 4 °C) und unterschiedlich lange gelagert. Die Lagerungsbedingungen:

1. In der Metalldose bei Raumtemperatur,
2. Filter nach Ankunft in Glasgefäß überführt, Lagerung bei 4 °C,
3. Lagerung in der Metalldose bei 4 °C.

Die Überführung in ein Glasgefäß wurde getestet, um einen Einfluss durch mögliches Rosten der Dosen durch Kondenswasserbildung zu evaluieren. Für jede Kombination aus Lagerungsdauer und -temperatur wurden vier Filter analysiert. **Bild 4B** zeigt, dass die Lagerungsdauer keinen Einfluss auf den Endotoxingehalt der Proben hatte. Bei der Lagerung in der Metalldose konnten für die Temperatur nur geringe Unterschiede gefunden werden (433 EU/m³ RT, 498 EU/m³ 4 °C). Die Lagerung im Glasgefäß brachte keine signifikante Verbesserung (im Mittel 326 EU/m³). Die Betrachtung der Lagerungszeit zeigt für 4 °C an jedem Analysetag die höchsten Werte, alle Ergebnisse unterlagen jedoch hohen Schwankungen.

Aus den Ergebnissen der Transport- und Lagerungsversuche wurde das Standardprotokoll für die Herstellung der Ringversuchsproben erstellt. Die Metall Dosen mit Filtern werden nach der Beaufschlagung mit einem Klebefilm verschlossen und können bis zur Extraktion und Analyse bei Raumtemperatur bis zu 14 Tage trocken gelagert werden.

3.3 Durchführung eines Testringversuches

In einem Testringversuch sollten die Analyseergebnisse von verschiedenen Laboren miteinander verglichen werden. Neun La-

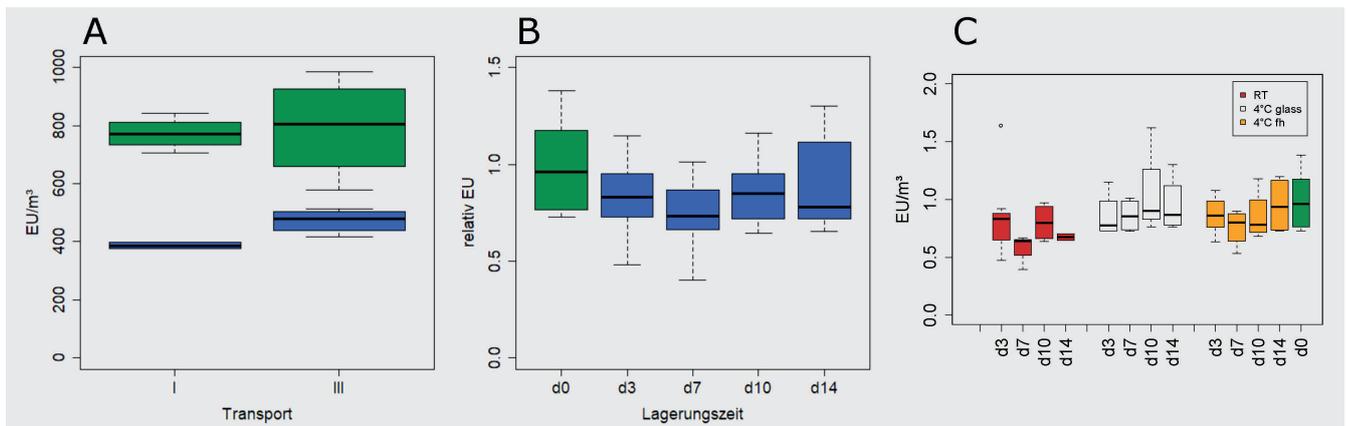


Bild 4. Ergebnisse des Transport- und Lagerungsversuchs. 80 Filter mit der gleichen Endotoxikonzentration wurden unterschiedlich gelagert und transportiert. A) grün – Ergebnisse Kontrollfilter (AIT), je 4 Filter, blau – Ergebnisse der Transportfilter (IFA), je 4 Filter; B) grün – Ergebnisse Kontrolle (d0, 16 Filter), blau Ergebnisse Lagerungszeit (d3 bis d14; je zwölf Filter) Ergebnisse relativ zu Kontrollfiltern (d0), C) Lagerungsbedingungen: I, rot) RT in Döschen, II, weiß) 4 °C in Glasgefäß, III, gelb) 4 °C in Döschen; Ergebnisse bei unterschiedlicher Lagerungszeit und -bedingung, je vier Filter, grün – Ergebnisse Kontrolle (d0, 16 Filter). *Quelle: Autoren*

bore nahmen am Versuch teil und erhielten je zwei Proben jeder Konzentration (Blindwert, gering, hoch). Die Proben waren anonymisiert, die zu messenden Konzentrationen wurden vorab nicht genannt. Das Sammelvolumen wurde angegeben, um die Berechnung der Ergebnisse in EU/m^3 zu ermöglichen. Zur Extraktion und Analyse wurden die jeweils in den Laboren etablierten Standardverfahren zur Bestimmung der Endotoxinaktivität eingesetzt. Die Ergebnisse gaben die teilnehmenden Labore als EU/ml (Rohwert) und als EU/m^3 (berechnetes Ergebnis) an. Als Referenz wurden von jeder Filter-Beaufschlagung in der Aerosolkammer zwei Filter als Kontrollproben verwendet (**Bild 5A**). Dabei wurden stets die gleichen Positionen am Multisammler für die Kontrollproben herangezogen. Als Blindwerte (Negativkontrollen) wurden vier unbeaufschlagte, aber ebenfalls vorbehandelte Filter extrahiert und analysiert.

Die teilnehmenden Labore verwendeten zwei verschiedene Testverfahren von vier verschiedenen Herstellern.

Die Negativkontrollen wurden mit zwei Ausnahmen von allen teilnehmenden Laboren (T1 bis T9) richtig bestimmt (je eine Probe von T1 und T6, **Bild 5B**). Die Ergebnisse für die hohe und die niedrige Konzentration (**Bild 5C** und **5D**) zeigten, dass T3 jeweils höhere Werte bei Verwendung des LAL-Tests als Analyseverfahren im Vergleich zum rFC-Test erhalten hat. Die Ergebnisse von T6 liegen, genau wie bei der Negativkontrolle, deutlich über dem Durchschnitt der anderen Labore und der Referenzergebnisse (außerhalb des Darstellungsbereiches).

Die Ergebnisse ohne die Werte von T3, LAL-Test und T6 zeigen, dass die meisten Ergebnisse im Bereich von 50 bis 200 % der Referenzwerte (rote Linien) liegen. Die Ergebnisse von T4 und T5 lagen bei beiden Konzentrationen unter der 50-%-Grenze. Aus den Protokollen der Labore wurde ersichtlich, dass die Überstände nach der Extraktion bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren worden waren. Dass Einfrieren zu Aktivitätsverlust bei Endotoxinen führt, ist bekannt [5; 15-18]. Für Staubproben von Arbeitsplätzen wird diese Vorgehensweise zur Beurteilung der Exposition deshalb nicht empfohlen.

Die Ergebnisse der rFC-Kits von beiden Herstellern lagen alle innerhalb des Toleranzbereiches von 50 bis 200 % der Referenz-

werte und zeigten deutlich geringere Schwankungen als Messungen mit dem LAL-Test.

Der Transport der beaufschlagten Filter zu den am Ringversuch teilnehmenden Laboren dauerte zwischen zehn und 14 Tage. Dies soll durch eine Änderung des Versands zukünftig beschleunigt und optimiert werden. Die Analyseergebnisse lagen überwiegend innerhalb der Grenzen von 50 und 200 % der jeweiligen Referenzwerte. Diese Grenzen und Endotoxinaktivitäten wurden somit als praktikabel für solche Probenvergleichsuntersuchungen angesehen und entsprechen den Toleranzen bei ähnlichen Ringversuchen, z. B. Endotoxinaktivität in der Qualitätskontrolle bei pharmazeutischen und medizinischen Produkten.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Gefährdungsbeurteilung am Arbeitsplatz, die Beurteilung von Arbeitsschutzmaßnahmen und Maßnahmen zur Belastungsvermeidung bauen auf möglichst genauen und nachvollziehbaren Kenntnissen der Expositionssituation durch belastende Agenzien auf. Arbeitsplätze mit hohen Konzentrationen an Endotoxinaktivität bergen für Beschäftigte ein erhöhtes Risiko des Einatmens von Endotoxinen, die so in die Atemwege gelangen und dort zu Immun- und Entzündungsreaktionen führen können. Nur durch vergleichbare Messungen ist eine genaue Bestimmung der Belastungssituation und Prävention von akuten und chronischen Erkrankungen möglich. Die Überprüfung der Endotoxinaktivität am Arbeitsplatz beginnt mit der Erfassung als Luftprobe vor Ort, wird beeinflusst durch Transport und Lagerung und endet mit der Analyse und Bestimmung der Endotoxinaktivität der Proben. Für die Qualität der Arbeitsplatzmessungen ist die Qualitätssicherung der Mess-, Transport- und Analyseverfahren unerlässlich.

Die Validierung eines Messverfahrens baut darauf auf, dass reproduzierbar standardisiertes Prüfmaterial in ausreichender Menge erstellt werden kann. Um das für endotoxinhaltigen Staub zu gewährleisten, wurde im hier vorgestellten Projekt ein Aufbau in einer Bioaerosoltestkammer zur Beaufschlagung von mehreren Quarzfaserfiltern eingerichtet und erfolgreich getestet. Dieser Aufbau ermöglicht eine kontrollierte und gleichmäßige Beaufschlagung von mehreren Probenträgern gleichzeitig, mit einer

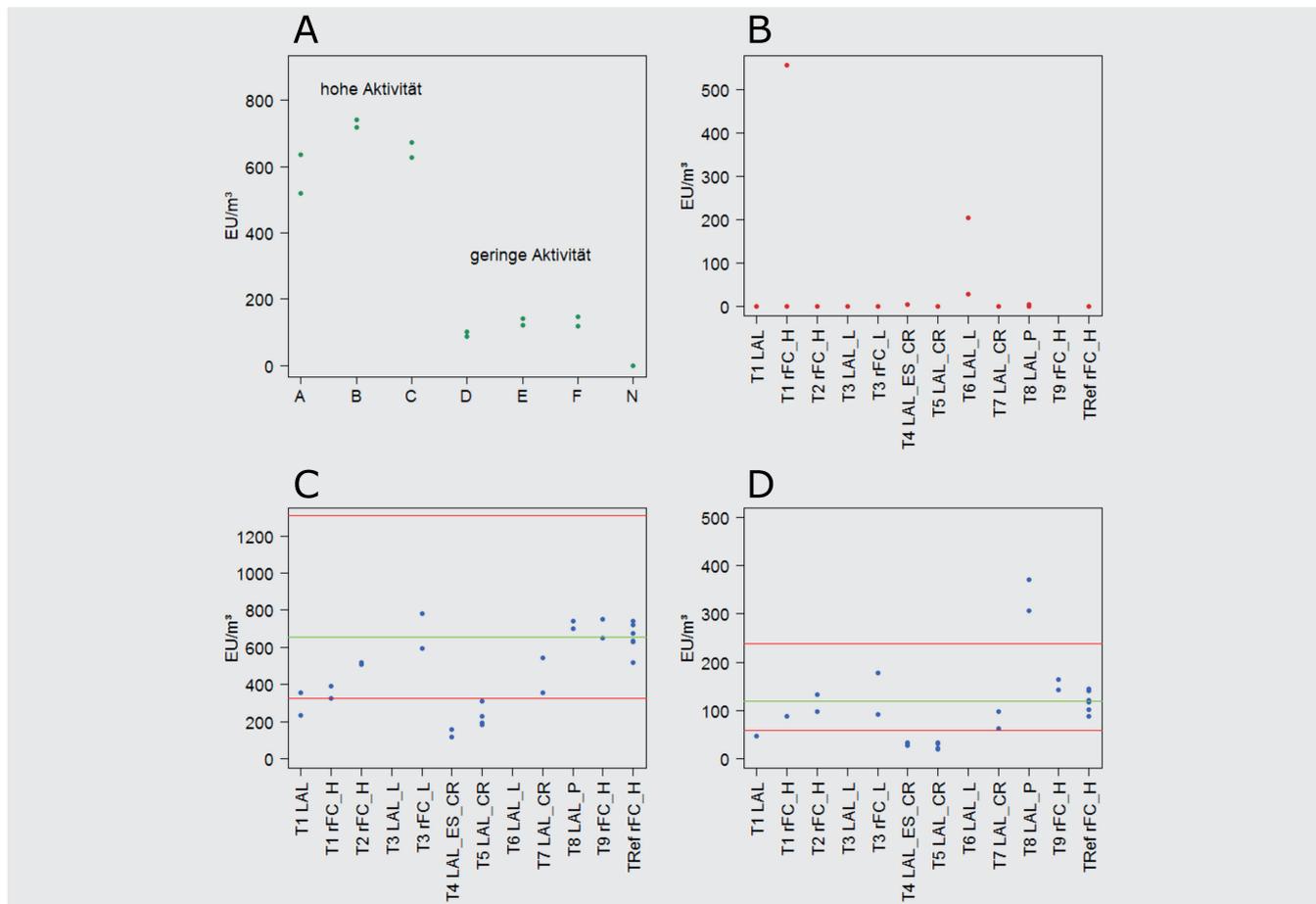


Bild 5. Ergebnisse des Ringversuchs: A) hohe und geringe Endotoxinaktivität (Referenzlabor); B) Negativproben der teilnehmenden Labore und Referenzwerte; C und D) Ergebnisse der Filter mit geringer und hoher Konzentration, ohne die Ergebnisse von T3 LAL und T6; grüne Linie – Median der Referenzmessungen, rote Linien – 50 und 200 % des Referenzmedian. *Quelle: Autoren*

kombinierten relativen Standardabweichung aus Aerosolerzeugung, Sammlung, Extraktion und Analyse von unter 10 %.

Mithilfe der standardisiert hergestellten Proben wurde der Einfluss von Transport und Lagerung evaluiert und die Grundlage für die Optimierung von Lagerungs- und Transportprotokollen für endotoxinhaltige Proben geschaffen. Die gezeigte Stabilität der Proben macht eine unkomplizierte Lagerung bei Raumtemperatur bis zu 14 Tage möglich.

Mit dem reproduzierbar hergestellten Probenmaterial ist es erstmals möglich, Ringversuche zur Endotoxinanalytik mit äquivalentem, arbeitsplatzrelevantem Ausgangsmaterial durchzuführen. Ringversuche bieten die Möglichkeit, die Qualität der Analyse und Gefährdungsbeurteilung zu sichern. Damit können Analyse-

labore ihre Ergebnisse vergleichen und die Qualität der Analyseergebnisse beurteilt werden. Im Testringversuch wurde ein deutlicher Einfluss des Extraktions- und Analyseverfahrens sowie des Lagerungsprozederes auf die Analyseergebnisse des jeweiligen Labors ersichtlich.

Zukünftig sollen weitere Ringversuche durchgeführt und durch unterschiedliche Schwerpunktsetzungen der Einfluss von Analyseprotokoll bzw. Labor klar herausgearbeitet werden. So kann z. B. durch Vorgaben zur Vorgehensweise bei Extraktion und Analyse, wie Extraktionsvolumen, Extraktionsbedingungen, Verdünnungsschritte und Analysesystem, nur die Varianz durch die Handhabung der Labore untersucht werden. Im vorgestellten Testringversuch wurde darauf bewusst verzichtet, um die jeweils etablierten Routineverfahren (inkl. Vorgehensweise zur Verdünnung) vergleichen zu können. Je nach Fragestellung, welche Vorgehensweisen und Analysen verglichen werden sollen, können dementsprechend mehr oder weniger umfassende Vorgaben gemacht werden.

Für die Qualitätssicherung der Endotoxinmessung an Arbeitsplätzen ist auch das Probenahmeverfahren ein bisher offener Punkt, da hierfür mit Blick auf endotoxinhaltigen Staub keine unteren und oberen Verfahrensgrenzen und Reproduzierbarkeiten in verschiedenen Belastungssituationen bekannt sind. Mit dem vorgestellten Verfahren zur gleichmäßigen und kontrollierten Be-

Tabelle 1 Im Ringversuch verwendete Testverfahren.

Test	Hersteller
rFC Test	Haemochrom (rFC_H) Lonza (rFC_L)
LAL Test	Lonza (LAL_L) ACC Pyrochrome (LAL_P) Charles River Endosafe (LAL_ES_CR) Charles River Endochrom (LAL_CR)

aufschlagung von Filtern ist auch die Überprüfung von Sammelverfahren möglich.

In einer Studie des Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS) in Frankreich wurden endotoxinhaltige Prüfaerosole aus Bakteriensuspensionen hergestellt und verschiedene Sammel-systeme für die Erfassung von Endotoxinen aus der Luft hinsichtlich ihrer Sammeleffizienz miteinander verglichen [11]. Ähnliche Untersuchungen könnten mit Stäuben oder Suspensionen auch für das Gesamtstaubprobenahme-System (GSP) durchgeführt werden. Ein kooperatives Projekt mit dem Vergleich beider Probenahmesysteme mit Suspensionen und Staub ist angedacht.

In allen Fragestellungen zur Sammlung, Aufarbeitung und Analyse von endotoxinhaltigen Luftproben von Arbeitsplätzen liefern die Ergebnisse des vorgestellten Projektes wertvolle Erkenntnisse sowie Vorarbeiten für weiterführende Vergleichsuntersuchungen zur Qualitätssicherung in diesem sehr speziellen analytischen Bereich.

DANKSAGUNG

Das Autorenteam dankt dem technischen Personal am AIT und IFA für die Mitarbeit in dem Projekt. Ein besonderer Dank geht an die Labore, die auf eigene Kosten am Ringversuch teilgenommen haben: Berufsgenossenschaft Nahrungsmittel und Gastgewerbe, Geschäftsbereich Prävention (D), Berufsgenossenschaft Nahrungsmittel und Gastgewerbe, Prävention Zentrallabor (D), Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (D), BMA Labor Bochum (D), Health & Safety Laboratory – Microbiology (E), Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der DGUV (D), Institut National de Recherche et de Sécurité, Laboratoire de Métrologie des Aérosols (F), Universität für Bodenkultur Wien, Department für angewandte Genetik und Zellbiologie (A).

Literatur

- [1] Douwes, J.; Thorne, P.; Pearce, N.; Heederik, D.: Bioaerosol health effects and exposure assessments: Progress and prospects. *Ann. Occup. Hyg.* 47(2003) Nr. 3, S. 187-200.
- [2] Douwes, J.; Versloot, P.; Hollander, A.; Heederik, D.; Doekes, G.: Influence of various dust sampling and extraction methods on the measurement of airborne endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(1995) Nr. 5, S. 1763-1769.
- [3] Duquenne, P.; Coulais, C.; Bau S.; Simon, X.: Performances of the BC-112 NIOSH Cyclone for the measurement of endotoxins in bioaerosols: A Study in Laboratory Conditions. *J. Aerosol Sci.* 116 (2017), S. 92-105.

- [4] Duquenne, P.; Marchand, G.; Duchaine, C.: Measurement of endotoxins in bioaerosols at workplace: A critical review. *Ann. Occup. Hyg.* 57(2012) Nr. 2, S.137-172.
- [5] EN 14031:2003. Workplace Exposure – Determination of Airborne Endotoxins (CEN/TC 137).
- [6] Hartung, T.: The human whole blood pyrogen test – Lessons learned in twenty years. *Altex* 32 (2015) Nr. 2, S. 79-100.
- [7] Hermanns, J.; Bache, C.; Becker, B.; Loeschner, B. Montag, T.: Alternatives to animal use for the LAL-Assay. *Altex Proceedings*. Vol. 1 (2012), S. 81-84.
- [8] Linsel, G.; Kolke, A.: Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz (Kennzahl 9450). In: IFA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen Lfg.28/2002. Hrsg.: Deutsche gesetzliche Unfallversicherung e.V. (DGUV), Berlin. Erich Schmidt, Berlin 1989 – Losebl.-Ausg.
- [9] Konlechner, A.; Goller, S.; Gorfer, M.; Mölter, L.; Strauss, J.: Evaluierung einer Prüfkammer für Bioaerosolsammelsysteme. *Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft* 73 (2013) Nr. 11/12, S. 471-476.
- [10] Laitinen, S. K.: Importance of sampling, extraction and preservation for the quantitation of biologically active endotoxin. *Ann. Agric. Environ. Med.* 6 (1999) Nr. 1, S. 33-38.
- [11] Laitinen, S.; Kangas, J.; Kotimaa, M.; Liesivuori, J.; Martikainen, P. J.; Nevalainen, A. et al.: Workers' exposure to airborne bacteria and endotoxins at industrial wastewater treatment plants. *AIHA J.* 55 (1994) Nr. 1, S. 1055-1060.
- [12] Liebers, V.; Brüning, T.; Raulf-Heimsoth, M.: Occupational endotoxin-exposure and possible health effects on humans. *Am. J. Ind. Med.* 49 (2006), S. 474-491.
- [13] Liebers, V.; Brüning, T.; Raulf-Heimsoth, M.: Health effects due to endotoxin inhalation (review). *Arch. Toxicol.* 82 (2008) Nr. 4, S. 203-210.
- [14] Liebers, V.; Raulf-Heimsoth, M.; Linsel, G.; Goldscheid, N.; Düser, M.; Stubel, H. et al. Evaluation of quantification methods of occupational endotoxin exposure." *J. toxicol. Environ. Health* 70 (2007) Nr. 21, S. 1798-1805.
- [15] Milton, D. K.; Johnson, D. K.; Park, J.-H.: Environmental endotoxin measurement: Interference and sources of variation in the limulus assay of house dust. *AIHA J.* 58 (1997) Nr. 12, S. 861-867.
- [16] Pogner, C.; Konlechner, A.; Unterwurzacher, V.; Kolk, A.; Hinker, M.; Mölter, L. et al.: A novel laminar-flow-based bioaerosol test system to determine biological sampling efficiencies of bioaerosol samplers. *Aerosol Sci. Technol.* 53 (2019) Nr 4, S. 355-370.
- [17] Thorne, P. S.; Perry, S. S.; Saito, R.; O'Shaughnessy, P.T.; Mehaffy, J.; Metwali, N. et al.: Evaluation of the limulus amoebocyte lysate and recombinant factor C assays for assessment of airborne endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 (2010) Nr. 15, S. 4988-4995.
- [18] Unterwurzacher, V.; Pogner, C.; Berger, H.; Strauss, J.; Strauss-Goller, S.; Gorfer, M.: Validation of a quantitative PCR based detection system for indoor mold exposure assessment in bioaerosols. *Environ. Sci. Process. Impacts* 20 (2018), S. 1454-1468.

Clara Pogner,
Markus Gorfer,
AIT Austrian Institute of Technology, Tulln, Österreich.

Dr. Annette Kolk,
Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA), Sankt Augustin.