

Abschlussbericht zum Vorhaben
„AntigenSampling – Validierung des GSP
und des AS100 Sammelsystems für den
Antigennachweis an Arbeitsplätzen“

Projektnummer
DGUV: FP0413B
AUVA: WA118690/9100
AIT: SGP 09413)

Laufzeit

01.04.2019 – 28.02.2022

Bericht vom 10.05.2022

Autoren

DI Clara-E. Pogner
Dr. Markus Gorfer
Prof. Joseph Strauss
Dr. Ute Stephan
Stephanie Wollenberg

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

Aerosolgeneratoren

Sammlung der Pilzsporen

Bioaerosol-Testsystem

Nachweismethoden

Statistik und Interpretation der Ergebnisse

4. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Arbeitspaket 1

Test des Antigengehaltes verschiedener Stämme und Arten

Herstellung von reproduzierbarem, stabilem Ausgangsmaterial

Extraktion der Proben zur Bestimmung des Antigengehalts

Vergleich von wässriger Extraktion und Aufschluss

Arbeitspaket 2

Aerosolproduktion und Testkonzentrationen

Vergleich des AveX mit Sporenzählung und anderen Messverfahren

Vergleich ELISA direkt und nach Ausspülen

Mikroskopische Untersuchung der Mikrotiterstreifen

Arbeitspaket 3

Vergleich GSP und AS100 in verschiedenen Konzentrationen

Untersuchung von Einflüssen durch Lagerung auf die Proben

Untersuchung von Einflüssen durch Transport auf die Proben

Arbeitspaket 4

Beschreibung der Betriebsproben in Österreich und Deutschland

Conclusio zu Betriebsproben

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
 - Bachelorarbeit Stefan Seidl
 - Berichte Betriebsmessungen
 - Anmerkungen zu den Probenahmeverfahren
 - Literatur

Kurzfassung deutsch

Eine wiederholte Exposition gegenüber Bioaerosolen, kann bei ArbeitnehmerInnen zur Ausbildung von verschiedenen Erkrankungen führen. Allergisches Asthma, allergische Hauterkrankungen und allergische Alveolitis zählen zu den möglichen Berufserkrankungen. Die Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Bioaerosolkonzentrationen und Erkrankungen ist bis jetzt aber noch nicht geklärt. Ein Ansatz, um mehr Informationen darüber zu erlangen, ist der Nachweis von Schimmelpilzallergenen und –antigenen aus der Luft.

Ziel dieses Forschungsprojektes war es, zwei Systeme zur Sammlung von schimmelpilzhaltigen Aerosolen, die für eine nachfolgende Analyse mittels ELISA geeignet ist, miteinander zu vergleichen. Außerdem sollten die Systeme hinsichtlich ihrer Eignung für den Einsatz in Betrieben evaluiert und Protokolle zur Probenverarbeitung untersucht werden. Als Nachweis und Messparameter wurde die Antigenanalyse mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA Testkits herangezogen, der spezifisch für die Clade *Aspergillus versicolor* ist (AveX). Um kontrollierte Konzentrationen von schimmelpilzhaltigen Aerosolen zu erzeugen, kamen eine Bioaerosolkammer und zwei Aerosolgeneratoren zum Einsatz. Im Vorfeld zu den Vergleichssammlungen wurde die Spezifität des ELISA getestet und Einflüsse von Wachstumsbedingungen auf die für die Prüfungen ausgewählten Schimmelpilze untersucht.

Diese Vorarbeiten haben gezeigt, dass keine der zehn zur Verfügung stehenden Isolate, die als *Aspergillus versicolor* identifiziert worden sind, nach molekularer Identifizierung zu dieser Art gehören. Sie alle wurden nahen Verwandten aus der Clade *Aspergillus versicolor* und den Subcladen *versicolor* und *sydowii* zugeordnet. Die getesteten Wachstumsbedingungen zeigten unterschiedliche Einflüsse auf die Isolate, außerdem wurden unterschiedliche Antigengehalte pro Spore für verschiedene Vertreter der gleichen Art festgestellt. Es wurde beschlossen mit dem Isolat, weiterzuarbeiten, mit dem der AveX entwickelt wurde. Das Isolat wurde von der Stammsammlung ATCC erworben. Der Vergleich der zwei Sammelmethode wurde statt mit zwei *A. versicolor* Isolaten, mit dem *Aspergillus amoenus* (ATCC10072) und einem Isolat von *Aspergillus fumigatus* durchgeführt.

Im Projekt wurden zwei Probennahmesystem für die Sammlung luftgetragener Partikel untersucht und miteinander verglichen – das Gesamtstaubprobenahme (GSP) System, bei dem die luftgetragenen Partikel auf einem Teflonfilter gesammelt werden und das MBASS30 / AS100 System bei dem die Sporen in die Kavitäten eines Mikrotiterstreifens gesammelt werden. Die Tests mit *Aspergillus fumigatus* wurden in drei Konzentrationen, mit fünf Wiederholungen und einem Asp f 1 Allergen-ELISA durchgeführt. Für keine der Konzentrationen und Sammelsysteme konnten Werte über der Nachweisgrenze gemessen werden. Eine Erzeugung von höheren Konzentrationen war aufgrund der Einstufung des Organismus als Risikogruppe 2 nicht möglich. Die Tests mit *Aspergillus amoenus* wurden in sechs Konzentrationen und fünf Wiederholungen je Methode durchgeführt. Außerdem wurden je Konzentration drei Mikrotiterstreifen für eine Analyse nach Ausspülen der Streifen (indirekte Messung) erzeugt. Der Vergleich der Sammelsysteme zeigt, dass die direkte Messung in Mikrotiterstreifen früher Ergebnisse liefert als die indirekte Messung oder die Sammlung auf Teflonfiltern. Obwohl die Ergebnisse der indirekten Messung stets etwas niedriger waren als jene der direkten Messungen korrelieren beide Verfahren gut miteinander. Der Vergleich der direkten Messung in Mikrotiterstreifen und der Bestimmung der Teflonfilterproben zeigt, dass die beiden Sammelsysteme für unterschiedliche Konzentrationsbereiche geeignet sind. Mittels Filtrationsammlung können zirka 10-fach höhere Antigenkonzentrationen erfasst werden. Die Sammlung in Mikrotiterstreifen mit direkt nachfolgendem ELISA, ist sensitiver als die Filtersammlung.

Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich zum einen auf die sehr unterschiedlichen Aufnahmeflächen der beiden Sammelsysteme zurückführen und möglicherweise auch auf Probenverlusteffekte. Durch Messungen in zwei österreichischen und zwei deutschen Betrieben wurden diese Beobachtung bestätigt. Ein Test von Lagerungs- und Transportstabilität der Probenträger war geplant, konnte aber nur für die AS100 Streifen erfolgreich durchgeführt werden. Die Ergebnisse zeigen keinen Hinweis auf einen negativen Einfluss von Transport bzw. Lagerung von 21 Tagen.

Kurzfassung englisch

A repeated exposure to bioaerosols can lead to the development of various health problems for employees. Allergy induced asthma, allergenic skin diseases and allergic alveolitis are some of the examples, that count as occupational diseases. The dose-response relationship between bioaerosol concentrations and disease development is still not resolved. One approach to gain more information, is the detection of airborne mold antigens and allergen.

The goal of this study was to test and compare two sampling systems, suitable for collection of mold containing aerosols and subsequent analysis via ELISA. Additionally, both systems were evaluated regarding their practicability in the application in occupational settings and the respective protocols for sample processing were tested. As detection and measurement system, a commercial ELISA test kit (AveX), specific for the clade *Aspergillus versicolor*, was used. To produce controlled concentrations of mold containing aerosol, a bioaerosol chamber and two different aerosol generators were applied. Previous to the comparison experiments, the specificity of the ELISA and influences of growth conditions on the chosen fungal species, were investigated.

This preliminary work showed that none of the ten, at the beginning available isolates, which were identified as *Aspergillus versicolor*, belonged to the respective species. Rather, the molecular identification showed, that they are closely related and belonged to the clade *Aspergillus versicolor* and the subclades *versicolor* and *sydowii*. The tested growth conditions, showed different effects on the isolates. Additionally, isolates from the same species showed different antigen contents per spore. It was decided to continue the work with the one isolate, with which the ELISA kit was originally developed. This strain was purchased from the ATCC strain collection. Instead of comparing the sampling methods with two isolates of *Aspergillus versicolor*, the original strain (*Aspergillus amoenus*) and an *Aspergillus fumigatus* isolate were used.

In the project, two sampling systems for the collection of airborne mold particles were investigated and compared to each other. The Gesamtstaubprobenahme (GSP) system, which samples airborne particles onto a Teflon filter and the MBASS30 / AS100 system, which collects the spores in the cavities of a microtiter strip. The experiments with *Aspergillus fumigatus* were performed in three concentrations, with five repeats each and a commercial Asp f 1 allergen ELISA for detection. For none of the concentrations and sampling systems, concentrations above the detection limit could be measured. The production of higher concentrations of airborne spores was not possible in this case, as the species belongs to the risk group 2 organisms and production of spore dust was therefor not possible. The tests with *Aspergillus amoenus* were performed in six concentrations and five repeats each. Additionally, for each concentrations three microtiter strips for measurements of antigens after rinsing the cavities and collecting the liquid (indirect measurement), were produced.

The comparison of the sampling systems showed, that the direct measurement in microtiter strips gives results at lower concentrations than for the indirect measurement or the sampling on Teflon filters. Although the results of the indirect measurement were always lower than the results for the direct measurement, both correlate very well. The comparison of the direct antigen detection in microtiter strips and the one on Teflon filters show, that both systems are suited for different ranges of concentrations. With filtration, an about 10 fold higher concentration was measured. But the sampling in microtiter strips is more sensitive than the filter collection.

These observations are most probably a result of different absorption areas of the sampling systems and probably sample loss effects. In the measurement campaigns in two Austrian and two German occupational settings, these observations could be confirmed. The test of storage and transport influences on the sample containers was planned, but could only be accomplished for the AS100 microtiter strips. The results give no indication, that there is a negative effect of transport and storage for 21 days.

1. Problemstellung

In ihrem Berufsleben kommen ArbeitnehmerInnen mit einer Vielzahl von verschiedenen Stoffen in Kontakt, die in weiterer Folge zu Erkrankungen führen können. Laut dem Verband der deutschen Betriebs- und Werksärzte zählen neben Lärmschwerhörigkeit, Erkrankungen die auf Asbest zurückzuführen sind und Hauterkrankungen, allergische Atemwegserkrankungen zu den häufigsten Berufserkrankungen. Dazu gehören u.a. das allergische Asthma, die allergische Alveolitis und die schwere bzw. rückfällige allergische Hauterkrankung. Es entstehen hohe Kosten durch medizinische und berufliche Rehabilitationsmaßnahmen, Renten an die Erkrankten und Leistungen an die Hinterbliebenen (Ring et al. 2010).

Das gesundheitliche Risiko für die ArbeitnehmerInnen ist abhängig von ihrer individuellen Konstitution und Krankheitsgeschichte, aber vor allem auch der Menge, Konzentration und Art des allergieauslösenden Stoffes. Je nach Arbeitsumfeld sind die Allergenquellen, -Arten und -Konzentrationen unterschiedlich. Im ArbeitnehmerInnenschutz stellen luftgetragene Allergene ein besonderes Problem dar, da ihre Aufnahme vor allem über die Atemwege erfolgt (Ring et al. 2010) und eine Vermeidung der Aufnahme einen höheren Aufwand bedeutet. Im Gegensatz zu Kontaktallergenen ist eine empfohlene Allergenkenz im Betrieb schwerer möglich und erfordert oftmals umfangreiche und konsequente Lüftungstechnische Maßnahmen zur Reinigung der Luft bzw. den Einsatz von Hilfsmitteln wie z.B. Atemschutzmasken.

Ein regelmäßiger Kontakt mit und die Aufnahme von luftgetragenen allergisierenden Stoffen kann zu einer Sensibilisierung und im weiteren Verlauf zur Entwicklung von Allergien und akuten oder chronischen Folgeerkrankungen, wie z.B. chronischen Lungenerkrankungen führen (Douwes et al. 2003; Pabst et al. 2007). Diese bringen eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität und der Leistungsfähigkeit mit sich und führen zu deutlichen sozioökonomischen Belastungen (Ring et al. 2010).

Zu den bedeutendsten arbeitsplatzrelevanten luftgetragenen Allergenquellen gehören Schimmelpilzsporen. Insbesondere die 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 (Raulf et al. 2014). Auch an vielen Arbeitsplätzen kann es zu einer hohen Belastung der Luft mit Bioaerosolen kommen und die wiederholte Exposition zu einer Erkrankung der ArbeitnehmerInnen führen.

Beschäftigte können Schimmelpilzsporen und –bestandteilen in so unterschiedlichen Bereichen wie Abfallentsorgung und Recycling, Nahrungsmittelherstellung und -verarbeitung, Baugewerbe, Archive und Bibliotheken, aber auch Landwirtschaft und Gartenbau, in unterschiedlich hohen Konzentrationen, ausgesetzt sein (Geistlinger 2016; Schröer, Klus, and Stephan 2017). Auch Büroarbeitsplätze mit schlecht oder unzureichend gewarteten Lüftungstechnischen Anlagen können von Schimmelpilzbelastungen betroffen sein und in Folge bei Beschäftigten zu Allergieerkrankungen führen (Raulf et al. 2014).

In Bezug auf Konzentrationsschwellen, die nötig sind, um gesundheitliche Beschwerden bei Betroffenen auszulösen oder zu entwickeln, gibt es noch keine international anerkannten Grenzwerte oder Richtlinien. Ein Grund dafür ist die fehlende Dosis-Wirkungsbeziehung, die mit zurzeit angewandten Methoden zum Nachweis von Schimmelpilzen nicht entschlüsselt werden kann. Um die Konzentration von Schimmelpilzen an Arbeitsplätzen zu erfassen und Gesundheitsrisiken einschätzen zu können, stehen unterschiedliche Probenahme- und Analyseverfahren zur Verfügung. Mit klassischen Analysemethoden basierend auf Kultivierung (Erfassung der Koloniebildenden Einheiten) oder Mikroskopie (Erfassung der Sporenzahl auf Objektträgern) kann das Allergierisiko höchstens geschätzt werden, da zurzeit keine direkte Korrelation von Koloniezahl oder Sporenzahl zu gesundheitlichen Belastungen bekannt ist. Sowohl lebende und keimfähige als auch abgetötete Sporen können zu

Reaktionen bei Betroffenen führen. Da unterschiedliche Pilzarten jedoch verschieden starke allergisierende Wirkung besitzen, kann Anhand einer Gesamtsporenzahl ebenfalls nur eine Schätzung dieser Wirkung erfolgen.

Da die Zusammenhänge zur Entwicklung von Allergien und Atemwegserkrankungen noch nicht genau bekannt sind, sind möglichst genaue Messungen der Antigenkonzentrationen erforderlich. Bei dem zurzeit routinemäßig angewendeten Probenahmeverfahren für luftgetragene Allergene (z.B. durch das IFA der DGUV), erfolgt eine Sammlung auf Filter (z. B. Teflon) über mehrere Stunden, durch personengetragene oder stationäre Sammelsysteme (GSP Sammelkopf). Die Sammlung auf Filter erfordert vor der eigentlichen quantitativen Bestimmung der Allergenkonzentration die Extraktion der Allergene von den Filtern. Dabei sind Probenverluste und somit eine geringere Effizienz hinsichtlich des Allergennachweises nicht auszuschließen.

Auch kontinuierliche Expositionen gegenüber geringen Allergenkonzentrationen können individuell gesundheitlich relevant sein. Deshalb ist eine maximale Allergenausbeute, die schon bei der Probennahme berücksichtigt werden sollte, entscheidend. Da Antigene in der Luft häufig nur in geringen Konzentrationen vorliegen, wurde ein Probenahmeverfahren entwickelt (UA Holbach GmbH in Kooperation mit BMA-Labor GbR), welches eine hohe Durchflussmenge (100 L/min) und eine direkte Sammlung luftgetragener allergenhaltiger Partikel sowie unmittelbar anschließende Quantifizierung von Antigenen & Allergenen in den Kavitäten eines Mikrotiterstreifens ermöglicht (Stephan and Putz 2012). Mit diesem System können größere Probevolumina in kürzerer Zeit genommen und dadurch leichter mehrere Wiederholungen durchgeführt werden. Der Allergennachweis kann direkt im gleichen Reaktionsgefäß erfolgen oder nach der Extraktion von wasserlöslichen Allergenen / Antigenen mit signifikant verringertem Puffervolumen (im Vergleich zur Filter-Extraktion) durchgeführt werden.

Um Bioaerosolmessverfahren für ihre Eignung im praktischen Einsatz zu evaluieren, ist gemäß ISO EN 13098 „...die Bestimmung der Messunsicherheiten des Probenahmeverfahrens, der Probenkonservierung und der Analyseverfahren notwendig. Probenahme- und Analyseverfahren müssen validiert sein. Die Validierung von Verfahren für die Messung von Mikroorganismen kann durch den Mangel an Referenzmaterial und/oder Referenzverfahren eingeschränkt sein. Die Studie der Verfahrenscharakteristiken kann jedoch in Labor-Assays mit mikrobiellen Strukturen, flüssigen Lösungen und experimentellen Bioaerosolen beurteilt werden.“

Eine Validierung oder Evaluierung steht zurzeit weder für Biostoffe noch für die Probenahmeverfahren zur Antigenbestimmung zur Verfügung. Von Seiten des IFA (DGUV) besteht großes Interesse, das Probenahmeverfahren AS100 in der Messung von Schimmelpilzallergenen, Tierhaar- und Milbenallergenen, insbesondere bei Innenraumfragestellungen, einzusetzen. Dafür ist eine Evaluierung der Probenahme in verschiedenen Konzentrationen und der Reproduzierbarkeit der Sammlungen unerlässlich. Für die Qualitätserhaltung und Sicherstellung der Anwendbarkeit des Systems für die Prävention von Berufskrankheiten ist eine Validierung notwendig (ÖNORM EN 13098 2018). Erste Tests und vergleichende Sammlungen mit dem GSP und dem AS100 System wurden zum Vorkommen und zur Verschleppung von Rinderhaarallergenen (Bos d 2) in landwirtschaftlichen Betrieben in einer Studie des IFA (DGUV, AllMePro), sowie zum Vorkommen von Schimmelpilzantigenen in Archiven (Schröer, Klus, and Stephan 2017) durchgeführt und zeigten vielversprechende Ergebnisse.

Die Testung der Eignung des Systems soll, wie auch von der ISO/IEC 17025 (Anforderungen an das Qualitätsmanagement für Prüflabore) gefordert, unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Für Biostoffe in der Luft werden für solche Untersuchungen Aerosolkammern mit kontrolliertem Eintrag von biologischen Partikeln verwendet. Für die Prüfung mit Schimmelpilzaerosolen stehen keine kommerziellen, standardisierten Prüfmaterialien zur Verfügung. Sie müssen deshalb vor der Durchführung von Eignungstest zunächst selbst hergestellt und charakterisiert werden.

Das vorgestellte Projekt beschreibt ein Forschungsvorhaben mit dem Ziel, Materialien für die Überprüfung von Allergen- & Antigen-Bioaerosolmessverfahren zu erstellen und ein neues, sensitives und schnelles Allergensammelsystem (Impaktion in Mikrotiterstreifen) im Vergleich mit dem derzeit üblichen Sammelverfahren (Filtration) zu prüfen und zu beschreiben. Für die beiden Systeme werden die Grenzen der Antigensammlung (untere und obere Nachweisgrenze), der Einfluss von Transport und Lagerung auf die Proben und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Messunsicherheit) betrachtet. Im weiteren Projektverlauf werden in Betrieben Proben an verschiedenen Arbeitsplätzen genommen und analysiert. Nach dem Projekt sollen zwei Allergensammelverfahren zur Verfügung stehen, die unter verschiedenen Arbeitsplatzbedingungen eingesetzt werden können, um eine optimale Probennahme zu gewährleisten.

2. Forschungszweck/-ziel

Luftgetragene Sporen von Schimmelpilzen können schwere allergische Reaktionen bis hin zu Asthma auslösen. Um den komplexen Zusammenhang zwischen Konzentrationen von Allergenen/Antigenen und gesundheitlichen Faktoren besser zu verstehen, sind effiziente und sensitive Messungen an Arbeitsplätzen nötig. Ziel des vorliegenden Projektes ist es, zwei Sammelverfahren zu evaluieren und somit die Qualitätssicherung bei der Probenahme zu verbessern (gemäß ISO EN 17025, 13098).

Neben dem System, das bereits für die Sammlung anderer Stoffe routinemäßig am Arbeitsplatz eingesetzt wird (Sammlung auf Filter mittels GSP System), wird ein Verfahren getestet, das eine hohe Sammeleffizienz und einen geringen Probenverlust durch das Entfallen von Verarbeitungsschritten ermöglicht. Die Ergebnisse aus diesem Projekt sollen die Grundlage dafür liefern, die Probenahme von Antigenen und Allergenen aus der Luft am Arbeitsplatz als Standardverfahren für die Arbeitsplatzmessung in die IFA Arbeitsmappe aufzunehmen. Bisher gibt es dazu noch keine Beschreibungen von Probenahme und Verarbeitung. Der Einfluss von Lagerung und Transport auf die Proben soll eruiert und die Nachweisgrenzen der Sammelverfahren bestimmt werden um dadurch die möglichen Einsatzbereiche festlegen zu können. Um die Ergebnisse unter Praxisbedingungen zu überprüfen, sollen abschließend Messungen an belasteten Arbeitsplätzen durchgeführt werden.

Um ein standardisiertes, nachvollziehbares und für andere Labore reproduzierbares Vorgehen der Validierung zu gewährleisten, werden einerseits Standardprotokolle und andererseits ein handelsüblicher ELISA Kit (AveX, Indoor Biotechnologies) zur Analytik der Proben verwendet. Um eine definierte Prüfluft zu erzeugen, wird eine Bioaerosolkammer herangezogen (CCB3000, LSA-Aerosolgenerator und Grimm 11-C Partikelzähler). Als Antigenquelle werden Isolate aus der nahen Verwandtschaft von *Aspergillus versicolor* eingesetzt. Für die standardisierte Herstellung von Ausgangsmaterial zur Erzeugung der Prüfaerosole werden der Einfluss von Wachstumsbedingungen auf den Antigengehalt untersucht und Standardprotokolle abgeleitet.

Die standardisierte Herstellung von antigenhaltigen Schimmelpilzprüfaerosolen stellt die grundlegende Voraussetzung dar, um das komplementäre Projekt SchimmelAntigenDetect durchführen zu können, in dem sechs vom IPA (DGUV) entwickelte ELISA zum Nachweis von sechs Schimmelpilzarten evaluiert werden sollen. Ebenso werden die Ergebnisse zum Einfluss von Transport und Lagerung der Proben für die Behandlung der Antigenproben für die Erstellung eines Standardverfahrens zur Erfassung von Allergenen und Antigenen am Arbeitsplatz genutzt. Dieses Verfahren können in die IFA Arbeitsmappe aufgenommen werden und steht dem komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect zur Verfügung.

Ziel beider Forschungsvorhaben (AntigenSampling und SchimmelAntigenDetect) ist es, zur Verfügung stehende Systeme für die Sammlung von Proben und den Nachweis der zu detektierenden Messparameter (Antigen/Allergen) zu evaluieren und daraus Standardverfahren abzuleiten, die eine Bewertung der Allergenbelastung an Arbeitsplätzen ermöglichen sollen.

Die primären Zielgruppen sind somit Unfallversicherungsträger, ArbeitsmedizinerInnen, sowie Sachverständige und ForscherInnen. Durch die Evaluierungsergebnisse und den Einsatz der Systeme in der Praxis könnte ein weiterer Schritt in Richtung Dosis-Wirkungsbeziehung und effektiver Prävention gesetzt werden, um die Zahl der Erkrankungen und eventuellen Berufsunfähigkeiten aufgrund von luftgetragenen biologischen allergisierenden Stoffen zu reduzieren.

3. Methodik

Forschungskooperation

Das Projekt ist in enger Zusammenarbeit mit dem IFA der DGUV entstanden und wurde mit Einbezug des IFA und der AUVA 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 Rahmen von Aufträgen durch das akkreditierte BMA Labor Bochum durchgeführt. Zwischen dem BMA Labor Bochum und dem IFA besteht eine langjährige Zusammenarbeit und das Labor ist mit den Standardverfahren des IFA und der DGUV vertraut.

Weitere KooperationspartnerInnen könnten nach diesem Labor-Forschungsprojekt in einem Praxisprojekt mit Probanden und realen Arbeitsplätzen einbezogen werden.

Änderung der Arbeitspakete

- Arbeitspaket 1
 - 1.1 - Im ursprünglichen Arbeitsplan, sollten Unterschiede zwischen *Aspergillus versicolor* Isolaten untersucht werden. Die molekularbiologische Sequenzierung zeigte, dass es sich dabei nicht nur um unterschiedliche Isolate, sondern um unterschiedliche Arten handelt. Die ersten Versuche zu Einflüssen von Anzuchtbedingungen waren nicht eindeutig. Ein weiterer Stamm (ATCC 10072), mit dem der AveX entwickelt wurde, wurde bestellt und getestet. Weitere Versuche zur Sensitivität des AveX und Anzuchtbedingungen wurden durchgeführt. Die folgenden Aerosolversuche wurde ausschließlich mit dem ATCC 10072 durchgeführt.
 - 1.2 - 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.
- Arbeitspaket 2 – Die Etablierung von fünf unterschiedlich hohen Konzentrationen mit dem gewählten Aerosolgenerator (LSA) war nicht möglich. Es musste ein anderes System (RBG) etabliert werden, um höhere Konzentrationen zu erreichen. SOPs wurden anschließend im Arbeitspaket 1 erarbeitet.
- Arbeitspaket 3
 - 3.1 - Bei den von den fünf Konzentrationen, geringsten konnten mit der direkten Messung der Mikrotiterstreifen noch Ergebnisse erzielt werden, nicht jedoch mit der Extraktion von Streifen oder Filtern. Um die untere Detektionsgrenze auszuloten, wurde eine sechste noch geringere Konzentration erzeugt, die Sammlung durchgeführt und die Probenträger analysiert.
 - 3.2 - Da der kommerziell erhältliche, traditionelle AveX ELISA zum Zeitpunkt der Lagerungsversuche von Hersteller nicht mehr angeboten wurde, wurde vom BMA Labor nur ein Set nach 21 Tagen verarbeitet.

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

	Arbeitspaket	Organismen	Abweichungen zum Arbeitsplan
AP1.1	Evaluierung von Einflüssen der Anzuchtbedingungen auf den Antigengehalt	7 Stämme der Clade <i>Aspergillus versicolor</i>	Einteilung der Stämme in 4 Arten nach molekularbiologischer Sequenzierung Bestellung des Stammes ATCC 10072 Test der Detektion durch den AveX Drei Versuche mit Anzuchtbedingungen durchgeführt
AP1.2	Erstellung von SOP für die Herstellung von Ausgangsmaterial	<i>Aspergillus amoenus</i> Alle Organismen im Projekt SchimmelAntigenDetect	Zwei Methoden zur Material-herstellung waren nötig, um die verschiedenen Konzentrationen herzustellen. SOPs für die Herstellung von Staub wurden etabliert und die Stabilität des Staubes überprüft Die Aerosolproduktion aus Flüssigkeit und Staub wurde getestet
AP1.3	Erstellung von SOPs zur Probenverarbeitung und Extraktion – Evaluierung von Einflüssen auf den Antigengehalt	<i>Aspergillus amoenus</i> <i>Aspergillus protuberus</i>	Durchgeführt wie geplant
AP1.4	Vergleich von wässriger Extraktion und nach Aufschluss	<i>Aspergillus protuberus</i> ;	Durchgeführt wie geplant Zusätzliche versuche im Projekt SchimmelAntigenDetect
AP2.1	Test verschiedener Konzentrationen und Auswahl von fünf Konzentrationen	<i>Aspergillus amoenus</i>	Durchgeführt wie geplant Etablierung höherer Konzentrationen durch den Einsatz des RBG
AP2.2	Vergleich der Messung direkt und nach Ausspülen	<i>Aspergillus amoenus</i>	Durchgeführt wie geplant, in sechs Konzentrationen
AP2.3	Mikroskopische Untersuchung der Mikrotiterstreifen	<i>Aspergillus amoenus</i>	Durchgeführt wie geplant
AP3.1	Vergleich GSP und AS100 in 5 Konzentrationen und 6 WH	<i>Aspergillus amoenus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Durchgeführt wie geplant Eine weitere sehr niedrige Konzentration wurde auch getestet Nur die erste Versuchsreihe wurde ebenfalls mit den vom IPA entwickeltem <i>A. versicolor</i> ELISA analysiert Nur 5 Wiederholungen je Konzentration
AP3.2	Untersuchung von Einflüssen durch Lagerung auf die Proben	<i>Aspergillus amoenus</i>	Aufgrund der SARS-CoV2 Pandemie wurden die Proben versandt, um beim BMA extrahiert zu werden. Es kam dort zu Problemen in der Abarbeitung. Einflüsse der Lagerung auf das Probenmaterial wurde anhand des Staubes untersucht
AP3.3	Untersuchung von Einflüssen durch Transport auf die Proben	<i>Aspergillus amoenus</i>	Durchgeführt wie geplant
AP4	Durchführung von Arbeitsplatzmessungen in Österreich und Deutschland		Durchgeführt wie geplant

Änderung des Zeitablaufes

Der Zeitplan, der zur Projektplanung aufgestellt wurde, konnte aus mehreren Gründen nicht eingehalten werden und wurde adaptiert.

Generell kam es durch die COVID-19 Pandemie zu Einschränkungen in der Laborarbeit und dadurch zu einer Verzögerung der Projektarbeit. Mit dem Lockdown im Frühjahr 2020 waren durch die Umstellung von Lüftungsanlagen und die generelle Aufforderung zur Telearbeit, keine Versuche möglich. In der nachfolgenden Zeit konnte der Betrieb erst nach und nach wieder aufgenommen werden. Danach kam es im weiteren Verlauf der Pandemie zur Konkurrenz bei der Verteilung von Laborressourcen mit hoch priorisierten Projekten zur Reduktion von Viren.

In den Arbeitspaketen kam es zu spezifischen Abweichungen aufgrund des verwendeten Organismus und der Etablierung eines alternativen Verfahrens zur Aerosolproduktion, sowie dazugehörige SOPs.

- Arbeitspaket 1 – Die Unterschiede zwischen verschiedenen Arten der *Aspergillus versicolor* Clade und der Einfluss von Anzuchtbedingungen waren nicht eindeutig. Ein weiterer Stamm (ATCC 10072) wurde bestellt und getestet. Der Vergleich des Effekts des Aufschlusses von Proben wurde im komplementären Projekt über die gesamte Projektlaufzeit durchgeführt, um statistisch signifikante Daten zu erhalten
- Arbeitspaket 2 – Die Etablierung von fünf unterschiedlich hohen Konzentrationen mit dem gewählten Aerosolgenerator (LSA) war nicht möglich. Es musste ein anderes System (RBG) etabliert werden, um höhere Konzentrationen zu erreichen. SOPs wurden anschließend im Arbeitspaket 1 erarbeitet.
- Arbeitspaket 3 – Die Arbeiten mit *Aspergillus amoenus* wurden in zwei Versuchsreihen durchgeführt (2020 und 2021). Außerdem wurden die Arbeiten mit *Aspergillus fumigatus* im Rahmen einer Bachelorarbeit im Frühjahr 2021 durchgeführt.
- Arbeitspaket 4 – wurde in Österreich vorgezogen, da im Frühjahr 2021 die Situation der COVID-19 Pandemie dies zuließ und die Betriebe in Österreich zur Verfügung standen. Die Betriebe in Deutschland folgten Ende 2021 und Anfang 2022.

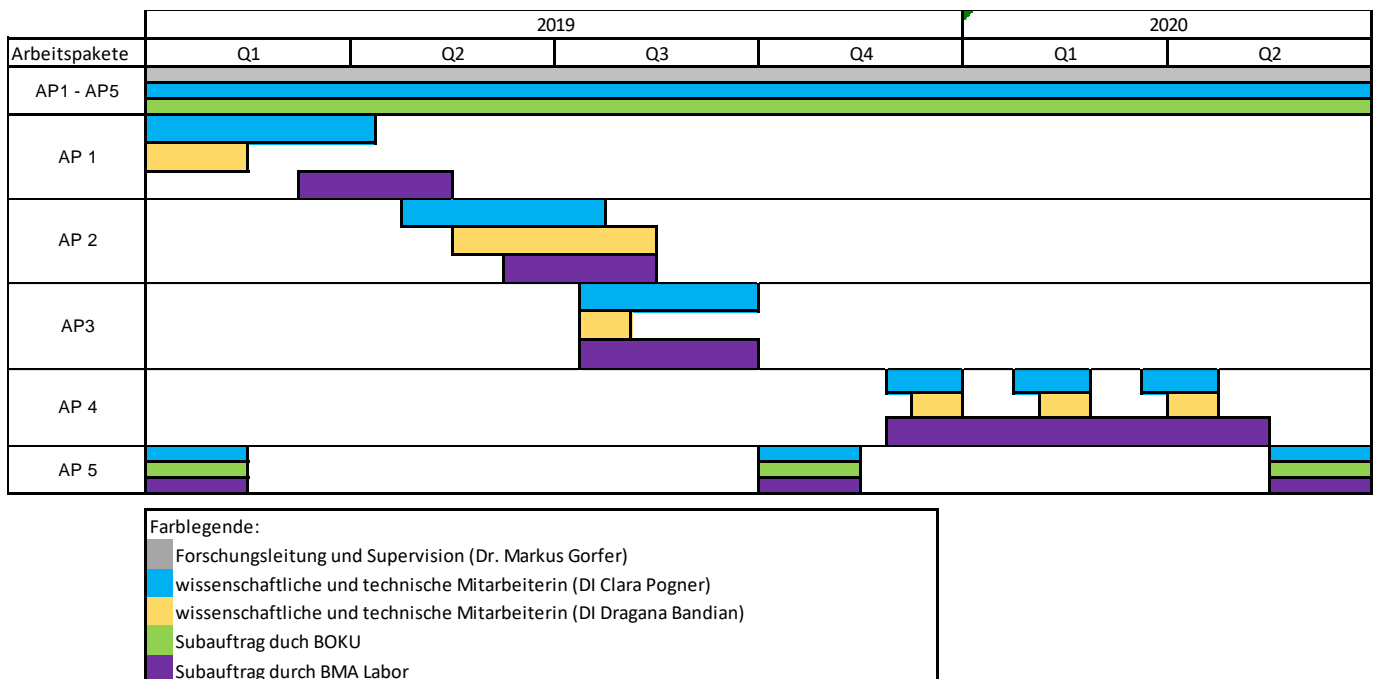


Abbildung 1 – Zeitplan laut Projektantrag

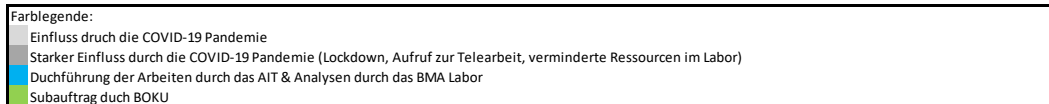
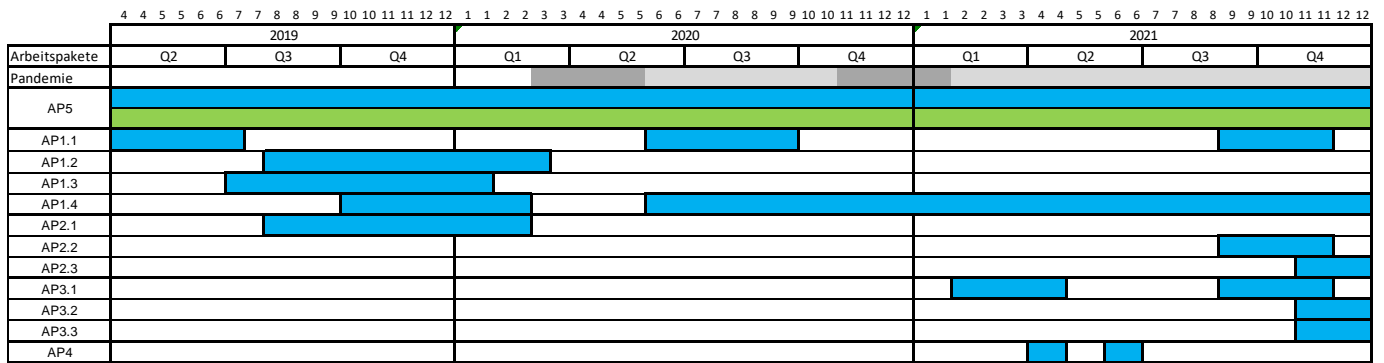


Abbildung 2 – geänderter Zeitplan Stand 2022-05-10

Verwendete Materialien und Methoden

Testorganismen und Herstellung des Ausgangsmaterials

Am Beginn des Projektes standen sieben Isolate des IFA zur Verfügung, die morphologisch als *Aspergillus versicolor* beschrieben wurden. Die Isolate wurden molekularbiologisch anhand der ITS-, EF1 α - und Beta-Tubulin-Region untersucht (Sequenzierung). Anhand der analysierten Ergebnisse wurden die Isolate vier *Aspergillus* arten innerhalb der Clade *Aspergillus versicolor* zugeteilt.

Da es sich bei keiner der Isolate um einen „echten“ *Aspergillus versicolor* gehandelt hat, wurde im Projektkonsortium beschlossen das Isolat aus der Stammsammlung ATCC, mit dem der AveX ELISA entwickelt wurde zu bestellen. Die Sequenzierung des Isolates ATCC 10072 ergab eine Zuordnung zu *Aspergillus amoenus*.

Nachfolgend wurden für Versuche zur Analyse des Einflusses von Anzuchtbedingungen, verschiedene *Aspergillus* Arten verwendet (*A. amoenus*, *A. creber*, *A. protuberus*). Für Versuche mit Aerosolproduktion wurde ausschließlich das Isolat ATCC 10072 herangezogen.

Für die Entwicklung des *Aspergillus versicolor* ELISA am IPA wurden gefriergetrocknete Sporen der Firma Allergon und Greer eingesetzt. Proben dieses Materials wurden zur Verfügung gestellt, ebenfalls sequenziert und der Art *Aspergillus amoenus* zugeordnet.

Um die Robustheit des AveX ELISA gegenüber anderen *Aspergillus* Arten und der *Aspergillus versicolor* Subclade *A. sydowii* zu testen, wurden außerdem *Aspergillus brasiliensis*, *nidulans*, *sydowii* und *tabacinus* eingesetzt.

Tabelle 2 – Übersicht über die verwendeten *Aspergillus* arten und deren Herkunft

Aspergillus Art	Stammbezeichnung	Herkunft
<i>Aspergillus amoenus</i>	LGA11	IFA
<i>Aspergillus puulaauensis</i>	RV007	IFA
<i>Aspergillus creber</i>	RV060	IFA
<i>Aspergillus creber</i>	RV096	IFA
<i>Aspergillus creber</i>	San#3	IFA
<i>Aspergillus creber</i>	San#4	IFA
<i>Aspergillus protuberus</i>	V27.11	IFA
<i>Aspergillus jensenii</i>	MB0839-7	AIT
<i>Aspergillus amoenus</i>	ATCC 10072	ATCC
<i>Aspergillus amoenus</i>	MY105	Greer
<i>Aspergillus amoenus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i> Batch 101507011	Allergon
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	DSM 1988	DSM
<i>Aspergillus nidulans</i>	HBit_F05	AIT
<i>Aspergillus sydowii</i>	ARWT1701	ARWT
<i>Aspergillus tabacinus</i>	RL590	BOKU

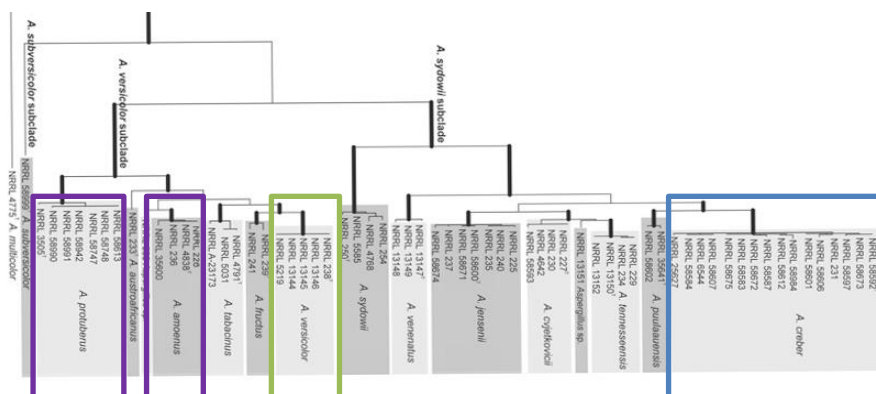


Abbildung 3 – Übersicht über die Verwandtschaftsverhältnisse der Arten der Clade *Aspergillus versicolor* nach Jurjevic, Peterson, and Horn 2012

Zur Aerosolherstellung wurde *Aspergillus amoenus* (ATCC 10072) in einem Labor der Schutzstufe 1 auf Malzextraktagar in Petrischalen angezogen. Das Pilzmaterial wurde mit einem Metallspatel in Puffer (1xPBS 0,01%Tween²⁰) 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.

Aerosolgeneratoren

Um die Aerosolkonzentration an verschiedenen Arbeitsplätzen darzustellen, waren 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), diese war allerdings nicht ausreichend. Es wurde ein weiteres Aerosolisierungsverfahren (RBG1000, Palas GmbH) für den Einsatz mit Pilzsporen ausprobiert und für das Projekt etabliert.

Die Notwendigkeit eine weitere Methode zur Aerosolproduktion in dem vorliegenden Projekt zu etablieren und alle notwendigen Überprüfungen durchzuführen, führte zu einer vermehrten Arbeit im Arbeitspaket 1.

Nach erfolgreichen Vortests mit dem RBG (Rotierender Bürstengenerator) wurde im komplementären Projekt „SchimmelAntigenDetect“ 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 RBG für drei höhere Konzentrationen verwendet.

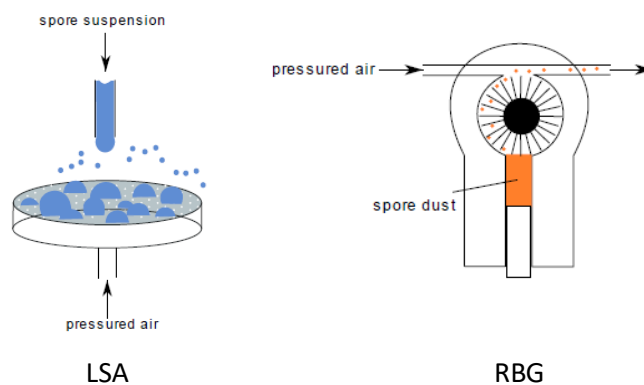


Abbildung 4 – Schematische Darstellung der verwendeten Bioaerosolgeneratoren; LSA – Liquid Sparging Aerosolizer, RBG – Rotating Brush Generator; Grafik adaptiert nach (Alsved et al. 2020)

Sammlung der Pilzsporen

Um den Aerosolstrom direkt nach den Aerosolgeneratoren aufzufangen, wurde eine Gaswaschflasche eingesetzt. Diese verwendet das Prinzip des Impingements um Aerosole abzuscheiden.

Um Proben der Pilzsporen in der Sammelebene herzustellen, wurde das für Arbeitsplätze bereits etablierte Filtrationssammelsystem GSP eingesetzt. Das System wurde mit dem Sammelsystem MBASS30 mit AS100 Sammelkopf direkt in Mikrotiterstreifen verglichen.

Gaswaschflasche

Die Sammlung des Aerosolstroms erfolgte in einer Gaswaschflasche (Schott Duran). Diese wurde mit 20 mL 1xPBS 0,01% Tween²⁰ Puffer gefüllt und der Aerosolstrom durch den Puffer geleitet. Es erfolgte keine aktive Ansaugung des Aerosolstroms sondern eine passive Sammlung des durch den Aerosolgenerator erzeugten Luftstroms.

Filter

Für die Filtration wurde das Gesamtstaubprobenahme-System eingesetzt. GSP 10 L Sammelköpfe wurden an Gilian 10i Pumpen angeschlossen und mit einer Flussrate von 10L/min gesammelt. Bei der gleichzeitigen

Beaufschlagung von zwei Filtern wurde eine RV3 Vakuumpumpe (Edwards) eingesetzt und der Gesamtdurchfluss auf 20 L/min eingestellt. Als Filter kamen Teflonfilter (FALP0037, Merck Milipore) zum Einsatz.

Die gesammelten Filter wurden nach der Beaufschlagung mit 5 mL Pufferlösung (1xPBS 0,01% Tween20) gewaschen. Für die Extraktion wurden verschiedene Protokolle ausgetestet, siehe Arbeitspaket 1 Extraktionsprotokolle. Die erhaltene Filter-Suspension wurde mit vier Analysemethoden untersucht: Sporenzählung (Mikroskop), Ausplattieren (KBE Bestimmung), qPCR und spezifische ELISA, siehe Kapitel Nachweismethoden.

Die gleichmäßige Sammlung mit GSP Sammelköpfen und dem Bioaerosol-Testsystem wurde bereits mit „Arizona Test Dust“ und Staub aus Schweineställen gezeigt (Pogner, Gorfer, and Kolk 2020). Am Beginn des vorliegenden Projektes wurde die gleichmäßige Sammlung nochmals mit Sporenmaterial von *Aspergillus protuberus* (v27.11) überprüft.

MBASS30

Der MASS30 verfügt über unterschiedliche Sammelköpfe um verschiedene Sammelmethode (Filtration, Impaktion) durchführen zu können. Einer dieser Sammelköpfe ist der AS100. Mit diesem kann direkt in einen 8-well Mikrotiterstreifen (F8 Maxisorp loose, Thermo Scientific) gesammelt werden. Diese Streifen können in einer ELISA Analyse eingesetzt werden. Die Sammlung erfolgt mit 100 L/min.



Abbildung 5 – MBASS30 Sammler mit AS100 Sammelkopf; Quelle: https://www.holbach.biz/en/seite_AS100_17_mikrobiologie.html

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), siehe Abbildung 6. 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).

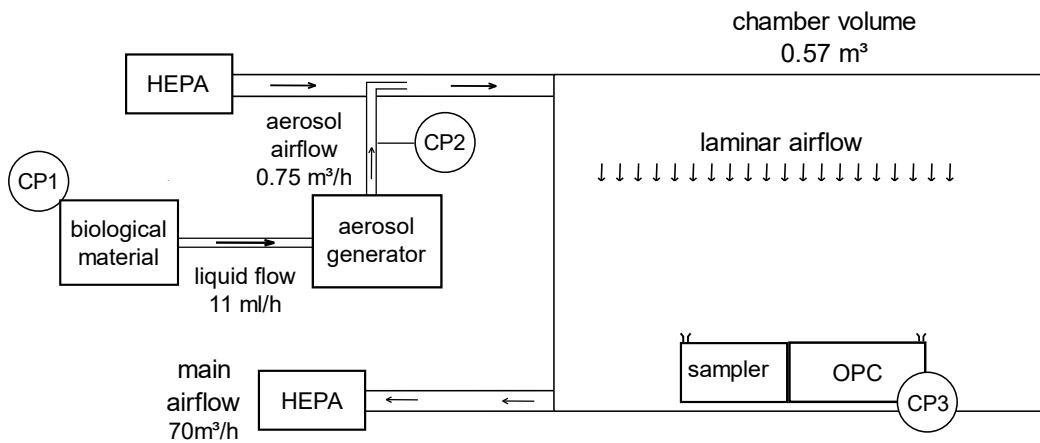


Abbildung 6 - Bioaerosoltestsystem mit eingezeichneten Kontrollpunkten (CP); CP1 – Ausgangsmaterial, CP2 – Aerosolstrom direkt nach dem Generator, CP3 – Partikelkonzentration im Prüfraum der Kammer

Um die beiden Sammelmethode (Filtration – GSP, Impaktion in Mikrotiterstreifen – MBASS30) miteinander zu vergleichen, wurden beide Systeme im Prüfraum der Aerosolkammer aufgestellt. Im Laufe des Projektes wurden zwei unterschiedliche Aufbauten eingesetzt. In Aufbau 1 wurden zwei GSP 10L Filtereinheiten und ein MBASS30 aufgestellt. Die Sammlung erfolgte nacheinander, das heißt zuerst sammelten die zwei Filtersysteme (10 L/min), nach Beendigung der Sammlung wurde eine drei Minuten Pause gehalten und dann das gleiche Luftvolumen mit dem MBASS30 (100 L / min) gesammelt. Durch den höheren Luftstrom sammelte der MBASS30 deutlich kürzer als die Filtersysteme. Statt zwei Gilian 10i Pumpen wurde auch die RV3 Vakuumpumpe eingesetzt.

In Aufbau 2 wurde ein Filter des GSP Sammel systems und zwei MBASS30 verwendet. Die Sammlung erfolgte gleichzeitig und für die gleiche Dauer. Durch die unterschiedlichen Luftströme ergab sich eine unterschiedliches Sammelvolumen, es wurde aber im Vergleich zu Aufbau 1 in der gleichen Luft gesammelt.



Abbildung 7 – Aufbau in der Testebene der Bioaerosolkammer mit Kontrollgeräten - Partikelzähler 11-C und Datalogger zur Aufzeichnung von Lufttemperatur und -feuchte;
 oben - Aufbau 1 mit zwei Filtersystemen und einem MBASS30, optional zwei Gilian 10i Pumpen oder eine RV3 (links), die Sammlung erfolgte sequenziell (unterschiedliche Dauer, gleiches Sammelvolumen); unten – Aufbau 2 mit einer Filtrationseinheit und zwei MBASS30, die Sammlung erfolgte gleichzeitig (gleiche Dauer unterschiedliches Sammelvolumen)

Nachweismethoden

Alle hergestellten Suspensionen, Ausgangsmaterial, Impingement des Aerosolstroms und Filter-Suspensionen, wurden mit vier Analyseverfahren untersucht. Die Analyse der Mikrotiterstreifen erfolgte entweder mittels ELISA direkt im Streifen oder nach Ausspülen der Streifen durch Sporenzählung und ELISA.

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.

AveX ELISA

Für die Immunologische Analyse der Proben wurde ein kommerzielles ELISA System eingesetzt – der *Aspergillus versicolor* spezifische ELISA AveX (Indoor Biotechnologies Ltd.). Der AveX detektiert ein bisher nicht näher definiertes, spezie-spezifisches Antigen, das in *Aspergillus versicolor* Kulturen vorkommt (Auszug aus der Indoor-Broschüre Juni 2010).

Der Hersteller gibt eine hohe Spezifität des ELISA an, Tabelle 3, dabei wurde jedoch aus der Gattung *Aspergillus* nur *Aspergillus fumigatus* betrachtet.

Tabelle 3 – Spezifitätsangaben zum AveX ELISA vom Hersteller; gemessen bei OD 405, Assay Hintergrund < 0,11

	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Stachybotrys chartarum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium expansum</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Chaetomium globosum</i>
5F5	1,38	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11
9A5	2,25	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11	< 0,11

Die ELISA Messungen von Suspensionen wurden laut Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für die direkte Messung von mit dem AS100 beaufschlagte Mikrotiterstreifen wurde das Protokoll adaptiert, indem der erste Antikörper weggelassen wurde und stattdessen die Probe mit 125 µL PBS Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Durch die Inkubation in Flüssigkeit erfolgte eine Bindung der Antigene an die Maxi-Sorb Oberfläche der Mikrotiterstreifen.

Testschritt		Direkter ELISA	
1	Coating:	Standard 1. Antikörper in Carbonatpuffer, pH 9,6, 100 µl/well; über Nacht, Kühlschrank	Probenextrakte 125 µl PBS/well, verschließen, kräftig schütteln (Vortex-Mischer); über Nacht, Kühlschrank
2	Waschen	PBS/Tween 20 (WP), 3 x 400 µl/well	
3	Absättigung	WP + 1% BSA, 100 µl/well, 30 min, RT, Schüttler	
4	Waschen	PBS/Tween 20 (WP), 3 x 400 µl/well	
5		Standard Verdünnung in Absättigungspuffer, 100 µl/well, 1 h, RT, Schüttler	Absättigung WP + 1% BSA, 100 µl/well, 1 h, RT, Schüttler
6	Waschen	PBS/Tween 20 (WP), 3 x 400 µl/well	
7	Nachweis	2. Antikörper Biotin-markiert in Absättigungspuffer, 100 µl/well, 1 h, RT, Schüttler	
8	Waschen	PBS/Tween 20 (WP), 3 x 400 µl/well	
9	Enzymkonjugat	Streptavidin-PO in Absättigungspuffer, 100 µl/well, 30 min, RT, Schüttler	
10	Waschen	PBS/Tween 20 (WP), 3 x 400 µl/well	
11	Substrat	ABTS in Citrat-Phosphatpuffer, pH 4,2, 100 µl/well, 5 – 7 min, RT, Schüttler	
12	Stoppen:	Na-Azidlösung, 100 µl/well	
13	Messung	405 nm	

Abbildung 8 –Durchführung der AveX ELISA laut original Protokoll des Herstellers und abgewandelt für die direkte Messung (links) – Auszug aus einem Bericht des BMA Labors.

Asp f1 ELISA

Für die Immunologische Analyse der *Aspergillus fumigatus* Proben wurde ein kommerzielles ELISA System eingesetzt – der Asp f1 spezifischer ELISA (Indoor Biotechnologies Ltd.). Das ELISA Kit beinhaltet monoklonale Antikörper gegen das *Aspergillus fumigatus* Allergen Asp f1.

Die Verarbeitung der Proben für die Analyse erfolgte wie für den AveX ELISA. Teflonfilter wurden immer in Puffer extrahiert. Mikrotiterstreifen wurden direkt gemessen.

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 dem sehr sensitiven FungiQuant Assay gemessen (Liu et al. 2012).

Tabelle 4 – 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

Für jede Messung wurde eine Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannten Konzentrationen an PCR-Produkt (ng / µL) und daraus berechneter Kopienzahl / µL mitgemessen. Für die Herstellung des 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 Programm: 95°C für 5 Minuten, 40 Zyklen von 95°C für 20 sec, 54°C für 20 sec, 72 °C für 30 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, Antigengehalt, 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)`), sowie lineare Modelle (`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.

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.

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 des GSP Sammelsystems für die Probennahme für ELISA Analysen und der Vergleich mit dem von der Firma Holbach entwickelten Sammelsystem direkt in Mikrotiterstreifen. Im Arbeitspaket 1 wurde die Grundlagen geschaffen, um kontrolliertes Probenmaterial zu erzeugen und in Arbeitspaket 2 wurde die Sammlung in Mikrotiterstreifen näher untersucht. In Arbeitspaket 3 wurden die Probenträger für den Vergleich der Sammelsysteme hergestellt und der Einfluss von Transport und Lagerung auf die beiden Systeme analysiert. Im Arbeitspaket 4 wurden Proben in Betrieben genommen. In Österreich erfolgten diese Betriebsmessungen in Kooperation mit der AUVA, in Deutschland wurden die Messungen vom IFA mitbetreut.

Die Analyse von Sporenzahl und koloniebildenden Einheiten von den hergestellten Suspensionen wurde vom AIT durchgeführt. Die Analyse mittels ELISA wurde im Subauftrag vom BMA Labor Bochum durchgeführt. Die molekularbiologischen Analysen (DNA Extraktion und qPCR) wurden am AIT durchgeführt und danach wurden alle Daten am AIT kombiniert und ausgewertet.

In Tabelle 5 ist eine Übersicht über die Arbeitspakete und die durchgeführten Arbeiten dargestellt. In den folgenden Kapiteln sind die Arbeiten und Ergebnisse im Detail beschrieben.

Tabelle 5 – Übersicht über die Arbeitspakete

<i>Abkürzung</i>	<i>Name Arbeitspaket</i>	<i>Durchgeführte Arbeiten</i>
<i>AP1.1</i>	<i>Test des Antigengehaltes von 7 Stämmen & Evaluierung von Einflüssen der Anzuchtbedingungen auf den Antigengehalt</i>	<i>Drei Versuche durchgeführt; Test von 7 Isolaten des IFA; Test von 4 Isolaten (3 vom IFA, 1 aus der Stammsammlung ATCC); Test des ATCC Isolates</i>
<i>AP1.2</i>	<i>Erstellung von SOP für die Herstellung von Ausgangsmaterial</i>	<i>Erarbeitung der Produktion von Sporenstaub und Untersuchung der Lagerfähigkeit des Materials</i>
<i>AP1.3</i>	<i>Erstellung von SOPs zur Probenverarbeitung und Einflüsse auf den Antigengehalt</i>	<i>Test von verschiedenen Extraktionspuffern und -Methoden</i>
<i>AP1.4</i>	<i>Vergleich von wässriger Extraktion und nach Aufschluss</i>	<i>In Kombination mit dem komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect durchgeführt</i>
<i>AP2.1</i>	<i>Test verschiedener Konzentrationen und Auswahl von fünf Konzentrationen</i>	<i>Etablierung von einer Konzentrationen mit dem Flüssigdispergierer und vier mit dem Staubdispergierer;</i>
<i>AP2.2</i>	<i>Vergleich ELISA direkt und nach Ausspülen</i>	<i>Test in sechs Konzentrationen; Ebenfalls Erfassung der Sporenzahl bei gespülten Proben; je Konzentration 3 gespülte und 5 direkt vermessene Proben</i>
<i>AP2.3</i>	<i>Mikroskopische Untersuchung der Mikrotiterstreifen</i>	<i>Je zwei Streifen von sechs Konzentrationen analysiert und fotografiert</i>

AP3.1	Vergleich GSP und AS100 in 5 Konzentrationen und 6 WH	Ergänzung einer sechsen, sehr geringen Konzentration; fünf Proben je Methode und Konzentration beaufschlagt und analysiert
AP3.2	Untersuchung von Einflüssen durch Lagerung auf die Proben	Material hergestellt, Probleme in der Analyse; Keine Daten für Filter, Keine Einflüsse auf Mikrotiterstreifen
AP3.3	Untersuchung von Einflüssen durch Transport auf die Proben	Kein deutlicher Einfluss auf Mikrotiterstreifen, keine Transportergebnisse für Filter
AP4	Durchführung von Arbeitsplatzmessungen in Österreich und Deutschland	Messungen auf zwei Betrieben in Österreich und zwei Betrieben in Deutschland durchgeführt; Analyse der ELISA Proben mit AveX und den vom IPA entwickelten ELISA

Arbeitspaket 1

Um geeignetes Material zur Erzeugung von Bioaerosolen und nachfolgender Sammlung für den Antigennachweis, zu produzieren sollte mit verschiedenen *Aspergillus versicolor* Isolaten aus Arbeitsplatzproben (bereitgestellt durch das IFA), der Einfluss von Anzuchtbedingungen getestet werden. Die Evaluierung der Isolate ergab, dass es sich um verschiedene *Aspergillus* Arten innerhalb der Clade *Aspergillus versicolor* handelte. Der Stamm, ATCC 10072, mit dem der AveX laut Hersteller entwickelt wurde, wurde nachbestellt und ebenfalls in die Versuche inkludiert.

Ein weiteres Verfahren zur Erzeugung der Aerosole, mittels Sporenstaub, wurde etabliert und Standardprotokolle entwickelt. Außerdem wurden verschiedene Extraktionsmethoden getestet, um die Antigene für den ELISA verfügbar zu machen.

Test des Antigengehaltes verschiedener Stämme und Arten

Am Beginn des Projektes standen mehrere Isolate von *Aspergillus versicolor s.l.* zur Verfügung (siehe

Tabelle 2). Diese wurden auf Nährböden angezogen und mittels Bestimmung der partiellen β -Tubulin Sequenz molekularbiologisch identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass die Isolate zu nahen Verwandten von *Aspergillus versicolor* gehören und den Subcladen *versicolor* und *sydowii* zuzuordnen sind (siehe Abbildung 3).

Der AveX ELISA, der zum Antigennachweis von *Aspergillus versicolor* verwendet wurde, wurde laut Hersteller mit dem Stamm ATCC 10072 hergestellt. Dieser Stamm wurde gekauft, angezogen und ebenfalls molekularbiologisch identifiziert. Ebenso wurde das Material, bezogen von Allergon bzw. Greer, mit dem der IPA *Aspergillus versicolor* ELISA hergestellt wurde, untersucht. Alle drei Isolate konnten als *Aspergillus amoenus* identifiziert werden. *A. amoenus* ist Teil der *A. versicolor* Subclade (siehe Abbildung 3).

Um einen groben Einblick in die Spezifität des AveX hinsichtlich der Gattung *Aspergillus*, der Clade *Aspergillus versicolor* und der Subclade *Aspergillus versicolor* zu erhalten wurden Isolate der verschiedenen Arten unter gleichen Bedingungen auf Malzextraktagar angezogen, Sporensuspensionen hergestellt und diese mit dem AveX gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass hohe Ergebnisse für ein Isolat von *Aspergillus amoenus* erzielt werden konnten. Ebenso wurde *Aspergillus creber* stark detektiert. Die Berechnung des Antigengehalts pro 1000 Sporen verdeutlicht diese Ergebnisse, siehe Tabelle 6. Zu beachten ist, dass dieses Experiment ohne Wiederholungen der Extrakte durchgeführt wurde. Unklar ist also, ob ein äußerer Einfluss für die hohen Ergebnisse für LGA11 und RV096 verantwortlich ist, oder beide Isolate so stark von dem AveX detektiert werden.

Tabelle 6 – Erkennen verschiedener *Aspergillus* Arten durch den AveX; eine Messwiederholung je Suspension; dl - Detektionsgrenze

<i>Aspergillus</i> Art	Isolat	Subklade	SC/mL	ng/mL	pg/1000 Sporen
<i>Aspergillus amoenus</i>	LGA11	versicolor	6,24E+08	15.560,0	24,94
<i>Aspergillus amoenus</i>	ATCC 10072	versicolor	1,44E+08	717,0	4,99
<i>Aspergillus protuberus</i>	V27.11	versicolor	3,96E+08	982,1	2,48
<i>Aspergillus tabacinus</i>	RL590	versicolor	1,37E+09	5.598,0	4,09
<i>Aspergillus puulaauensis</i>	RV007	sydowii	1,00E+09	880,2	0,88
<i>Aspergillus creber</i>	RV096	sydowii	1,93E+08	7.484,0	38,78
<i>Aspergillus jensenii</i>	MB0839-7	sydowii	7,48E+08	2.156,0	2,88
<i>Aspergillus sydowii</i>	ARWT1701	sydowii	8,93E+08	1.332,0	1,49
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	DSM 1988		5,50E+08	dl	
<i>Aspergillus nidulans</i>	HBit_F05		1,42E+08		

Um Einflüsse auf den Antigengehalt verschiedener Isolate zu untersuchen, wurden Test mit verschiedenen Anzuchtbedingungen durchgeführt. Im ersten Versuch wurden dafür nur die Isolate aus Betriebsproben des IFA eingesetzt. Im zweiten Versuch, stand der ATCC 10072 zur Verfügung und wurde mit drei anderen Isolaten verglichen. Im dritten Versuch wurde nur der ATCC 10072 genauer untersucht.

Für die Anzuchtbedingungen wurden unterschiedliche Medien, Lichtverhältnisse und Inkubationszeiten gewählt. Die Petrischalen wurden anschließend geerntet und die Sporendichte sowie der Antigengehalt bestimmt.

- Verwendete Nährmedien: *Aspergillus* Minimalmedium (AMM), *Aspergillus* Minimalmedium 1:10 verdünnt (AMMd), CzapekDox (CD), Dichloran-Glycerol 18%-Agar (DG18) und Malzextraktagar (MEA).
- Inkubationszeiten: 7, 14 oder 22 Tage (d7, d14, d22).
- Lichtverhältnisse: Dauerlicht oder andauernde Dunkelheit.

Das verdünnte Minimalmedium wurde nur im ersten Versuch eingesetzt. Da das Wachstum und vor allem die Sporulation zu gering war, um in den zählbaren Bereich der Sporenkonzentration zu kommen, wurde in allen weiteren Versuchen auf dieses Medium verzichtet.

Die Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten und den verwendeten Medien, siehe Abbildung 9. Die Daten zeigen, dass die Arten der Subclade *Aspergillus sydowii* (RV060, RV096, San#3, San#4) weniger stark vom AveX nachgewiesen wurden als die Arten *Aspergillus protuberus* (v27.11) und *Aspergillus amoenus* (LGA11), die der Subclade *Aspergillus versicolor* zugeteilt sind. Der Antigengehalt ist nur anhand der optischen Dichte der Sporenkonzentration berechnet. Deshalb kommt es zu sehr hohen Abweichungen zwischen den Wiederholungen. Außerdem ist von jeder Kombination – Isolat, Medium, Inkubationszeit, Lichtverhältnis – nur ein Replikat produziert worden.

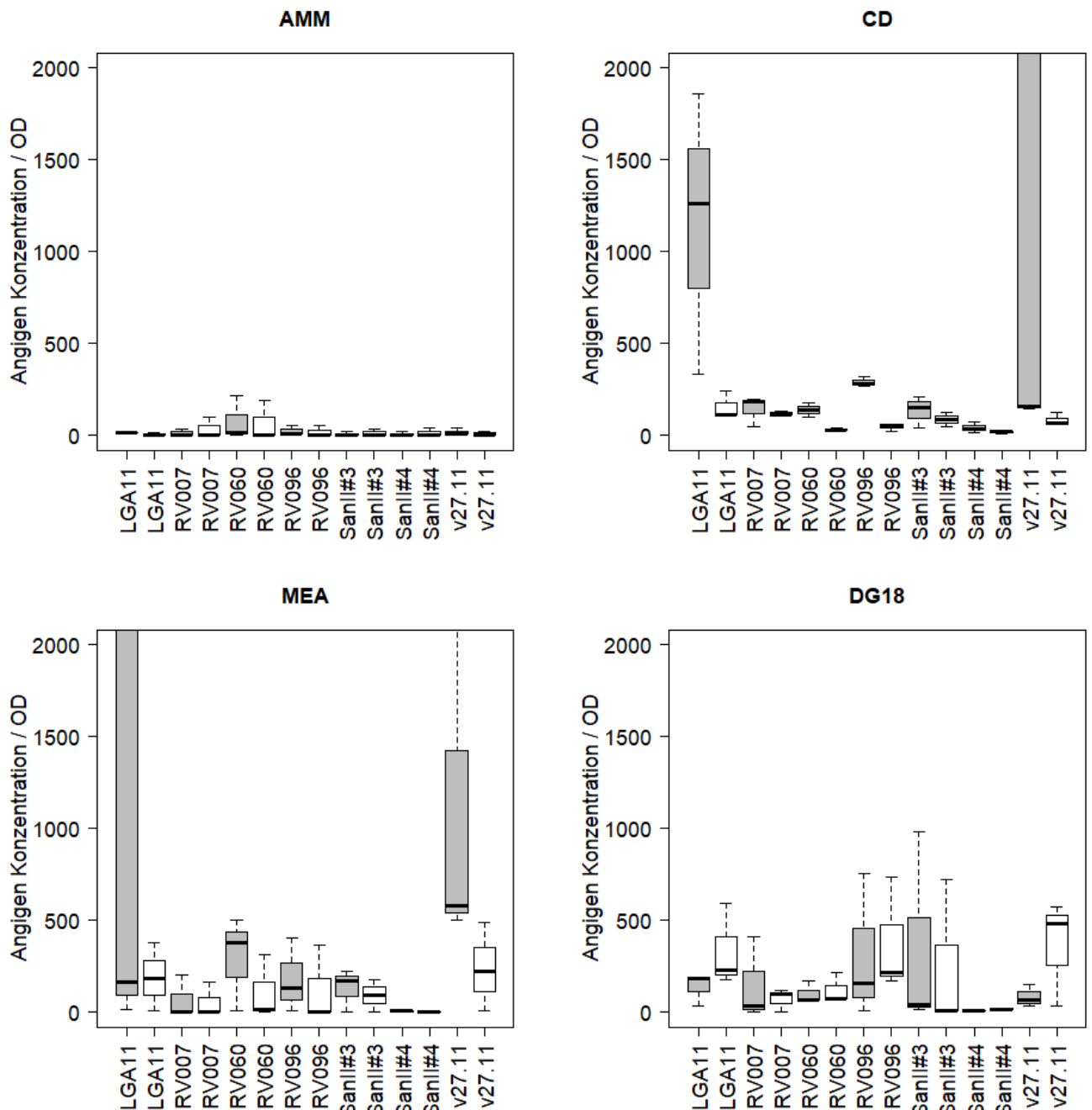
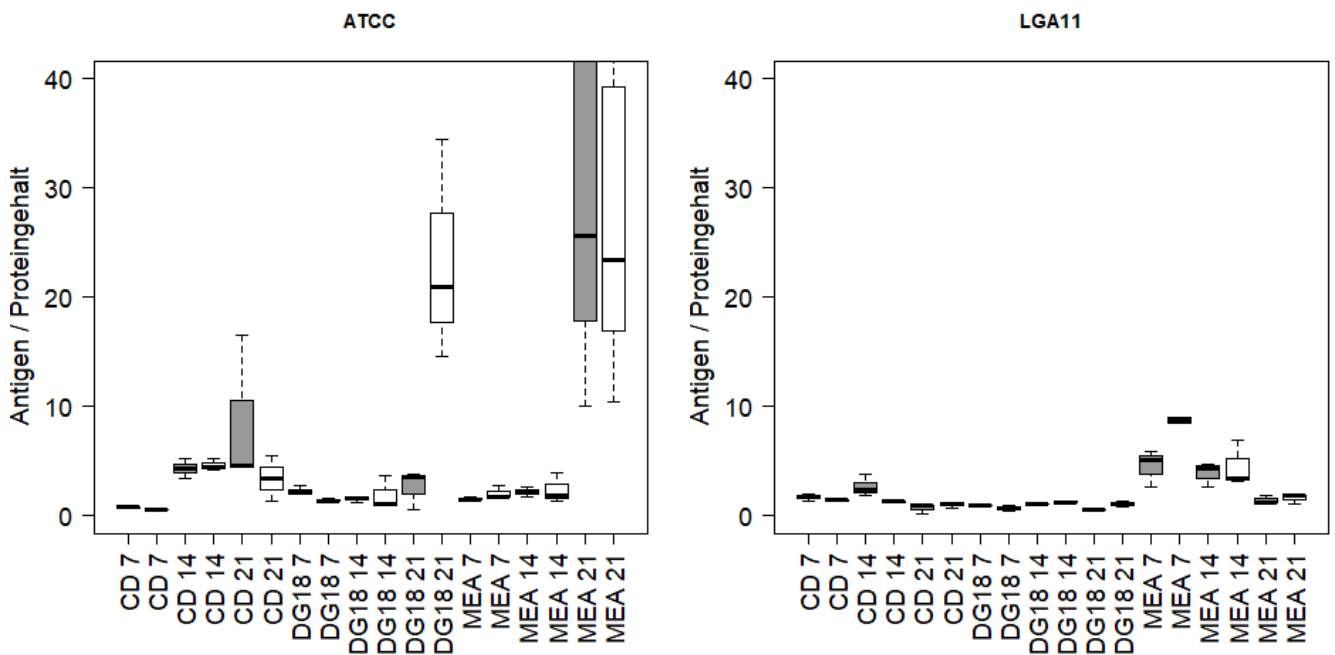


Abbildung 9 – Ergebnisse des Antigengehalts normiert nach der gemessenen Sporendichte (OD600) für 7 Isolate und vier Nährmedien. Grau – Anzucht in Dunkelheit; weiß – Anzucht in Dauerlicht
 Antigengehalt von verschiedenen Isolaten der Clade *Aspergillus versicolor*; angezogen und verarbeitet zeitgleich und nach den gleichen Protokollen; alle Stämme wurden auf Malzextraktagar (MEA) kultiviert, grau – Anzucht in Dunkelheit, weiß – Anzucht in Licht;
 links - 7 Isolate, Antigengehalt normiert nach der OD der Suspension;

Anschließend an den ersten Versuch, wurde das Isolat ATCC 10072 erworben und ein weiteres Experiment durchgeführt. Dabei wurde auf das verdünnte Minimalmedium verzichtet und nur vier Isolate getestet, da einige der Isolate zur gleichen Art (*Aspergillus creber*) gehörten. In Abbildung 10 ist ein deutlicher Einfluss des Anzuchtmediums auf den Antigengehalt (berechnet nach dem Gesamtproteingehalt) ersichtlich. Außerdem ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem Isolat ATCC 10072 und den anderen Isolaten zu erkennen. Obwohl das Isolat LGA11 der gleichen Art angehört wie das Isolat, mit dem der AveX hergestellt wurde, war die Detektion von LGA11 durch den ELISA deutlich geringer.

Da der Nachweis der Antigene von nahen Verwandten des Isolates ATCC 10072 als auch von Isolaten der gleichen Art so unterschiedlich ausgefallen ist wurde beschlossen, nur das Isolat, mit dem der ELISA hergestellt wurde für die Aerosolveruche zu verwenden und MEA als Nährmedium einzusetzen. Im Gegenzug wurden die Sammelversuche zusätzlich mit *Aspergillus fumigatus* durchgeführt.



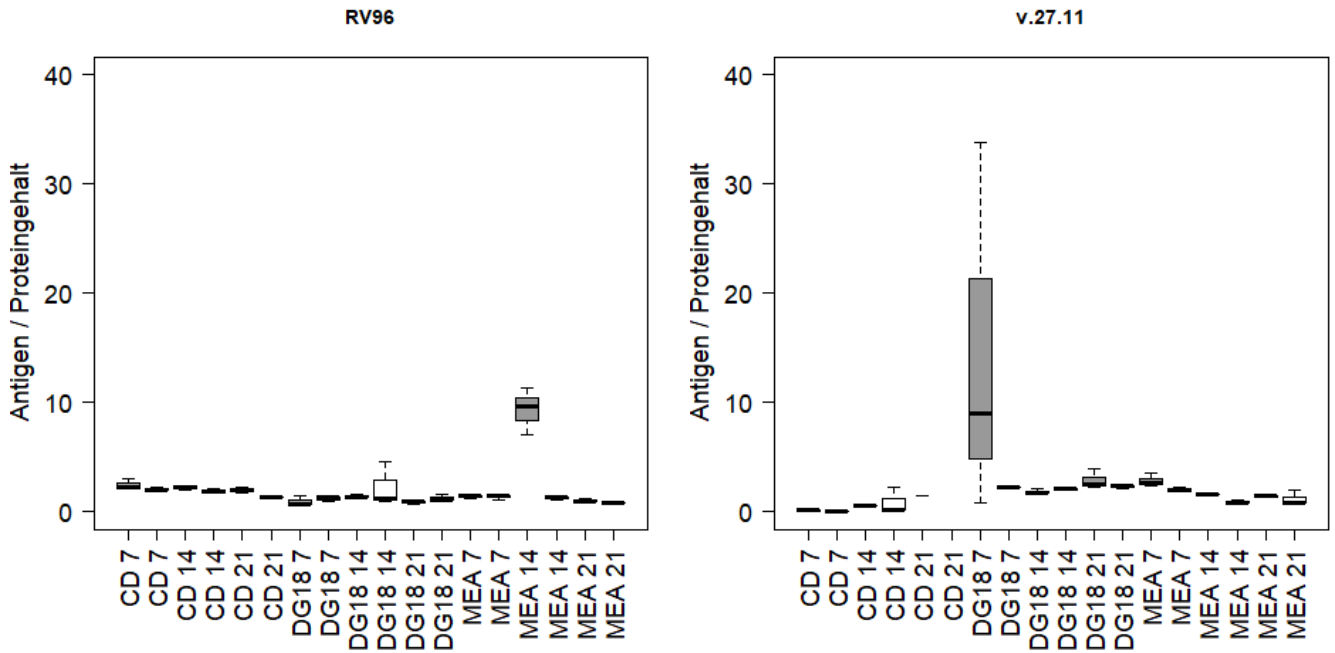


Abbildung 10 –Ergebnisse des Antigengehalts normiert nach dem gemessenen Proteingehalt (BCAssay) für 4 Isolate und vier Nährmedien. Grau – Anzucht in Dunkelheit; weiß – Anzucht in Dauerlicht
 Antigengehalt von verschiedenen Isolaten der Clade *Aspergillus versicolor*; angezogen und verarbeitet zeitgleich und nach den gleichen Protokollen; alle Stämme wurden auf Malzextraktagar (MEA) kultiviert, grau – Anzucht in Dunkelheit, weiß – Anzucht in Licht;
 4 Isolate, Antigengehalt normiert nach dem Proteingehalt

In einem dritten Experiment wurde der Einfluss der Anzuchtbedingungen nur auf das Isolat ATCC 10072 untersucht, um die Sporenausbeute zu optimieren. Es wurden drei Medien, drei Inkubationszeiten und zwei Lichtverhältnisse getestet. Alle Anzuchten wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse deuten auf keinen großen Einfluss der Lichtverhältnisse noch der Kultivierungszeit hin, siehe Abbildung 11 links. Das Medium zeigt einen Einfluss auf die Sporenzahl und die Kolonien. Die Kolonien auf Czapek Dox haben nur langsam die Färbung der Sporen gezeigt, wohingegen die Kulturen auf Malzextrakt-Agar bereits nach sieben Tagen deutlich grün waren. Folgend auf diesen Ergebnissen wurde die Anzucht von ATCC 10072 für die Produktion des Ausgangsmaterials, auf MEA für mindestens sieben Tage durchgeführt.

Berechnet man den Antigengehalt pro Spore zeigt sich, dass die Kultivierung auf DG18 zu einer Erhöhung dieser führt. Diese Ergebnisse standen erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Verfügung, weshalb eine Kultivierung auf MEA beibehalten wurde.

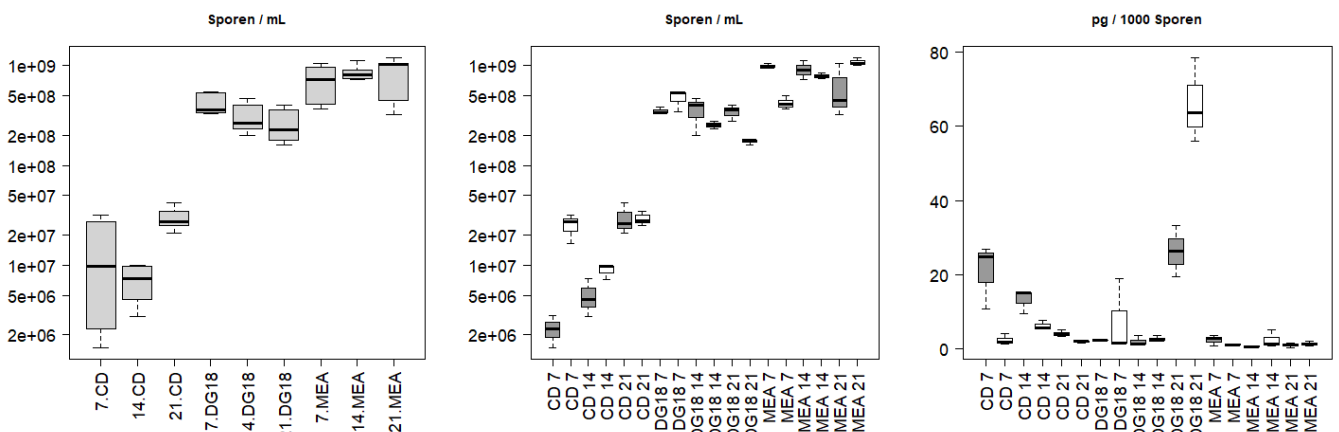


Abbildung 11 – Sporenzahl / mL und Antigengehalt des Isolates ATCC 10072 bei verschiedenen Anzuchtbedingungen. Die Ergebnisse der Sporenzahl sind auf keine bekannte Größe normiert, es ist lediglich das gleich Ernteverfahren angewandt worden. Der Antigengehalt ist auf die gezählte Sporenzahl / mL berechnet. grau – Anzucht in Dunkelheit, weiß – Anzucht in Licht; CD – Czapek Dox, DG18 – Dichloran-Glycerol-Agar; MEA - Malzextraktagar

Herstellung von reproduzierbarem, stabilem Ausgangsmaterial

Um reproduzierbar Material herstellen zu können wurden Standardprotokolle für die Aerosolerzeugung von *Aspergillus amoenus* erarbeitet. Um ausreichend hohe Konzentrationen in der Aerosolkammer zu produzieren, war es im Projektverlauf nötig, einen zweiten Aerosolgenerator einzusetzen, siehe Abbildung 4, Arbeitspaket 2. Der Rotierende Bürsten Dispergierer (RBG) benötigt Staub als Ausgangsmaterial. Die Produktion von Sporenstaub wurde getestet und Standardprotokolle erstellt. Außerdem wurde die Lagerstabilität von Stäuben analysiert.

Um sicherzustellen, dass der für die Aerosolproduktion hergestellte Staub den Antigengehalt über die Zeit nicht ändert, wurde im komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect Sporenstaub von *Penicillium chrysogenum* hergestellt und von November 2019 bis Jänner 2020 gelagert. Alle ein bis zwei Wochen wurde eine Probe entnommen, in Puffer verarbeitet, die Sporen gezählt und die Suspension an das IPA gesandt. Abbildung 12 links zeigt eine Abnahme des Antigengehalts pro 1000 Sporen über die Zeit.

Der Antigengehalt des Ausgangsmaterials für die Aerosolerzeugung wurde für alle Versuche mitbestimmt. Nach Beendigung aller Versuche wurde das Alter des Sporenstaubes bzw. der Platten und der Antigengehalt untersucht. In Abbildung 12 rechts, sind die Daten des Ausgangsmaterials aufgezeichnet. Der Antigengehalt schwankt zwischen 0 und 10 pg / 1000 Sporen, ein Trend hinsichtlich Alter des Staubes oder der Platten ist hingegen nicht ersichtlich.

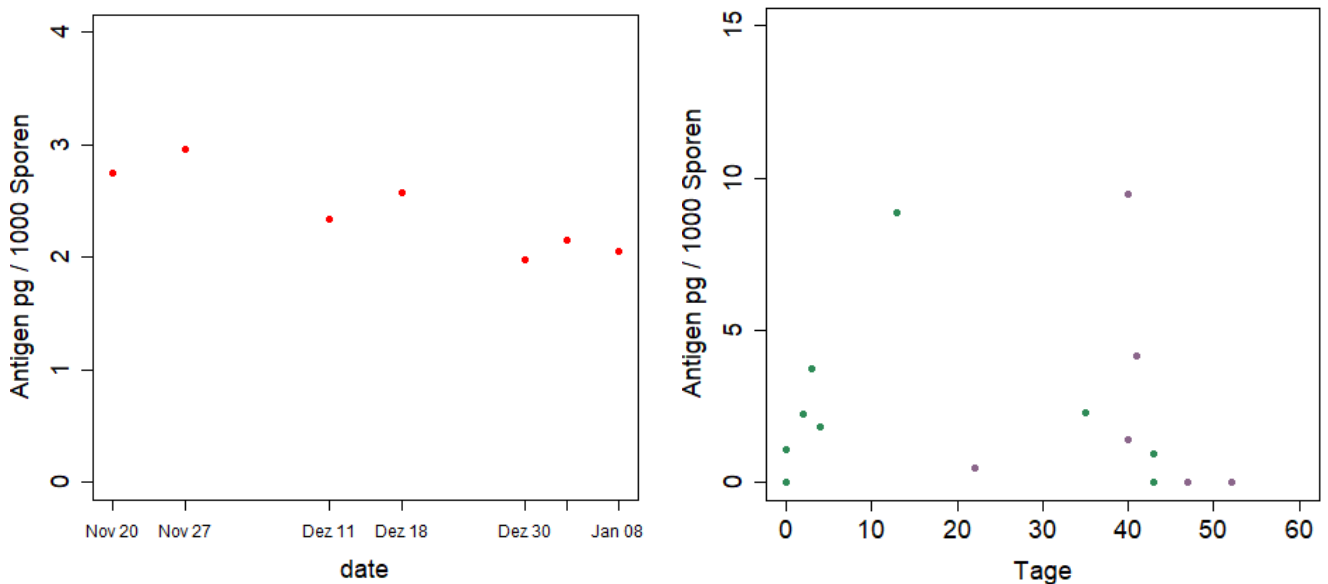


Abbildung 12 – Antigengehalt von Ausgangsmaterial in Abhängigkeit des Alters. Links – Sporenstaub von *Penicillium chrysogenum* gelagert von 20. November bis 8. Jänner; rechts – Sporenstaub bzw. bewachsene Platten von *Aspergillus amoenus*, grün – Sporenstaub, lila – Sporensuspension von Platten

Extraktion der Proben zur Bestimmung des Antigengehalts

Sowohl das Ausgangsmaterial als auch die Filterproben nach der Sammlung müssen verarbeitet werden, um die Proteine und Antigene für den Nachweis zugänglich zu machen. Das Ausgangsmaterial für die Aerosolproduktion liegt entweder in Flüssigkeit (Flüssigdispergierer LSA) oder als Sporenstaub (Staubdispergierer RBG) vor. Um den Antigengehalt aus dem Sporenstaub zu bestimmen, wurde ein kleiner Teil des Staubes in Pufferlösung gebracht und durch vortexen gemischt.

Nach der Luftprobenahme sind entweder mit Aerosolen beladene Teflonfilter (Gesamtstaubprobenahmesystem) oder 8-well Mikrotiterstreifen (AS100 Sammelkopf) vorhanden. Die Teflonfilter wurden in 5mL Pufferlösung gebracht und abgewaschen. Die Mikrotiterstreifen können entweder direkt mittels ELISA vermessen werden, oder die Kavitäten werden ausgespült (125 µL Puffer pro well) und danach analysiert. Der Vergleich dieser Nachweissysteme, direkt und indirekt, ist in Arbeitspaket 2 beschrieben.

Die Suspensionen von Ausgangsmaterial und Filterproben müssen noch weiter verarbeitet werden, um die Proteine und Antigene zu extrahieren. Dafür sind mehrere Verfahren publiziert. Am Beginn des Projektes wurden deshalb fünf Verfahren zur Extraktion mit fünf gleich produzierte Sporensuspensionen (biologische Replikate) getestet. Dafür wurden von jeder Suspension fünf Aliquote produziert und jeweils mit einem anderen Verfahren extrahiert. Da die Suspensionen untereinander unterschiedlich sind, wurden die Ergebnisse auf das Verfahren 1 (Treat1) normiert. Die Ergebnisse, Abbildung 13, zeigen einen negativen Einfluss von der Zugabe des Protease-Inhibitors und eine höhere Ausbeute beim Einsatz eines Sporenaufschlusses. Die Konzentration des Detergenz Tween²⁰ zeigte hingegen keinen deutlichen Einfluss.

Basierend auf den Ergebnissen wurde in der Folge kein Protease-Inhibitor eingesetzt. Um die Kompatibilität mit molekularbiologischer qPCR Analyse zu gewährleisten, wurde Puffer mit 0,01% Tween²⁰ verwendet. Für die Extraktion wurde 1 min vortex, 30 min inkubieren am Rollenschüttler, 1 min vortex, 30 min inkubieren am Rollenschüttler gewählt.

Extraktionsprotokoll wie es für alle weiteren Versuche verwendet wurde:

- Puffer: 1xPBS 0,01%Tween²⁰
- Extraktion: 1 min vortex, 30 min inkubieren am Rollenschüttler, 1 min vortex, 30 min inkubieren am Rollenschüttler
- Zentrifugieren: 2 min, 10000 rpm RT
- Der Überstand steht für die Analytik zur Verfügung

Tabelle 7 – Übersicht über die getesteten Extraktionsverfahren. RT – Raumtemperatur, rpm – rounds per minute, min – Minuten, PBS – Phosphatgepufferte Salzlösung, PI – Protease Inhibitor

	Puffer	Extraktion	Zentrifugieren
Treat1	1xPBS 0,01% Tween ²⁰	2h RT, 300 rpm	2 min, 10000 rpm 4°C
Treat2	1xPBS 0,01% Tween ²⁰ +PI	2h RT, 300 rpm	2 min, 10000 rpm 4°C
Treat3	1xPBS 0,05% Tween ²⁰	2x1 min vortex, 30 min inkubieren RT	15 min, 3000 rcf, RT
Treat4	1xPBS 0,05% Tween ²⁰	21h 4°C, 40 rpm	2 min, 10000 rpm 4°C
Treat5	1xPBS 0,05% Tween ²⁰ +PI	2x 1min vortex, 2x 30 min inkubieren anschließender Aufschluss (Kugelmühle)	15 min, 3000 rcf, RT

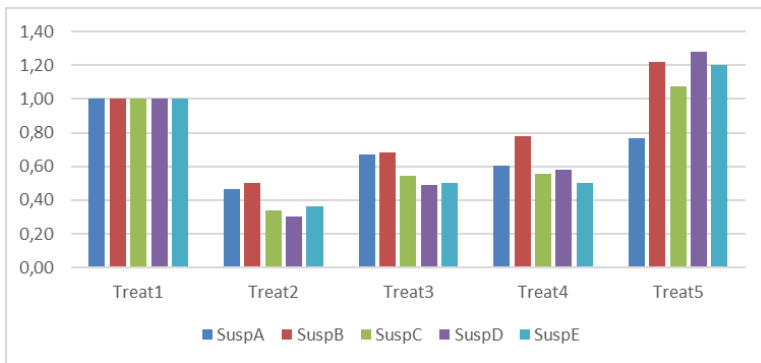


Abbildung 13 – Antigengehalt bei verschiedenen Extraktionsprotokollen, normiert nach Protokoll 1; Treat1-5 – Extraktionsprotokolle; SuspsA-E – fünf gleich hergestellte Suspensionen (biologische Replikate)

Um den Effekt des Aufschlusses weiter zu untersuchen, wurde im komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect alle Suspensionen mit und ohne Aufschluss untersucht. Da der Aufschluss zeit- und materialintensiv ist, wurde er im Projekt AntigenSampling nicht verwendet.

Vergleich von wässriger Extraktion und Aufschluss

Im ersten Versuch der Extraktionsprotokolle war ein positiver Einfluss eines Sporenaufschlusses für den Nachweis mittels AveX ersichtlich. Darauffolgend wurden im komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect, Suspensionen von allen Testorganismen mit und ohne Aufschluss untersucht. Diese Ergebnisse zeigten Unterschiede für die verschiedenen Pilzarten. Es konnte also nicht grundsätzlich bessere Ergebnisse mit Aufschluss als ohne erzielt werden.

Deshalb wurde der Vergleich des Aufschlusses für alle Proben (505) durchgeführt. In Abbildung 14 sind die Antigengehalte der Proben mit und ohne Aufschluss aufgetragen. Im unteren Konzentrationsbereich sind einige Ausreißer ersichtlich, im Ganzen betrachtet ist aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Verfahren zu erkennen. Die Analyse der *Aspergillus amoenus* Daten, zeigt etwas höhere Antigen Gehalte für die Extraktion mit Aufschluss.

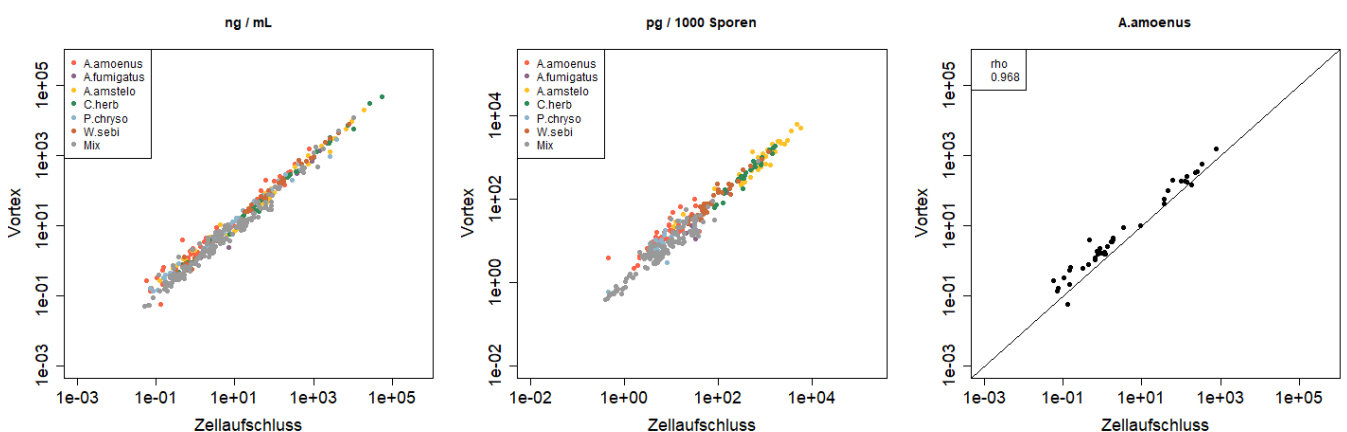


Abbildung 14 – Ergebnisse der Extraktion von Suspensionen mit und ohne Aufschluss; Mixing – wässriger Extraktion, Precellys – Extraktion mit Zellaufschluss; links – Ergebnisse der ELISA direkt, Mitte – Ergebnisse der ELISA normalisiert auf den Sporengehalt = Antigengehalt in pg / 1000 Sporen; n = 505 je Grafik
rechts – Ergebnisse der Analysen von *Aspergillus amoenus* Proben mit und ohne Aufschluss mit dem vom IPA entwickelten *A. versicolor* ELISA

Arbeitspaket 2

Um stabile Testbedingungen zu gewährleisten, wurden die Versuche in einer Bioaerosolkammer durchgeführt (CCB3000, Palas GmbH). In der Kammer ist es möglich reproduzierbar stabile Bedingungen herzustellen. Für die Aerosolproduktion war ein Flüssigdispergierer (Liquid Sparging Aerosolizer, CH Technologies) geplant. In ersten Versuchen wurde offensichtlich, dass die höchstmögliche Konzentration, die mit diesem Verfahren erreicht werden konnte, Proben am unteren Spektrum der Detektionsgrenze der ELISA produziert. Dies rührt daher, dass der LSA ein Plateau bei der Effizienz der Aerosolerzeugung abhängig von der Ausgangskonzentration erreicht (Dellinger 2020; Mainelis et al. 2005). Außerdem werden die Filterproben durch die Extraktion in 5mL Puffer verdünnt und nur 1mL zur ELISA Messung aliquotiert und je Messung nur 100µL des Überstandes herangezogen.

Im Arbeitspaket 2 wurde der Testaufbau optimiert um die beiden Sammelverfahren (Filter vs. AS100) miteinander vergleichen zu können. Außerdem wurde die Analyse der 8-well Mikrotiterstreifen direkt und indirekt in sechs Konzentrationen verglichen und die Mikrotiterstreifen der verschiedenen Konzentrationen mikroskopisch untersucht.

Aerosolproduktion und Testkonzentrationen

Um höhere Konzentrationen zu produzieren, wurde im Winter 2019/2020 der rotierende Bürstendispergierer (Rotating Brush Generator, Palas GmbH) zur Aerosolproduktion getestet. Aus früheren Anwendungen war bekannt, dass eine sehr hohe Konzentration erreichbar ist, es wurde allerdings mit hohen Scherkräften, welche die Sporen schädigen können, gerechnet. Für Vorversuche wurde der Pilz *Aspergillus brasiliensis* eingesetzt, da es bei dieser Art sehr leicht ist Sporenstaub zu produzieren. Die Ergebnisse der Aerosol- und Sammelversuche zeigten intakte und keimfähige Sporen. In Folge wurde Sporenstaub für die anderen Arten, die in den beiden komplementären Projekten verwendet werden, hergestellt.

Der produzierte Staub hat, aufgrund der Gefriertrocknung, teilweise eine verminderte Keimrate im Vergleich zur Suspension, siehe Abbildung 15. Der Antigengehalt pro 1000 Sporen zeigt aber keinen signifikanten Unterschied, Abbildung 16. Dabei ist zu berücksichtigen, dass alle Suspensionen (Staub, Ausgangsmaterial LSA, Filter) vor dem Messen des Antigengehalts zur Lagerung und Transport eingefroren wurden. Die Stabilität des Antigengehalts bei Lagerung des Staubes wurde in Arbeitspaket 1 untersucht, siehe Abbildung 12.

Um zu überprüfen, dass die Aerosolerzeugung selbst keinen Einfluss auf den Antigengehalt der Sporen hat, wurde der Aerosolstrom direkt nach dem Aerosolgenerator mit einer Gaswaschflasche in Puffer aufgefangen. Auch diese Suspensionen wurden analysiert und Abbildung 16 rechts zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Ausgangsmaterial, Gaswaschflasche und Filterproben im Antigengehalt pro 1000 Sporen gibt, die Filterproben zeigen jedoch sehr hohe Schwankungen im Antigengehalt pro 1000 Sporen.

Die Analyse des Antigengehalten vor und nach der Aerosolproduktion wurde für *Aspergillus fumigatus* im komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect durchgeführt. Auch hier konnte kein deutlicher Einfluss erkannt werden.

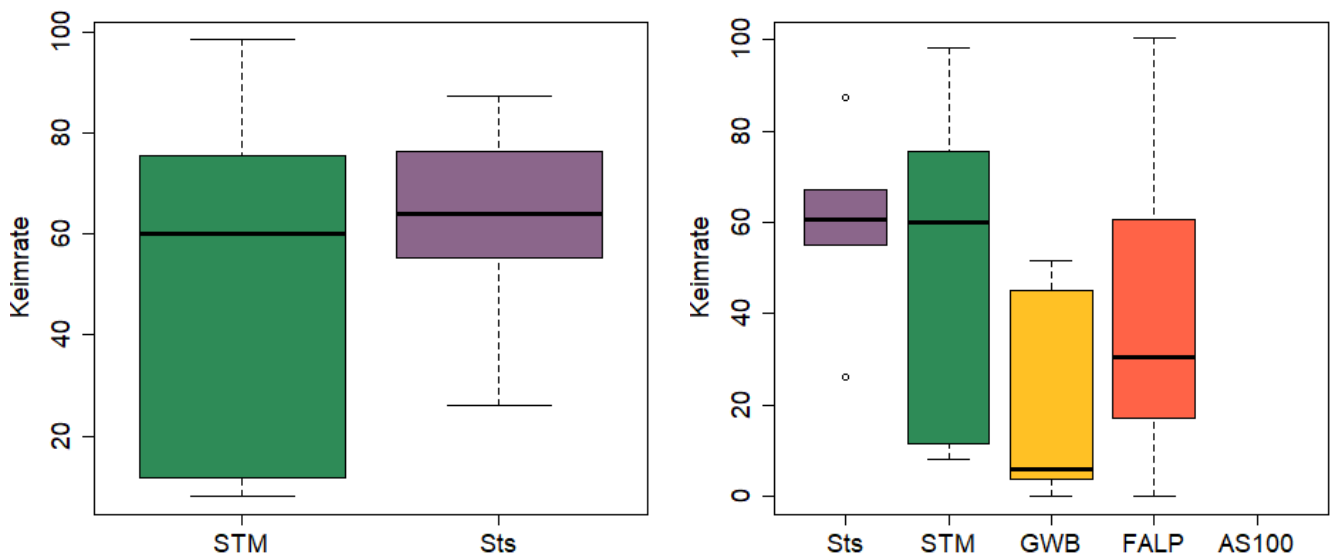


Abbildung 15 – Keimrate von verschiedenen Suspensionen; links – Vergleich von Sporenstaub und Suspensionen; rechts – Vergleich von Ausgangsmaterial, Gaswaschflasche und Filtern; STM – Ausgangsmaterial Sporenstaub, Sts – Ausgangsmaterial Sporensuspension, GWB – Gaswaschflasche, FALP – Teflonfilter, AS100 – Mikrotiterstreifen (wurden nicht ausplattiert, daher keine Bestimmung der Keimrate)

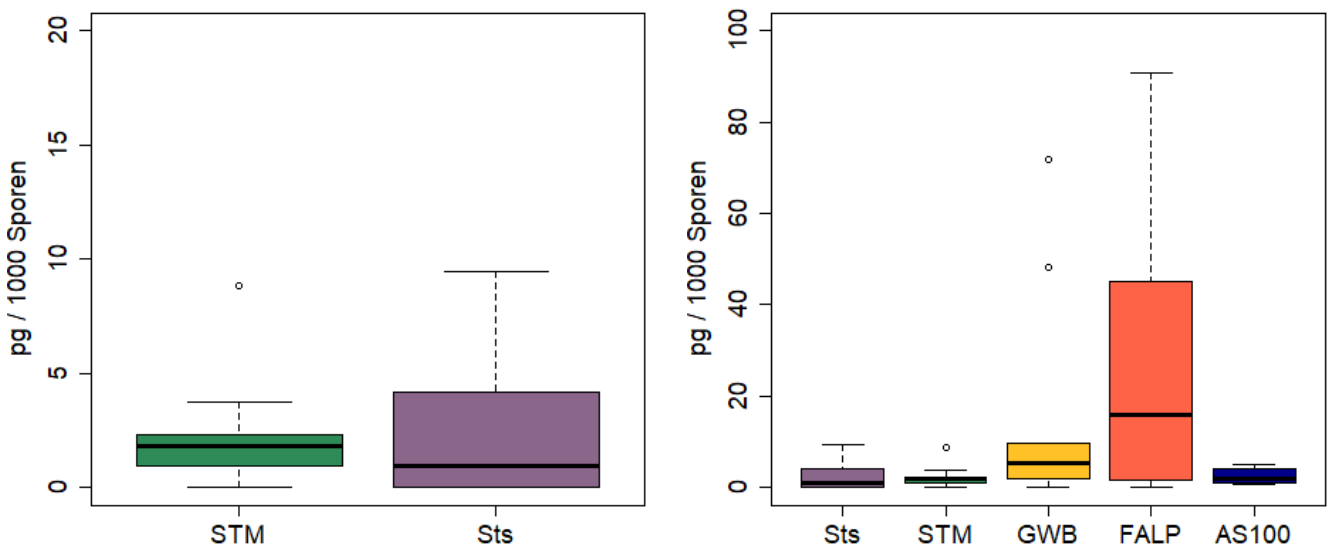


Abbildung 16 – Antigengehalt von 1000 Sporen von verschiedenen Suspensionen; links – Vergleich von Sporenstaub und Suspensionen; rechts – Vergleich von Ausgangsmaterial, Gaswaschflasche und Probenträgern; STM – Ausgangsmaterial Sporenstaub, Sts – Ausgangsmaterial Sporensuspension, GWB – Gaswaschflasche, FALP – Teflonfilter, AS100 – gespülte Mikrotiterstreifen

Um die beiden Sammelsysteme GSP und AS100 miteinander vergleichen zu können, waren im Projektantrag fünf Konzentrationen geplant. Wie beschrieben musste zum Erreichen der hohen Konzentrationen ein anderes

Verfahren zur Aerosolproduktion eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurde für die niedrigste Konzentration der Flüssigdispergierer und für die hohen Konzentrationen der Staubdispergierer mit unterschiedlichen Einstellungen verwendet. Mit der Kombination der Methoden konnten Konzentrationen zwischen 500 Sporen pro Liter und 80.000 Sporen pro Liter Luftvolumen erzeugt werden.

Da es für *Aspergillus fumigatus* nicht möglich war Sporenstaub zu produzieren (kein entsprechendes Equipment im mikrobiologischen Level 2 Labor) wurden mit drei Einstellungen für den Flüssigdispergierer gearbeitet. Hier konnten Konzentrationen von 10.000 bis 100.000 Sporen pro mL Filterextrakt erreicht werden.

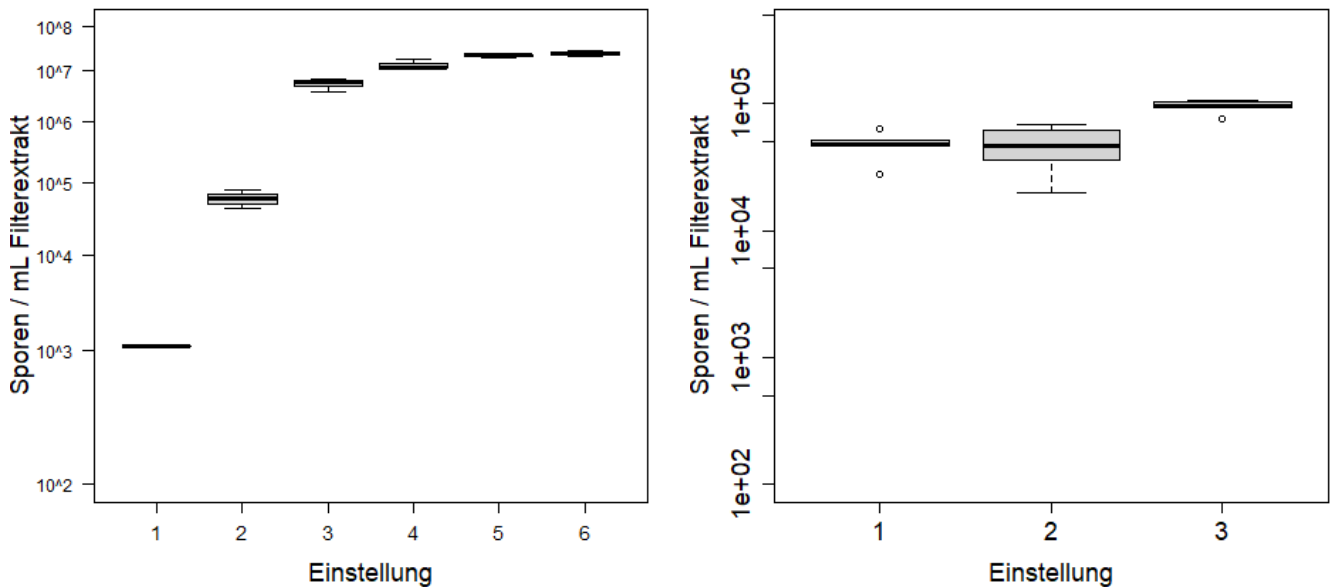


Abbildung 17 – gesammelte Sporen pro mL Filterextrakt je nach Einstellung für die Aerosolproduktion; links – *Aspergillus amoenus*, rechts – *Aspergillus fumigatus*

Vergleich des AveX mit Sporenzählung und anderen Messverfahren

Da einige Proben von *Aspergillus amoenus* geringe Sporenkonzentrationen hatten, konnte auch nicht für alle Proben Ergebnisse mit dem AveX ELISA erzielt werden. Von 338 Proben lagen 104 an bzw. unter der Nachweisgrenze. Die Auftragung von ELISA Ergebnissen zur Sporenzahl zeigt, dass diese nicht immer miteinander korrelieren, siehe Abbildung 18. Für einige Proben mit hoher Sporenkonzentration konnte keine ELISA Ergebnisse erzielt werden. Auch lagen Ergebnisse von Proben mit sehr ähnlicher Sporenkonzentration (z.B. 3×10^5) manchmal unter und andere male im messbaren Bereich.

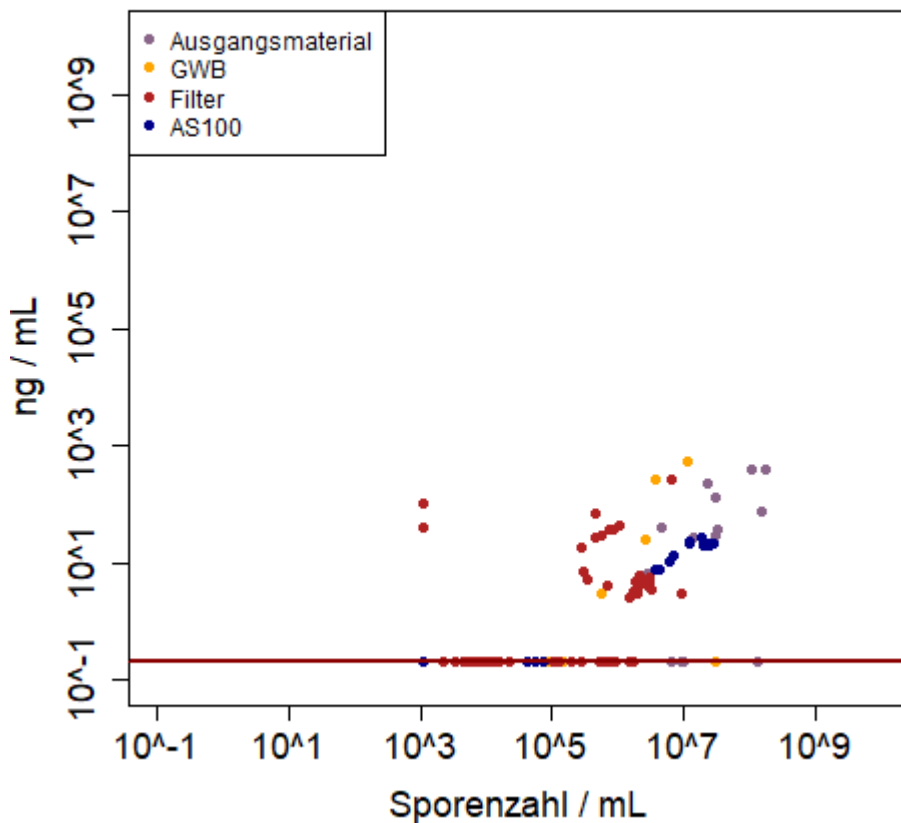


Abbildung 18 – Vergleich der Ergebnisse der Sporenzählung mit der Antigenmessung der verschiedenen Proben in Flüssigkeit; Die rote Linie stellt die Detektionsgrenze des AveX bei 0,2 ng/mL dar

Die Filterproben und das Ausgangsmaterial wurden auch mit anderen Analyseverfahren evaluiert. Neben der Sporenzählung wurden Aliquote auf Nährmedien ausplattiert und die Zahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt. Außerdem wurde die DNA extrahiert und die Kopienzahl mittels qPCR bestimmt. Diese Analyseverfahren wurden ebenfalls mit den ELISA Ergebnissen verglichen.

Wie für die Sporenzahl zeigen auch die Daten für koloniebildende Einheiten und Kopienzahlen, eine Verteilung der Proben an bzw. unter der Messgrenze über den Gesamten Konzentrationsbereich, siehe Abbildung 19. Dies führt zu einer verminderten Zahl an Proben, die für die Korrelation herangezogen werden können. Die Korrelation des AveX mit KBE zeigt eine breit gestreute Wolke. Beim Vergleich mit Kopienzahlen ist die Wolke dichter und ähnelt dem Vergleich von AveX und Sporenzahl. Im Vergleich zu den Korrelationen der anderen Analysemethoden mit dem AveX, ist die Übereinstimmung von Kolonie- und Kopienzahlen zu Sporenzahlen deutlich besser. Bei beiden Grafiken ist ein Anstieg beider Nachweisverfahren mit erhöhter Konzentration ersichtlich.

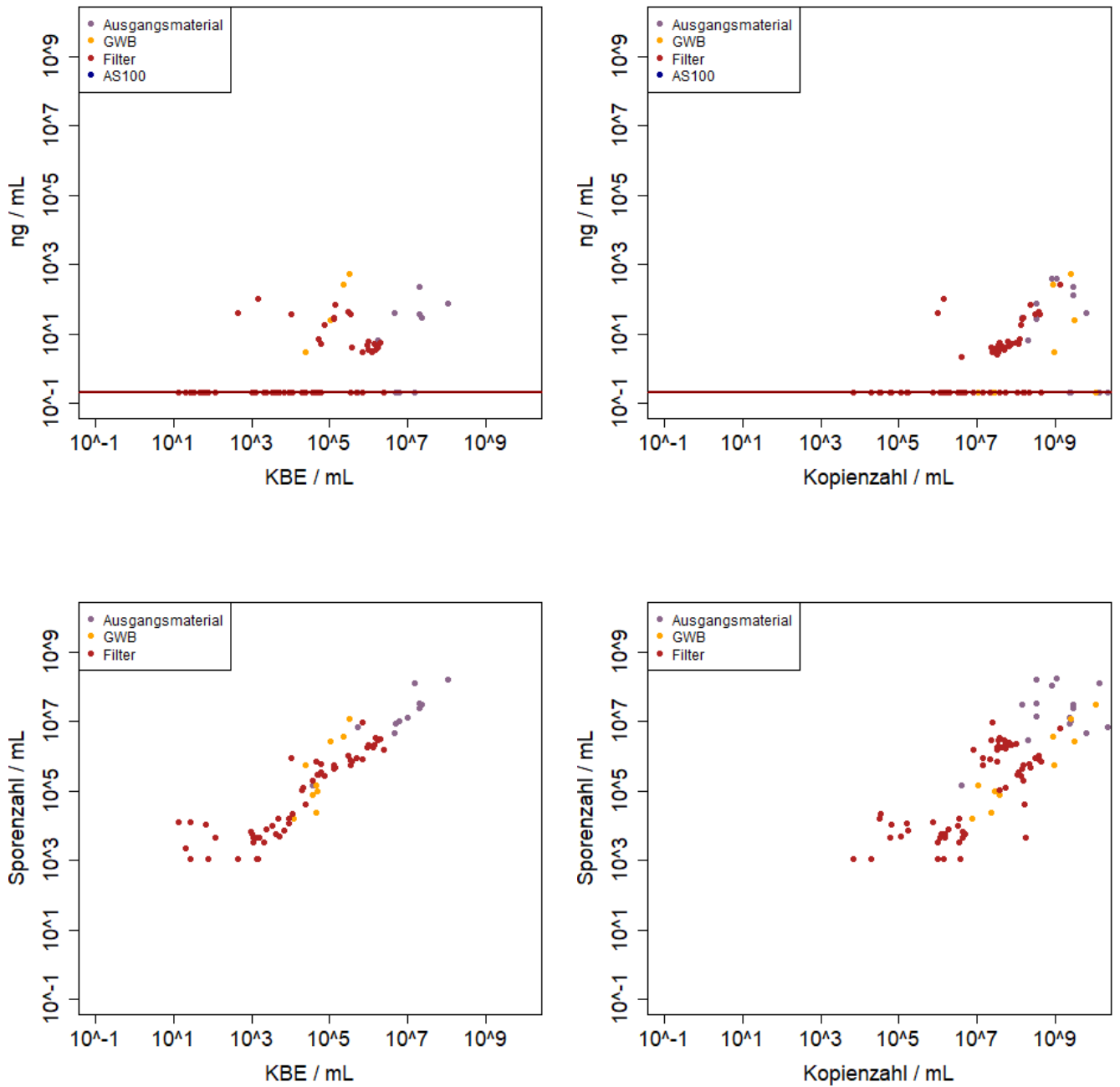


Abbildung 19 – Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden der verschiedenen Proben in Flüssigkeit; oben – vergleich der Antigengehalte mit koloniebildenden Einheiten (KBE) und Kopienzahlen (qPCR); unten – Vergleich der Sporenzahl mit koloniebildenden Einheiten (KBE) und Kopienzahlen (qPCR); Die rote Linie stellt die Detektionsgrenze des AveX bei 0,2 ng/mL dar

Vergleich ELISA direkt und nach Ausspülen

Für die 8-well Mikrotiterstreifen ist es möglich den ELISA direkt in den Kavitäten durchzuführen (Inkubation mit Puffer über Nacht) oder die Kavitäten auszuspülen, zu einer Probe zu vereinigen und danach den ELISA durchzuführen. Für die sechs Testkonzentrationen wurden jeweils fünf Streifen für die direkte Messung beaufschlagt und drei nach der Sammlung gespült.

Der Vergleich der Ergebnisse zeigt, dass die Antigengehalte pro m^3 Sammelvolumen tendenziell gut übereinstimmen. Bei der geringsten Konzentration konnte nur mit ein paar der direkt gemessenen Streifen Antigene gemessen werden. Bei der nächsthöheren, war nur eine Messung mit der indirekten Methode möglich.

Diese Daten legen nahe, dass es mit der direkten Messung möglich ist geringere Konzentrationen an Antigen nachzuweisen. Der Vorteil von Ausspülen, bei höheren Konzentrationen, liegt in der Möglichkeit mehrere verschiedene ELISA mit einer Probe durchzuführen. Bei den höchsten Konzentrationen lagen die Ergebnisse der gespülten Proben unterhalb jener mit direkter Messung. Eventuell kann bei hohen Konzentrationen nicht das gesamte Material aus den Kavitäten gewonnen werden zum Beispiel wegen Pipettierverlusten.

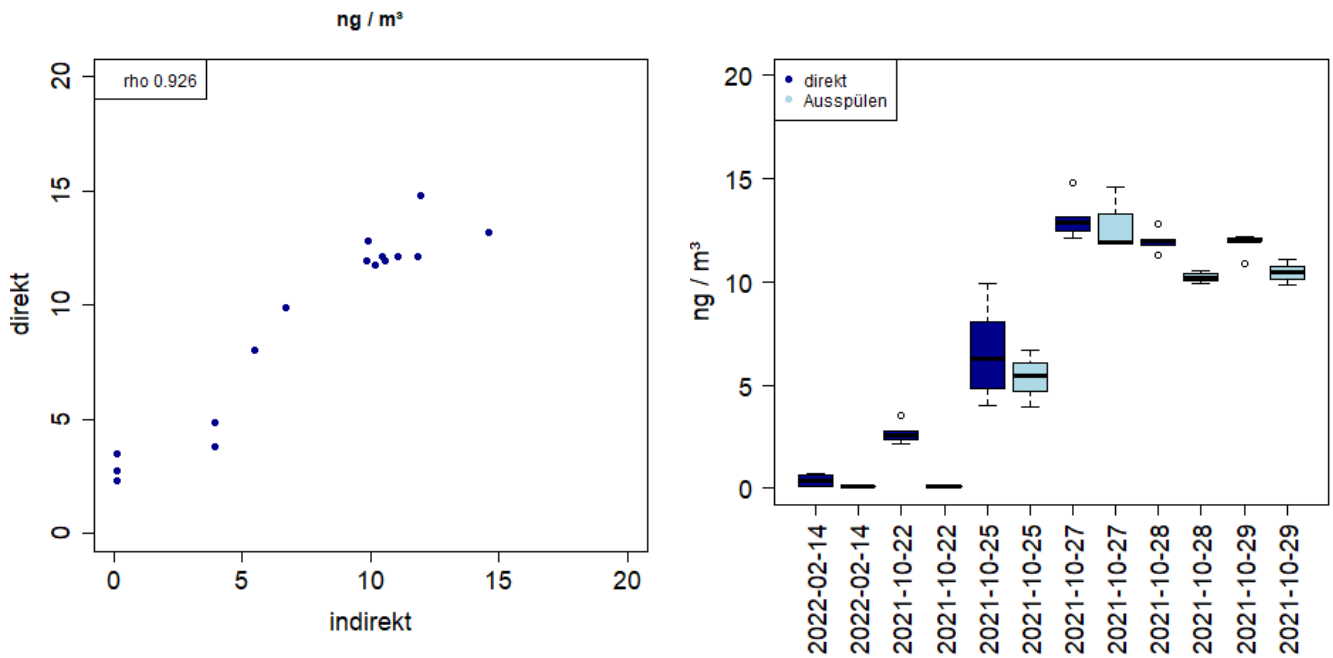


Abbildung 20 – Vergleich der direkten Messung in 8-well Mikrotiterstreifen und der indirekten Messung nach Ausspülen der Kavitäten; links – Antigenkonzentrationen in ng / m^3 für beide Methoden; rechts – Ergebnisse der ng / m^3 für die verschiedenen Versuchstage (dargestellt in aufsteigender Reihenfolge der Konzentration in der Bioaerosolkammer)

Mikroskopische Untersuchung der Mikrotiterstreifen

Die mikroskopische Untersuchung hat gezeigt, dass die Partikel in der ganzen Kavität verteilt sind. Kleinere Partikel sind im oberen Bereich bis zum Rand sichtbar. Größere Partikel und Agglomerate sind im unteren und Mittleren Bereich sichtbar. Es kommt zu keiner speziellen Häufung von Partikeln am Boden, stattdessen scheint die Elektrostatik der Plastikstreifen für eine Haftung über den gesamten Bereich zu sorgen, siehe Abbildung 21. Mit der verwendeten Technik, des Verschließens der Negativkontrolle mit Parafilm, konnte diese Kavität frei von Partikeln gehalten werden, siehe Abbildung 21 Mitte.

Mit der Reduktion der Konzentration in der Luft ist auch optisch eine geringere Zahl an Partikeln ersichtlich. In den beiden geringsten Konzentrationen sind optisch keine Sporen mehr sichtbar.

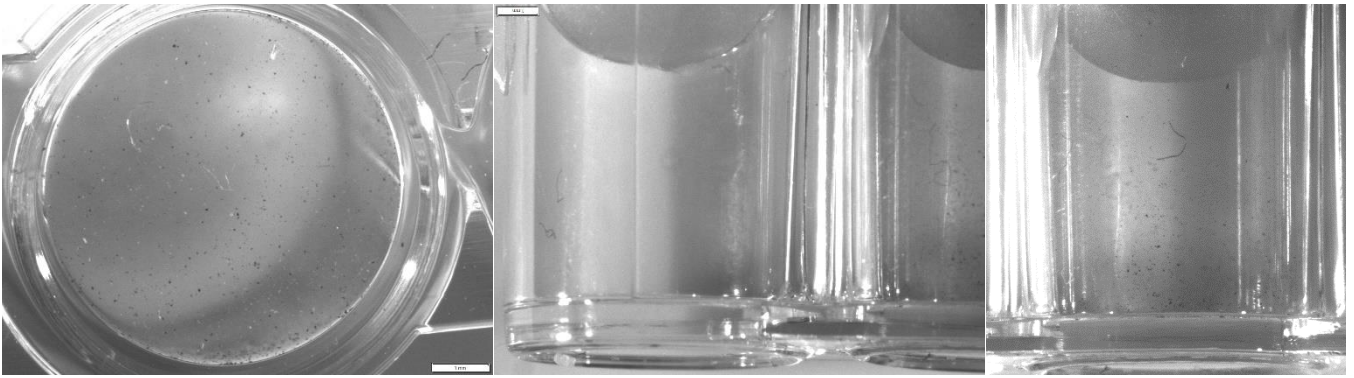


Abbildung 21 – Mikroskopische Aufnahmen der Kavitäten der Mikrotiterstreifen mit der höchsten Konzentration an Sporen; links – Boden einer Kavität; mitte – Negativkontrolle neben erster belegter Kavität; rechts – mit Sporen beladene Kavität

Arbeitspaket 3

In diesem Arbeitspaket wurden die zwei Sammelsysteme Gesamtstaubprobenahme (GSP) auf Teflonfilter und MBASS30 mit AS100 Sammelkopf in Mikrotiterstreifen miteinander verglichen. Dazu wurden Proben mit beiden Systemen in verschiedenen Konzentrationen beaufschlagt und anschließend analysiert. In einer Konzentration wurden die Einflüsse von Lagerung und Transport auf die Proben untersucht.

Vergleich GSP und AS100 in verschiedenen Konzentrationen

Die beiden Sammelsysteme wurden in drei Versuchsreihen miteinander verglichen. Eine Versuchsreihe wurde mit *Aspergillus fumigatus* durchgeführt. Dabei wurde die Sammlung so aufeinander abgestimmt, dass jeweils das gleiche Luftvolumen mit beiden Systemen gesammelt wurde. Zwei Versuchsreihen wurden mit *Aspergillus amoenus* durchgeführt, eine mit gleichem Luftvolumen und eine mit gleicher Sammelzeit. Bei allen Versuchsreihen wurden verschiedene Konzentrationen der Pilze in der Aerosolkammer hergestellt.

Abweichend vom ursprünglichen Plan, wurde nur ein Isolat der Clade *Aspergillus versicolor* verwendet. Wie in Arbeitspaket 1 beschrieben, wurden unterschiedliche Antigengehalte für verschiedene Isolate der gleichen Spezies festgestellt. Es wurde entschieden das Isolat, mit dem der AveX laut Hersteller erzeugt wurde (ATCC 10072) für die weiteren Versuche zu verwenden. Aus diesem Grund und basierend auf Kommentaren der Reviewer beim Projektantrag wurde statt eines zweiten *Aspergillus versicolor* Isolates, ein Isolat von *Aspergillus fumigatus* für den Vergleich der beiden Sammelsysteme herangezogen.

Aspergillus fumigatus

Da *Aspergillus fumigatus* ein Risikogruppe 2 Organismus ist, wurde die Suspension mit Schimmelstop (Fa. baufan) behandelt, um die Sporen abzutöten und eine Keimung zu verhindern. Vorversuche haben gezeigt, dass der Gehalt bzw. die Messung der Antigene durch diese Vorbehandlung nicht beeinträchtigt werden. Außerdem wurde aus Gründen des Arbeitsschutzes auf eine Produktion von Staub verzichtet, sondern lediglich verschiedene Konzentrationen aus Suspensionen erzeugt und aerosolisiert.

In einer Bachelorarbeit (Mayer 2020) wurde der Einfluss von Anzuchtmedium, Anzuchtdauer und Temperatur auf *Aspergillus fumigatus* untersucht. Ziel der Arbeit war herauszufinden, ob die Keimung der Sporen und die Anzuchtbedingungen einen Einfluss auf den Gehalt des Allergens Asp f1 haben. Eine weitere Bachelorarbeit (Seidl 2021) hat sich mit den Anzuchtbedingungen, dem Vergleich von Nachweismethoden und der Sammlung von

Aspergillus fumigatus beschäftigt. In dieser Arbeit wurden die Sammlungen auf Filtern, des komplementären Projektes SchimmelAntigenDetect, um Sammlungen mit AS100 System erweitert. Die Analyse von Mikrotiterstreifen mit dem Asp f1 spezifischen ELISA wurde auch in den zwei österreichischen Betriebsmessung durchgeführt (siehe Arbeitspaket 4).

Der Vergleich der Nachweismethoden zeigt bereits, dass die Zahlen der Sporen und der Kolonien, sowie die Sporenzahl und der Proteingehalt (Bradford, BCA) gut zusammenpassen. Im Vergleich dazu gibt es keine Übereinstimmung von Sporenzahl und Ergebnis des spezifischen ELISA, Abbildung 22.

Test		Intercept	gradient	ANOVA	R2
Spores to colonies	p-value	0,0738	1,18E-02	1,18E-02	0,8279
	test result	intercept = 0	gradient ≠ 0	correlation	
Spores to DNA	p-value	0,609	1,22E-01	1,26E-01	0,4882
	test result	intercept = 0	gradient = 0	no correlation	
Spores to Bradford	p-value	0,00647	1,85E-02	1,85E-02	0,7864
	test result	intercept ≠ 0	gradient ≠ 0	correlation	
Spores to BCA	p-value	0,5475	1,82E-02	1,82E-02	0,7883
	test result	intercept = 0	gradient ≠ 0	correlation	
Spores to ELISA	p-value	0,00539	9,27E-01	9,27E-01	0,002382
	test result	intercept ≠ 0	gradient = 0	no correlation	
DNA to ELISA	p-value	0,000831	9,54E-01	9,55E-01	0,0009224
		intercept = 0	gradient = 0	no correlation	

Abbildung 22 – Auszug aus der Bachelorarbeit von Stefan Seidl; Vergleich von verschiedenen Nachweissystemen, getestet anhand von Sporensuspensionen ohne Aerosolisierung; Korrelation errechnet mittels ANOVA; R² gibt die Übereinstimmung der Ergebnisse an. DNA – Nachweis mittels DNA-Extraktion und FunigQuant qPCR; Bradford und BCA – Nachweis mittels Proteinquantifizierung; Spores – Sporenzählung mittels Mikroskopie; colonies – Koloniebildende Einheiten nach Ausplattieren; ELISA – Nachweis mittels Asp f1 ELISA

Wie in Abbildung 23 ersichtlich konnten für die Filtersammlung in der Bioaerosolkammer Konzentrationen von 10.000 bis 100.000 Sporen pro mL im Filterextrakt erzielt werden. Parallel zu jeder Filtersammlung wurde mit dem AS100 Sammelkopf Proben genommen. Diese wurden in Direktmessung mit dem Asp f1 ELISA im AIT Labor vermessen. Die Ergebnisse der Filtersammlungen zeigen, dass die Konzentration von Asp f1 für alle Proben unter der Nachweisgrenze gelegen hat. Im Vergleich dazu, konnte mit dem vom IPA entwickelten ELISA (siehe komplementäres Projekt SchimmelAntigenDetect) sehr wohl Ergebnisse erzielt werden. Ebenso war die gemessene Konzentration des Proteinnachweises (BCA) sehr gering oder unterhalb der Nachweisgrenze. In der Direktmessung der AS100 Streifen konnte für keine der Sammlungen Ergebnisse mit dem Asp f1 erzielt werden.

Durch die sehr kleinen Sporen scheint der Proteingehalt pro Spore sehr gering zu sein. Außerdem ist zu beachten, dass der *Aspergillus fumigatus* ELISA des IPA mehrere Proteine nachweist (Antigen-ELISA), im Vergleich dazu vom hier verwendeten kommerziellen ELISA nur das Allergen Asp f1 nachgewiesen wird. Höhere Konzentration an Sporen konnten in der Bioaerosolkammer nicht erzeugt werden, da die Konzentration durch die Effizienzkurve des LSA limitiert ist. Eine Erzeugung von Sporenstaub war für den Risikogruppe 2 Organismus nicht möglich, dadurch war es nicht möglich höhere Konzentration zu erzielen, die wahrscheinlich nötig wären, um über die Nachweisgrenze zu gelangen.

Sampling volume	Sample number	Spore count [spores/mL]	DNA copy number [copy number/ μ L]	Aspf1 concentration [ng/mL]	protein concentration BCA [μ g/mL]
STS	STS 03-16	2,70E+07	1,76E+05	0,998	218,50
	STS 03-17	1,30E+07	1,08E+05	0,143	44,24
	STS 03-18	9,44E+06	7,11E+05	0,316	203,98
	STS 03-19	1,06E+07	1,90E+05	0,407	53,93
	STS 04-22	4,50E+07	7,98E+05	0,505	211,24
GWB	GWB 03-16	5,00E+05	2,25E+03		
	GWB 03-17	1,43E+05	5,66E+02		
	GWB 03-18	4,00E+04	6,64E+03	0,106	6,73
	GWB 03-19	2,18E+05	1,31E+03		
	GWB 04-22	8,89E+04	2,23E+02	0,056	
150 L	F2 03-16	4,78E+04	9,88E+00		6,73
	F3 03-17	2,00E+04	2,82E+01		
	F1 03-18	5,11E+04	5,36E+01		
	F3 03-19	4,67E+04	8,86E+01		
	F1 04-22	6,44E+04	3,43E-02		3,10
450 L	F1 03-16	6,11E+04	1,65E+02		
	F1 03-17	2,78E+04	1,22E+01		
	F2 03-17	3,22E+04	2,47E+01		
	F1 03-19	4,67E+04	6,70E+01		0,68
	F2 03-19	1,02E+05	1,03E-03		
900 L	F4 03-17	6,78E+04	7,59E+01		
	F2 03-18	7,56E+04	6,78E+03		
	F4 03-19	3,56E+04	2,21E+01		
	F2 04-22	1,08E+05	2,97E+02		5,52
	F3 04-22	8,67E+04	2,44E+02		6,73

Abbildung 23 – Auszug aus der Bachelorarbeit von Stefan Seidl; Ergebnisse des Ausgangsmaterials, der Gaswaschflasche und der Filterproben von verschiedenen Nachweissystemen
DNA – Nachweis mittels DNA-Extraktion und FunigQuant qPCR; BCA – Nachweis mittels Proteinquantifizierung; Spore count – Sporenzählung mittels Mikroskopie; Aspf1 – Nachweis mittels Aspf1 ELISA

Aspergillus amoenus

Der Vergleich der beiden Sammelmethode mit *Aspergillus amoenus* (ATCC 10072) wurde zweimal durchgeführt. Im ersten Vergleich wurde das gesammelte Luftvolumen aufeinander angepasst, demnach war die Sammelzeit des AS100, der mit 100 L/min sammelt, kürzer als die des GSP Systems mit 10 L/min. Die Sammlung erfolgte nicht gleich lange, daher können leichte Schwankungen der Aerosolkonzentrationen einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Im zweiten Vergleich wurde mit beiden Systemen GSP und AS100 parallel gesammelt. Die gesammelten Luftvolumina waren unterschiedlich, die Sammelzeit aber ident. Jeder Versuch wurde in verschiedenen Konzentrationen und mit mehreren Proben pro Konzentration durchgeführt.

Im ersten Versuch wurden Aliquote der Filterextrakte auch an das IPA versandt und die ELISA Analyse mit zwei Systemen (IPA entwickelter ELISA, AveX von Indoor) durchgeführt. Im zweiten Versuch wurde neben den Proben für den Vergleich der Sammelsysteme ebenso die Proben für den Vergleich der direkten und indirekten Analyse der Mikrotiterstreifen sowie die Proben für die Mikroskopie produziert. Um hier ebenso für gleiche Bedingungen zu sorgen, wurden eine Filterprobe und zwei AS100 Proben zeitgleich genommen.

Die Ergebnisse des ersten Vergleichs der zwei Sammelsysteme zeigte keinen Zusammenhang. Die vom BMA Labor Bochum gelieferten Antigen Werte zeigten weder einen Trend für einen höhere Sensitivität des GSP Systems noch des AS100 Sammelkopfes. In jede Richtung wurden Proben mit einem System unter der Detektionsgrenze und mit dem anderen darüber gemessen, siehe Abbildung 24 links.

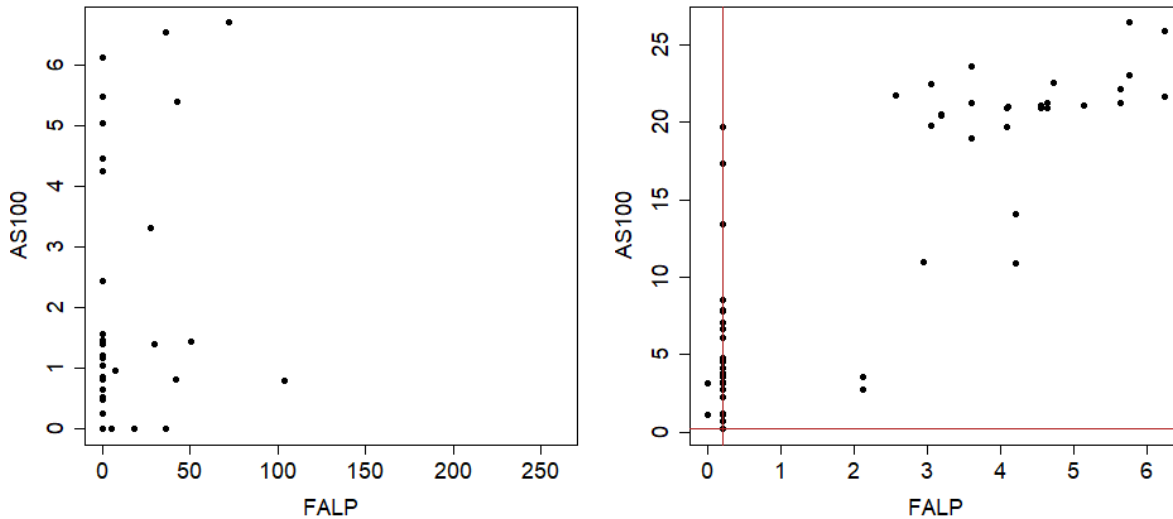


Abbildung 24 – Vergleich der Sammelsysteme GSP (FALP) und AS100; Korrelation zwischen den Antigen Ergebnissen der beiden Sammelsysteme, AS100 (ng / Probe), FALP (ng / mL); links – erste Versuchsreihe; rechts – zweite Versuchsreihe; rote Linien stellen die Detektionsgrenze von 0,2 ng dar

Der zweite Vergleich wurde mit sechs Konzentrationen durchgeführt. Die sechste Konzentration wurde hinzugefügt, nachdem die Daten der vorher geringsten Konzentration noch Ergebnisse für die direkte Messung der AS100 Streifen zeigten. In Abbildung 25 sind die Ergebnisse der ELISA Messungen in ng / m³ angeführt. Rechts sind die Proben an bzw. unterhalb der Detektionsgrenze ersichtlich. Die Abbildungen zeigen, dass in der geringsten Konzentration ebenfalls direkt gemessene AS100 Streifen unter der Detektionsgrenze sind. Bei der zweiten Konzentration konnte mit der Direktmessung noch Ergebnisse erzielt werden, mit der Filtersammlung oder dem Ausspülen der Mikrotiterstreifen jedoch nicht mehr.

Auch bei den höheren Konzentrationen gibt es Ausreißer, bei denen mit dem Filtersystem keine Ergebnisse gemessen werden konnten. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beobachtung, dass nicht alle Proben mit höherer Konzentration auch vom AveX gemessen werden konnten, siehe Abbildung 18.

Lag die Konzentration der Aerosole generell über der Detektionsgrenze, konnte mit dem Filtersystem höhere Konzentrationen als mit den Mikrotiterstreifen gemessen werden. Die Ergebnisse des GSP lagen ca 10-fach höher (Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26). Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine Direktmessung des Mikrotiterstreifens ein höheres nominales Ergebnis liefert, da es zu keiner Verdünnung durch die Probenverarbeitung kommt.

Der höhere Sammlung auf Filterproben zeigt auch der Vergleich der Sporenzahlen von Filtern und Mikrotiterstreifen nach dem Ausspülen, Abbildung 26.

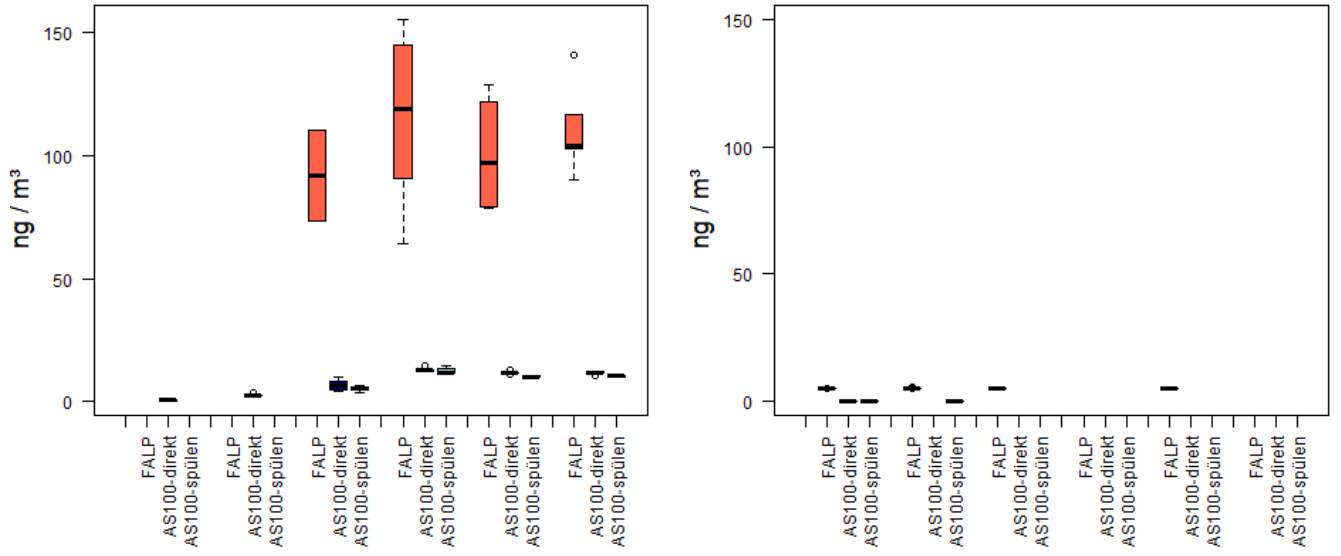


Abbildung 25 – Vergleich der Sammelsysteme GSP (FALP) und AS100; Antigengehalt (ng) der Proben pro m³ Sammelvolumen im zweiten Bioaerosolkammer-Versuch, blau – AS100, rot – GSP (FALP); links – Ergebnisse über der Detektionsgrenze; rechts – Ergebnisse an/unter der Detektionsgrenze; Versuchstage nach Konzentrationen gereiht mit der niedrigsten beginnend

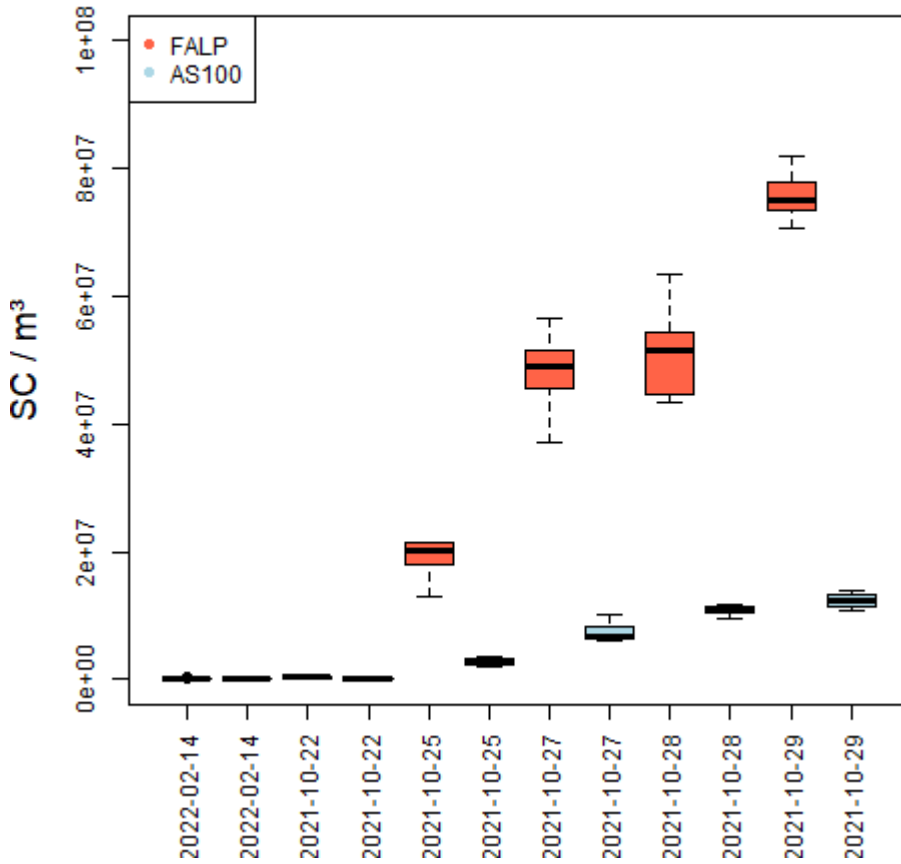


Abbildung 26 – Vergleich der Sammelsysteme GSP (FALP) und AS100; Sporenzahlen der Proben pro m³ Sammelvolumen im zweiten Bioaerosolkammer-Versuch, blau – AS100, rot – GSP (FALP); Versuchstage nach Konzentrationen gereiht mit der niedrigsten beginnend

Untersuchung von Einflüssen durch Lagerung auf die Proben

Um den Einfluss von einer Lagerung auf die verschiedenen Proben zu testen, wurden Aerosole mit dem Bürstendispersierer erzeugt. Die Einstellungen entsprachen jenen vom 25.10. und wurden gewählt, da hier Ergebnisse im gut messbaren Bereich für beide Sammelsysteme erzielt werden konnten.

Es wurden drei Sets mit je drei Probenträgern je Methode hergestellt. Zusätzlich wurde je eine Probe als Kontrolle behandelt. Die Kontrollen wurden, so wie an den anderen Versuchstagen, sofort verarbeitet. Die Lagerungsproben wurden an das BMA Labor zur Lagerung und Aufarbeitung versendet.

Zu diesem Zeitpunkt war der kommerziell erhältliche traditionelle AveX ELISA von Hersteller nicht mehr im Angebot. Durch die Optimierung in der Abarbeitung der Proben, wurden nicht alle drei Sets verarbeitet und gemessen. Lediglich ein Set, nach 21 Tagen Lagerungszeit konnten analysiert werden. In Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Proben für die Sporenzahl (nur Kontrollproben) und den Antigengehalt dargestellt. Die Ergebnisse wurden mit jenen vom 25.10. verglichen (AS100 und FALP ohne Annotation). Der Vergleich von Antigengehalt und Sporenzahl zeigt, dass der Kontrollfilter eine Sporenzahl im messbaren Bereich hatte, aber keine Antigene gemessen werden konnten. Ebenso konnte für die gelagerten Filter keine Ergebnisse erzielt werden. Die AS100 Streifen lagen im messbaren Bereich, ebenso wie am 25.10.. Ohne die Ergebnisse der Filter kann nicht beurteilt werden ob es zu einer signifikanten Reduktion eines der beiden Systeme durch die Lagerung kommt. Die vorhandenen Ergebnisse deuten auf keinen Einfluss auf die AS100 Streifen hin.

Bei der Betrachtung der Antigengehalte von Kolonien und gelagertem Staub, gibt keinen Hinweis auf eine Abnahme der Antigene, die mit dem AveX gemessen werden, siehe Abbildung 12.

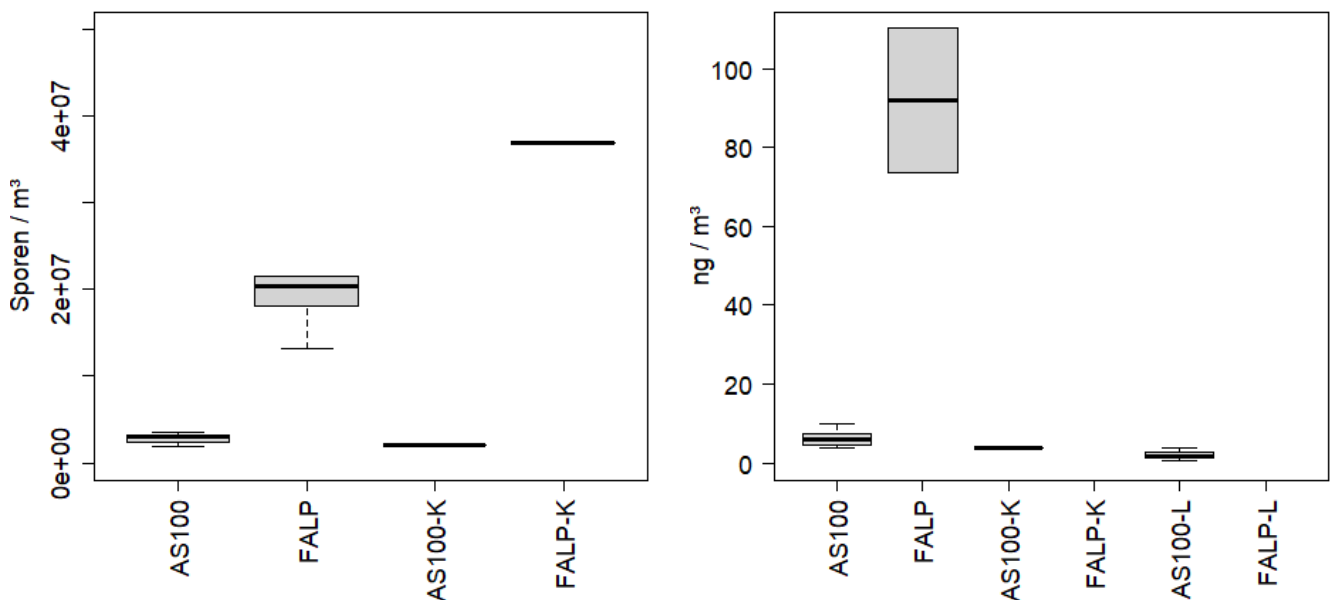


Abbildung 27 – Vergleich von sofort verarbeiteten / versendeten Proben mit gelagerten Proben für den AS100 Sammelkopf (Mikrotiterstreifen) und Teflonfilter (FALP); ohne Endung – Vergleichsproben von einer direkten Verarbeitung; K – Kontrollen am gleichen Tag hergestellt und verarbeitet wie Lagerungsproben; L – Lagerung für 21 Tage, danach Verarbeitung

Untersuchung von Einflüssen durch Transport auf die Proben

Um zu untersuchen, ob es bei dem Transport von Proben zu einem Verlust an Material kommt, wurden so wie für die Lagerungsproben, Probenträger mit dem Bürstendispersierer hergestellt. Es wurde die gleiche Konzentration wie für die Lagerungsproben und die Proben vom 25.10. verwendet.

Ebenso wie für die Lagerungsproben wurden Kontrollproben erstellt, die sofort verarbeitet wurden, drei Probenträger je Methoden. Ein zweites Set von je drei Proben wurde an das BMA Labor versandt und mit dem gleichen Protokoll extrahiert. Um keinen Einfluss durch das Einfrieren der Extrakte der Kontrollproben zu erzeugen, wurden auch die Extrakte der transportierten Proben nach der Extraktion eingefroren.

Wie bereits bei den Lagerungsproben konnten für die Filter keine Antigengehalte gemessen werden, obwohl die Proben im messbaren Bereich erwartet wurden. Es ist unklar, ob dieses Ergebnis auf Verluste während der Extraktion, auf Transportverluste oder eine Kombination dieser Effekte zurückzuführen ist. Für die AS100 Streifen zeigt sich erneut kein Einfluss durch den Transport.

Im Ursprünglichen Projektplan war eine enge Kooperation und ein Entsenden einer Mitarbeiterin des BMA Labors zum AIT nach Tulln geplant. Um den Transport und die Lagerung zu simulieren und alle anderen Einflüsse auszuschließen. Aufgrund der COVID-19 Pandemie war es jedoch nicht möglich, eine entsprechende Reise durchzuführen. Es wäre wünschenswert diese Versuche mit höheren Konzentrationen und einer Verarbeitung und Messung am gleichen Standort erneut durchzuführen.

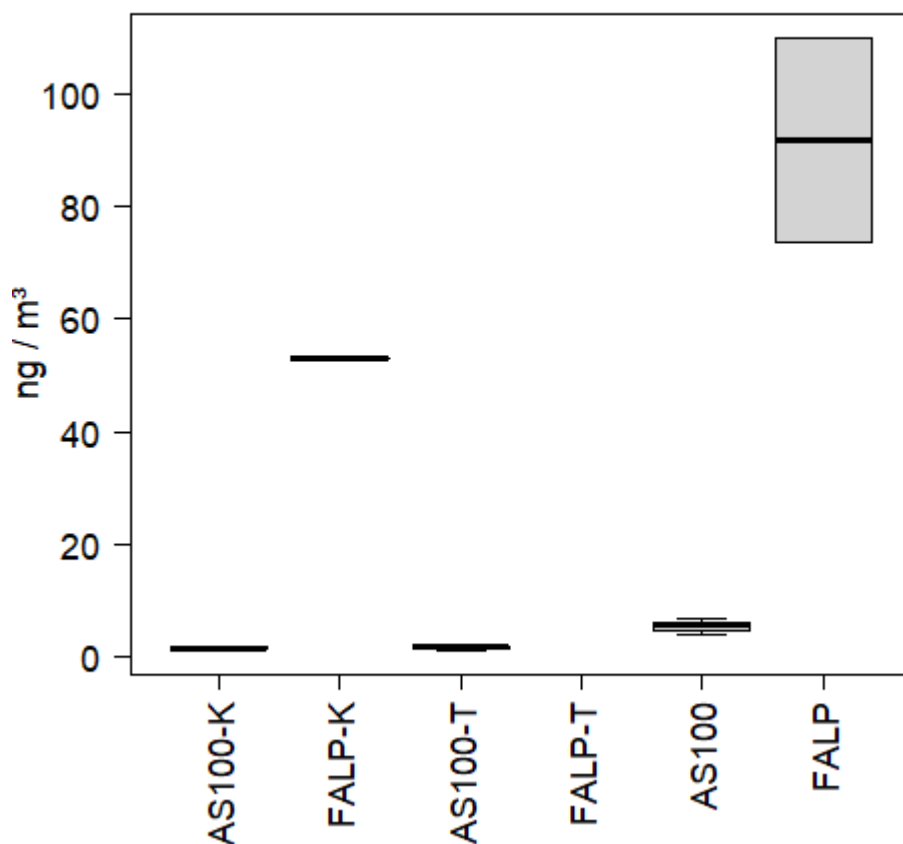


Abbildung 28 – Vergleich von sofort verarbeiteten Proben mit Proben die nach dem Versand verarbeitet wurden, für den AS100 Sammelkopf (Mikrotiterstreifen) und Teflonfilter (FALP); ohne Endung – Vergleichsproben von einer direkten Verarbeitung; K – Kontrollen am gleichen Tag hergestellt und vor dem Versand verarbeitet; T – Transport der Proben nach Bochum und Verarbeitung nach Ankunft

Arbeitspaket 4

Um die Tests, die in kontrollierten und künstlichen Laborbedingungen durchgeführt wurden mit realen Messungen an Arbeitsplätzen zu vergleichen und die Anwendbarkeit des MBASS30 mit AS100 Sammelkopf im Betrieb zu evaluieren wurden Betriebsmessungen geplant. Im Projektplan sind zwei Betriebe in Österreich und zwei in Deutschland vorgesehen. Durch die COVID-19 Pandemie war es lange unsicher ob und wie Messungen in Betrieben möglich wären. Die Messungen in Österreich konnten im Frühjahr und Frühsommer 2021 durchgeführt werden. Die Betriebsmessungen in Deutschland folgten im Spätherbst und Winter 2021/2022.

Beschreibung der Betriebsproben in Österreich und Deutschland

In den zwei Betriebsmessungen in Österreich wurden neben den im Labor eingesetzten Sammelmethode GSP mit Teflonfilter und MBASS30 mit AS100 Streifen, weitere Standardmethoden und Routineanalysen durchgeführt. Gesammelt wurde mit GSP und Polycarbonatfiltern, RCS Highflow und Impaktionsstreifen, Mycometer, sowie MBASS30 mit LKS30 Sammelkopf auf Nährmedien.

Alle Proben bis auf AS100 und Mycometer wurden auf koloniebildende Einheiten untersucht. Die Teflonfilter wurden für qPCR und ELISA Analysen aliquotiert. Die AS100 Streifen wurden mittels ELISA und der Mycometer mit dem entsprechenden enzymatischen Nachweis analysiert.

In Deutschland wurde eine Betriebsmessung in einer Zwiebelsortieranlage und eine in einem Büro durchgeführt. Ebenso wie in Österreich wurden neben GSP mit Teflonfilter und MBASS30 mit AS100 Sammelkopf weitere Sammel- und Analysemethoden eingesetzt. In den Büroräumen wurde Impaktion auf Nährmedien (MAS 100, 100L Sammelvolumen) als Standardverfahren eingesetzt. In der Messung in der Zwiebelsortierung wurde kein weiteres Sammelverfahren, aber die Bestimmung der Gesamt-Schimmelpilzkonzentration über die Koloniezahl der Filterextrakte bestimmt.

Betriebsmessung 1

VetroPack, Glasrecyclinganlage, Österreich, 2021-04-13

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 Proben wurden mit dem AveX auf Antigene von *Aspergillus amoenus* (Clade *Aspergillus versicolor*) untersucht. Für die Teflonfilter waren die Ergebnisse alle unter der Detektionsgrenze. Bei den AS100 Streifen konnte an Probenahmeort A und C, Antigen nachgewiesen werden. Ebenfalls bei einer der Außenluftkontrollen, in Tabelle 8 sind die Ergebnisse der ELISA aufgelistet.

Die Proben wurden außerdem auf den Allergehalt von *Aspergillus fumigatus* Asp f 1 untersucht (Bachelorarbeit Stefan Seidl). Dafür wurden die gleichen Filterextrakte wie für alle anderen ELISA verwendet und ein extra Set an AS100 Streifen gesammelt. Weder für die Teflonfilter noch die AS100 Streifen konnten Allergene nachgewiesen werden.

Die Filterextrakte wurden, im Rahmen des komplementären Projektes SchimmelAntigenDetect, ebenfalls mit den vom IPA entwickelten Schimmelpilz-ELISA gemessen. Die Ergebnisse der ELISA, zeigen eine sehr geringe Konzentration an Pilzantigenen in den Betriebsproben.

Tabelle 8 – Ergebnisse der ELISA Nachweise für die Proben der ersten Betriebsmessung; dl – unterhalb der Detektionsgrenze, leer – nicht gemessen

Extraktion	Sammelort	SammelWH	A. fumigatus [ng/mL]	AS100 A. fumigatus [ng/mL]	AveX [ng]	AS100 AveX [ng/100µL]	Aspergillus fumigatus (Greer) FEIA Antigen [ng/ml]	Cladosporium Antigen [ng/ml]	Penicillium chrysogenum (Allergon) Antigen [ng/ml]	Eurotium amstelodami Antigen [ng/ml]
ohne Aufschluss	A	1	dl	dl	dl	1,568		0,056		0,051
mit Aufschluss	A	1						0,067	0,030	
ohne Aufschluss	A	2	dl	dl	dl	4,254		0,191		0,079
mit Aufschluss	A	2						0,245	0,083	
ohne Aufschluss	A	3	dl	dl	dl	dl		0,147		0,145
mit Aufschluss	A	3						0,178	0,1163	
ohne Aufschluss	B	1	dl	dl	dl	dl	3,075	0,091		0,074
mit Aufschluss	B	1					2,012	0,082		
ohne Aufschluss	B	2	dl	dl	dl	dl		0,804		0,236
mit Aufschluss	B	2						0,782		
ohne Aufschluss	B	3	dl	dl	dl	dl		0,824		0,235
mit Aufschluss	B	3						0,771		
ohne Aufschluss	C	1	dl	dl	dl	0,651		0,052		0,04
mit Aufschluss	C	1						0,05		
ohne Aufschluss	C	2	dl	dl	dl	0,263		0,66		0,226
mit Aufschluss	C	2						0,604	0,089	
ohne Aufschluss	C	3	dl	dl	dl	0,263		0,676		0,205
mit Aufschluss	C	3						0,637	0,088	
ohne Aufschluss	ALK	1	dl	dl	dl	1,217				0,015
mit Aufschluss	ALK	1								
ohne Aufschluss	ALK	2	dl	dl	dl	dl				0,022
mit Aufschluss	ALK	2								

Betriebsmessung 2

PetZero, Kunststoffrecycling Anlage, Österreich, 2021-06-29

Wie in der Betriebsmessung 1, war eine Sporenzählung in den Filterextrakten aufgrund der Hintergrundbelastung mit anderen Aerosolen nicht gut möglich und wurde nicht durchgeführt. Die Filterextrakte wurden mit dem AveX, dem Asp f 1 und den vom IPA entwickelten ELISA analysiert. AS100 Streifen wurden wieder in Duplikaten gesammelt und mit AveX und Asp f 1 untersucht.

Für die Teflonfilter waren die Ergebnisse alle unter der Detektionsgrenze. Die AS100 Streifen waren alle bis auf C2 und C3 unter der Detektionsgrenze. Hier konnten 1,223 ng bzw. 3,257 ng Antigen gemessen werden. Hingegen mit dem IPA *Aspergillus versicolor* ELISA konnte in allen Proben der Hallen (A, B, C) Antigene detektiert werden. Die höchsten Werte wurden in Halle C gemessen. Dort konnten außerdem die höchsten Antigenwerte der anderen spezifischen ELISA (*Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus amstelodami* und *Wallemia sebi*) gemessen werden, siehe Tabelle 9.

Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich der kommerzielle Asp f 1 ELISA und der IPA ELISA möglicherweise hinsichtlich Spezifität und Sensitivität unterscheiden können, da den beiden ELISA Tests monoklonale bzw. polyklonale Nachweisverfahren zugrunde liegen. Für den Asp f 1 konnte weder für die Teflonfilter noch die AS100 Streifen Allergene nachgewiesen werden.

Tabelle 9 - Ergebnisse der ELISA Nachweise für die Proben der zweiten Betriebsmessung; dl – unterhalb der Detektionsgrenze, leer – nicht gemessen

Extraktion	Sammelort	SammelWH	AVeX [ng/mL]	AS100 AVeX [ng]	Cladosporium Antigen [ng/ml]	Penicillium chrysogenum (Allergen) Antigen [ng/ml]	Eurotium amstelodami Antigen [ng/ml]	Walleimia sebi Antigen [ng/ml]	Aspergillus versicolor Antigen [ng/ml]
ohne Aufschluss	A	1	dl	dl	0,293	dl	0,364	0,668	1,900
mit Aufschluss	A	1			0,314	dl	0,367	0,457	1,948
ohne Aufschluss	A	2	dl	dl	0,600	0,188	0,236	0,52	2,035
mit Aufschluss	A	2			0,606	0,178	0,255	0,709	1,609
ohne Aufschluss	A	3		dl					
mit Aufschluss	A	3							
ohne Aufschluss	B	1	dl	dl	0,413	0,349	0,226	0,863	3,497
mit Aufschluss	B	1			0,396	0,287	0,208	0,98	2,924
ohne Aufschluss	B	2	dl	dl	0,457	0,39	1,297	dl	3,976
mit Aufschluss	B	2			0,489	0,341	0,380	1,016	3,619
ohne Aufschluss	B	3		dl					
mit Aufschluss	B	3							
ohne Aufschluss	C	1	dl	dl	1,319	0,679	1,378	2,10	7,296
mit Aufschluss	C	1			1,276	0,745	1,630	0,834	7,094
ohne Aufschluss	C	2	dl	1,223	1,252	0,703	0,816	0,749	4,979
mit Aufschluss	C	2			1,283	0,565	0,884	1,193	4,294
ohne Aufschluss	C	3		3,257					
mit Aufschluss	C	3							
ohne Aufschluss	ALK	1	dl	dl	dl	dl	dl	dl	dl
mit Aufschluss	ALK	1			dl	dl	dl	dl	dl
ohne Aufschluss	ALK	2	dl	dl	0,054	dl	dl	0,811	dl
mit Aufschluss	ALK	2			0,062	dl	0,083	dl	dl

Betriebsmessung 3

Zwiebelsortierung, Deutschland, 2021-12-10

In der Zwiebelsortierungsanlage wurden drei Proben auf Teflonfilter (GSP, 10 L/min, 600 L Sammelvolumen) und drei AS100 Streifen (MBASS30, 100 L/min, 2000L Sammelvolumen) beaufschlagt.

Die Filterproben wurden hinsichtlich *Aspergillus versicolor* mit dem AVeX, sowie der Zahl der koloniebildenden Einheiten untersucht. AS100 Streifen wurden mit dem AVeX analysiert.

Die Zahl der Koloniebildenden Einheiten lag zwischen 7000 und 11000, trotzdem konnten keine Antigene in den Filterproben nachgewiesen werden. In den AS100 Streifen konnten hingegen geringe Konzentrationen an Antigenen nachgewiesen werden.

Tabelle 10 - Ergebnisse für die Proben der dritten Betriebsmessung; dl – unterhalb der Detektionsgrenze

AS100 ng/m ³	Teflonfilter ng/m ³	Koloniebildende Einheiten #/m ³
dl	dl	7361
0,434	dl	24722
1,038	dl	10833

Betriebsmessung 4

Büro, Deutschland, 2022-01-13

In der Büromessung wurden drei Proben auf Teflonfilter (GSP, 10 L/min, 600 L Sammelvolumen) und sechs AS100 Streifen (MBASS30, 100 L/min, 2000L Sammelvolumen) beaufschlagt. Außerdem wurden 16 Impaktionsproben auf Nährmedien (MAS100, 100 L/min, 100 L Sammelvolumen; je 8 auf MEA und DG18) genommen.

Sowohl in den Proben der AS100 Streifen als auch einem Teflonfilter konnten Antigene mit dem AveX nachgewiesen werden. Passend zu diesen Ergebnissen, wurden auf den Nährmedien Platten Vertreter der Clade *Aspergillus versicolor*, subclade *sydowii* gefunden. Sowohl die Wiederholungen der AS100 Streifen als auch der Teflonfilter und Impaktionsproben zeigen hohe Variationen zwischen den Ergebnissen. Von den drei Teflonfiltern wurde nur einer positiv auf Antigene mit dem AveX getestet.

Tabelle 11 - Ergebnisse für die Proben der vierten Betriebsmessung; dl – unterhalb der Detektionsgrenze

AS100 ng/m ³	Teflonfilter ng/m ³	Koloniebildende Einheiten #/m ³	Identifizierte Arten / Gattungen der KBE
1,462	dl	60	<i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus restrictus</i> , <i>Aspergillus sydowii</i> , <i>Cladosporium</i>
0,487	75	40	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Cladosporium</i> , Myzel
dl	dl	70	<i>Aspergillus restrictus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Wallemia sebi</i> ,
dl		20	Myzel
dl		90	Schwarze Hefe, Myzel
0,316		40	Myzel
		dl	
		30	<i>Aspergillus sydowii</i> , Myzel

Conclusio zu Betriebsproben

Die Filterextrakte der Betriebsproben aus Österreich konnten mit koloniebildenden Einheiten, verschiedenen ELISA und qPCR analysiert werden. 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*.

Die Büromessung zeigte die geringsten Zahlen an koloniebildenden Einheiten, es konnten jedoch sowohl mit den KBE als auch mit dem AveX ELISA die Clade *Aspergillus versicolor* nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Ergebnisse für Teflonfilter und AS100 Streifen zeigt, dass nur in einer Filterprobe, hingegen in mehreren AS100 Streifen Werte über der Nachweisgrenze gemessen werden konnten. Die Ergebnisse der Filterprobe umgerechnet auf ng/m³ zeigt ein deutlich höheres Ergebnis als die parallel beaufschlagten AS100 Streifen. Damit führen die Daten der Betriebsproben die Ergebnisse der Laborversuche fort, auch diese sehr hohe Schwankungen zwischen den Ergebnissen der Sammelwiederholungen zeigen.

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 und die AUVA, die hier dargestellten Ergebnisse in einer gemeinsamen Publikation des AIT und den Projektpartnern 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 Schutzrechtsanmeldungen bekannt, die innerhalb der Projektlaufzeit durchgeführt wurden und die Arbeiten oder die Ergebnisse betreffen.

Verschiedene andere Verfahren, für die Sammlung von Material für den Antigen und Allergennachweis wurden bereits publiziert. Generell kann jede Probe, die nach der Sammlung und Verarbeitung in einer Flüssigkeit vorliegt, für den Nachweis von Allergenen oder Antigenen herangezogen werden. Während der Laufzeit des Projektes wurde ein Review verfasst, in dem verschiedene Methoden beschrieben wurden. Außerdem wird ein Zyklon-Sammler der Firma Burkard zur Detektion von Pollenallergenen eingesetzt:

Einen Überblick gibt ein Review von 2020 – neben der Filtration ist die Verwendung von Filtern aus Öfen oder die Sammlung mittels Ladung (Ion-charging device) beschrieben. Außerdem wird auch die personalisierte Sammlung in der Nase aufgezählt. Da die Sammlung mittels Ladung eine geringere Effizienz, als die Filtersammlung aufweist, ist es unwahrscheinlich, dass eine der beschriebenen Methoden eine praktikable Alternative zur GSP und MBASS30 darstellt.

Grant T, Rule AM, Koehler K, Wood RA, Matsui EC. Sampling Devices for Indoor Allergen Exposure: Pros and Cons. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2019 Feb 12;19(1):9. doi: 10.1007/s11882-019-0833-y. PMID: 30747291

Für die Sammlung von Pollen und dem Nachweis ihrer Allergene, werden häufig Zyklon Sammler (Burkard) eingesetzt. Mit diesen Geräten können mehrere Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen werden. Allerdings sind die Geräte verhältnismäßig groß und teuer und eher für den stationären Einsatz geeignet. Für Messungen an Arbeitsplätzen sind diese Geräte keine Alternative.

Ščevková J, Vašková Z, Sepšiová R, Dušička J, Kováč J. Relationship between Poaceae pollen and Phl p 5 allergen concentrations and the impact of weather variables and air pollutants on their levels in the atmosphere. *Heliyon.* 2020 Jul 10;6(7):e04421. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04421. PMID: 32685736; PMCID: PMC7355991.

Für die Sammlung von Pollen wurde auch ein high-volume Sammler, der ChemVol bereits in früheren Studien beschrieben. Diese Methode wird zurzeit vom AIT, im Rahmen des Danube-ARC Projektes, für die Sammlung von Basidiomyceten Allergenen aus der Außenluft getestet.

Stefanie Ochs. Größenfraktionierte Detektion von Allergenen, Allergen beladenen Partikeln und Pollen in der Umluft. Dissertation, MedUni Wien, 2011. (<https://mediatum.ub.tum.de/doc/966862/966862.pdf>)

Für den Nachweis von Allergenen und Antigenen stehen am Markt verschiedene Systeme zur Verfügung. Neben den ELISA des IPA und von Indoor Biotechnologies, sind auch Chips, Plattformen oder Arrays mit Nachweisen von verschiedenen Allergenen publiziert. Bei diesen sind meist einige der häufigsten Arten von Schimmelpilzen (*Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*) in der Palette von Häufigen Allergenen (nicht nur luftgetragene) enthalten.

Die ELISA des IPA wurden im komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect getestet und zeigen gute Einsatzfähigkeit.

Die Liste an erhältlichen ELISA bei Indoor Biotechnologies veränderte sich während der Projektlaufzeit und es sind nur noch ELISA für zwei Pilzallergene vorhanden (Alt a 1 und Asp f 1). Der AveX ELISA wurde während der Projektlaufzeit aus dem Sortiment genommen.

...

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

Dieses Forschungsvorhaben hatte zum Ziel Sammelverfahren für den Nachweis von Antigenen bzw. Allergenen zu evaluieren. Einerseits sollte das bereits im Rahmen von DGUV Forschungsprojekten eingesetzte Sammelverfahren für Allergene und Antigene – Gesamtstaubprobenahme auf Teflonfilter (10 L/min) – getestet werden. Andererseits ein Verfahren (Sammlung in Mikrotiterstreifen), das von der BMA-Labor GbR in Kooperation mit der UA Holbach GmbH (Entwicklung des AS100 Sammelkopfs für das Gerät MBASS30) entwickelt wurde– untersucht werden. Beide Systeme sollten in mehreren Konzentrationen im Labor und in Betriebsmessungen miteinander verglichen werden.

Der Test der beiden Systeme unter kontrollierten Bedingungen in einer Bioaerosolkammer zeigte, dass beide Methoden den Anstieg von Konzentrationen gut abbilden konnten. Für das MBASS30 mit AS100 System ist es möglich die Mikrotiterstreifen direkt oder nach dem Ausspülen zu Messen. Der Vergleich der beiden Verfahren zeigte, dass die direkte Methode sensitiver ist als die indirekte. Mit dieser konnten auch Antigengehalte nachgewiesen werden bevor mit den GSP auf Teflonfiltern Konzentrationen über der Detektionsgrenze des ELISA vorhanden waren.

Die direkte und die indirekte Methode zeigten eine sehr gute Korrelation zueinander ($\rho = 0,962$). Die direkte Messung ist sensitiver, die indirekte ermöglicht es verschiedene Nachweisverfahren einzusetzen. Die mikroskopische Untersuchung hat gezeigt, dass die Partikel auf der gesamten Höhe der Seitenwände der Kavitäten verteilt sind, das sollte bei den Protokollen für die direkte und indirekte Messung berücksichtigt werden. In den Protokollen des BMA Labors werden für beide Nachweisverfahren, nach dem Einfüllen des Puffers in die Kavitäten, ein Vortex Schritt durchgeführt, um das gesamte Material in die Flüssigkeit zu bringen.

Generell konnte mit der GSP Sammlung auf Teflonfilter höhere Antigengehalte gemessen werden als mit dem MBASS30 und AS100. Aufgrund der hohen Verdünnung durch das Extrahieren der Filter in 5mL Puffer, ist zwar die Nachweisgrenze höher, die gemessene Konzentration pro m^3 war bei erfolgreichem Nachweis aber zirka 10 mal so hoch wie für die Messung mit dem AS100. Der Vergleich der beiden Sammelsysteme mit den spezifischen ELISA für Asp f 1 zeigte keine Werte für keines der beiden Sammelsysteme. *Aspergillus fumigatus* zeigte aber auch im komplementären Projekt SchimmelAntigenDetect eine sehr hohe Nachweisgrenze bei ELISA, berechnet an der gezählten Sporenzahl. Dies rührt wahrscheinlich von der sehr kleinen Sporengröße und damit geringen Gesamtproteingehalt pro Spore.

Die Untersuchung von Transport- und Lagerfähigkeit der Proben, war von der geringen Nachweisgrenze der Teflonfilter betroffen. Obwohl Sporenkonzentrationen gewählt wurden, die bei allen vorangegangenen Messungen einen Nachweis von Antigenen ermöglicht haben, konnte für die gelagerten und transportierten Filter keine Ergebnisse gewonnen werden. Die AS100 Streifen zeigten keinen Einfluss des Transportes (nachfolgende indirekte Messung) oder der Lagerung (Lagerzeit 21 Tage).

Die Beobachtung, der Sensitivität aber auch der Unterschiede der Berechneten Konzentrationen pro m^3 , konnten auch bei den Betriebsmessungen bestätigt werden. Bei diesen Messungen konnte auch die Handhabung beider Geräte an Arbeitsplätze evaluiert werden. Das MBASS30 mit AS100 System hat den Vorteil nur 20 Minuten für eine 2000 L Sammlung zu benötigen. Allerdings handelt es sich um verhältnismäßig große und teure Geräte, die

eine gleichzeitige Sammlung mit mehreren Geräten limitieren. Werden die Mikrotiterstreifen nach der Sammlung direkt gemessen, muss für jeden ELISA ein Streifen gemessen werden. Filtersammelköpfe und personengetragene Pumpen sind bei der DGUV und der AUVA bereits vorhanden, eine Sammlung von mehreren Wiederholungen auf verschiedenen Messplätzen gleichzeitig ist meist gut möglich. Die Filterextrakte können nach der Sammlung mit mehreren Verfahren untersucht werden. Die Analyse in den Büroräumen konnte wiederum den Vorteil der AS100 Sammlung mit direkter ELISA Messung im Mikrotiterstreifen zeigen.

Zusammenfassend ist für den Einsatz in Betrieben anzumerken, dass das MBASS30 mit AS100 System eine gute Ergänzung bei spezifischen Fragestellungen an Arbeitsplätzen darstellt. Besonders bei einem Verdacht auf einen konkreten Schimmelpilz ist das sensitive System (vorausgesetzt die Analyse erfolgt direkt im Mikrotiterstreifen) wertvoll.

Da die Evaluierung nur mit dem AveX ELISA, der ein Gemisch aus verschiedenen Antigenen der Clade *Aspergillus versicolor* nachweist, erfolgreich durchgeführt wurde, wäre für zukünftige Projekte der Test von anderen, eventuell Allergen spezifischen ELISA interessant. Für diese Tests sollte ein ELISA mit einer geringen Nachweisgrenze und / oder Sporen mit einem hohen Allergengehalt gewählt werden.

7. Aktueller Umsetzungs- und Verwertungsplan

Die in diesem Bericht dargestellten Ergebnisse stehen den Auftraggebern – DGUV Forschungsförderung und AUVA – zur Verfügung. Über einen Einsatz der beiden Sammelsysteme in Betrieben kann nur durch die jeweiligen Institutionen entschieden werden.

Die Forschungsinstitute AIT und BOKU sind interessiert beide Systeme in Zukunft weiter für Forschungszwecke einzusetzen. Vor allem wäre die Evaluierung für spezifischen Allergene, die in weit geringerer Konzentration als Antigene vorliegen, interessant.

In einem 2020 gestarteten niederösterreichischen Projekt, Danube-ARC, wird die Sammlung mittels GSP und Teflonfilter zum Monitoring von Pilzen in der Außenluft eingesetzt. Dabei werden die Extrakte sowohl für die Sequenzierung von Marker-DNA-Abschnitten, als auch zur Betrachtung der vorhandenen Proteine eingesetzt.

8. Anhang/Anhänge

Bachelorarbeit Stefan Seidl

Berichte Betriebsmessungen

Anmerkungen zu den Probenahmeverfahren

Literatur

- Alsved, Malin et al. 2020. "Natural Sources and Experimental Generation of Bioaerosols : Challenges and Perspectives." *Aerosol Science and Technology* 54(5): 547–71.
<http://dx.doi.org/10.1080/02786826.2019.1682509>.
- 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.
- Geistlinger, A. 2016. "Berufsasthma - Allergologisch-Pneumologische Berufserkrankungen Und Berufsallergene." *Journal für Pneumologie* 4(1): 47–52.
- Jurjevic, Zeljko, Stephen W Peterson, and Bruce W Horn. 2012. "Aspergillus Section Versicolores : Nine New Species and Multilocus DNA Sequence Based Phylogeny." 3(1): 59–79.
- Liu, Cindy M et al. 2012. "FungiQuant: A Broad-Coverage Fungal Quantitative Real-Time PCR Assay." *BMC Microbiology* 12(1): 255. <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-12-255>.
- Mainelis, Gediminas et al. 2005. "Design and Performance of a Single-Pass Bubbling Bioaerosol Generator." *Atmospheric Environment* 39: 3521–33.
- Mayer, Christian. 2020. "Methodenentwicklung Zur Untersuchung Des Einflusses Ausgewählter Parameter Auf Den Asp F1 Gehalt von Aspergillus Fumigatus Sporen." Universität für Bodenkultur Wien.
- ÖNORM EN 13098. 2018. *ÖNORM 13098*.
- Pabst, Regine et al. 2007. "Sensibilisierungsstatus Gegen Umwelt- Und Berufsallergene Bei Land- Wirtschaftlichen Berufsanfängern." In 47. *Wissenschaftliche Jahrestagung, Deutsche Gesellschaft Für Arbeitsmedizin Und Umweltmedizin e.V.*, eds. Stephan Univ.-Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Letzl, Kirsten Isabel Dipl.-Psych. Löffler, and Carola Dipl.-Dok. (FH) Seitz. , 94–98.
- Pogner, Clara et al. 2019. "A Novel Laminar-Flow-Based Bioaerosol Test System to Determine Biological Sampling Efficiencies of Bioaerosol Samplers." *Aerosol Science and Technology* 53(4): 355–70.
<https://doi.org/10.1080/02786826.2018.1562151>.
- 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.
- Raulf, Monika et al. 2014. "Inhalationsallergien Am Arbeitsplatz : Bedeutung , Diagnostik Und Prävention." *ASU Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin* 49: 284–92.
- Ring, J. (DAAU), C. (DGAKI) Bachert, C.-P. (GPA) Bauer, and W. (ÄDA) Czech. 2010. *Weißbuch Allergien in Deutschland*. 3. Auflage. München: Springer Medizin © Urban & Vogel GmbH.
- Schröer, 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.
- Seidl, Stefan. 2021. "Analysis of Aspergillus Fumigatus Bioaerosols." Universität für Bodenkultur.
- Stephan, Ute, and Stephanie Putz. 2012. "Probenahme Und Quantifizierung von Antigenen Und Allergenen Schimmelpilzproteinen in Der Luft." *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 72(6): 274–80.