

Emissionsmessung von Endotoxinen – Vergleichsuntersuchung mit LAL- und rFC-Tests sowie Ermittlung von Verfahrenskenngrößen

A. Gärtner, K. Hoppenheidt, S. Knust, A. Kolk, M. Lohmeyer, V. Liebers, G. Linsel, S. Peters

ZUSAMMENFASSUNG Im Zuge der Erarbeitung der Richtlinie VDI 4254 Blatt 2, die die Emissionsmessung von Endotoxinen an Betriebsanlagen beschreibt, wurden Vergleichsmessungen mit Limulus-Amöbozyten-Lysat(LAL)- und rekombinanter-Faktor-C(rFC)-Tests durchgeführt und Verfahrenskenngrößen für das vollständige Messverfahren nach der Richtlinie VDI 4219 bestimmt. Hierfür fanden an einer zwangsbelüfteten Hähnchenmastanlage zum Zeitpunkt hoher bakterieller Emissionen 25 parallele Probenahmen (Doppelbestimmungen) mit dem Impingement-Verfahren statt. Die Endotoxinaktivitäten wurden von fünf Laboren mithilfe von LAL- und rFC-Tests verschiedener Hersteller gemessen. Beide Methoden erwiesen sich als grundsätzlich für die Analytik von Emissionsproben geeignet, lieferten jedoch Konzentrationsangaben in unterschiedlicher Höhe. Da der rFC-Test keine Pfeilschwanzkrebse benötigt und die Messunsicherheit niedriger ist als beim LAL-Test, wurde für die Aktivitätsbestimmung von Endotoxinen in Emissionsproben nach der Richtlinie VDI 4254 Blatt 2 ausschließlich die Analytik mit dem rFC-Test beschrieben und standardisiert.

Emission measurement of endotoxins – comparison measurement of LAL and rFC-tests and determination of performance characteristics

ABSTRACT In drawing up guideline VDI 4254 Part 2, which describes the emission measurement of endotoxins at operational facilities, comparison measurements with Limulus Amoebocyte Lysate (LAL)- and recombinant Factor C (rFC)-tests were made and performance characteristics for the complete measurement procedure were determined according to guideline VDI 4219. For this purpose, 25 parallel samplings (double determinations) using impingers were carried out at a poultry house at high levels of bacterial emissions. The endotoxin activities were measured by five laboratories applying LAL- and rFC-tests from various manufacturers. The results showed that both methods in principle are suitable for the analysis of emission samples but yield different concentration levels. Due to the fact that rFC-tests do not need horse shoe crabs and show a lower measurement uncertainty compared to the LAL-test, the analysis of endotoxin activities in emission samples according guideline VDI 4254 Part 2 was described and standardized only for the rFC-test.

1 Einleitung und Ziel der Untersuchung

Seit vielen Jahren erarbeitet die VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) – Normenausschuss Richtlinien zur Messung und Bewertung von Bioaerosolen. So liegt mit der Richtlinie VDI 4257 Blatt 2 bereits seit September 2011 ein standardisiertes Probenahmeverfahren zur Erfassung von Bakterien und Schimmelpilzen in Emissionen aus Anlagen vor [1] und auch für den analytischen Nachweis dieser Mikroorganismen gibt es entsprechende Vorschriften auf der Basis von Kultivierung oder Anfärbung [2 bis 4]. Seit kurzem steht für die Emissionsmessung von Endotoxinen die Richtlinie VDI 4254 Blatt 2 als Entwurf zur Verfügung, die das vollständige Messverfahren für deren Probenahme und Analytik beschreibt [5].

Endotoxine sind Strukturbestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, z. B. Enterobakterien, Pseudomonaden oder Salmonellen. Biochemisch handelt es sich dabei im Wesentlichen um Lipopolysaccharide. Diese spielen eine Rolle bei der Erhaltung der Zellintegrität, beeinflussen die Eigenschaften der Zellmembranen und die Wechselwirkung der Bakterien mit ihrer Umgebung. Wenn Bakterien absterben und zerfallen, können Endotoxine freigesetzt werden. Während sie in der Außenluft natür-

licherweise nur in Spuren vorhanden sind [6; 7], können an Arbeitsplätzen und im Zusammenhang mit Emissionen aus Anlagen erhöhte Werte von mehr als 100 EU/m³ auftreten [8; 9] (EU = Endotoxin Units). Da Endotoxine sehr unempfindlich gegenüber Hitze, Kälte, Austrocknung und UV-Strahlung sind, können sie sich in der Umwelt entsprechend anreichern.

Inhalationsstudien haben belegt, dass endotoxinhaltige Stäube in höheren Konzentrationen adverse Wirkungen auf die Gesundheit des Menschen haben. Hierzu zählen grippeähnliche Symptome und Atemwegserkrankungen [10]. Deshalb sind Endotoxine möglicherweise als weiterer Leitparameter bzw. Indikator für anlagenbezogene Belastungen durch Bioaerosole zu betrachten. Zwar gibt es für Endotoxine in Deutschland keinen Emissionsgrenzwert, jedoch sieht die Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft (TA Luft) für bestimmte Anlagenarten vor, dass „die Möglichkeiten, die Emissionen an Keimen und Endotoxinen durch dem Stand der Technik entsprechende Maßnahmen zu vermindern, zu prüfen sind“ [11]. Hinweise zum Auftreten von Endotoxinen liefert auch die Richtlinie VDI 4250 Blatt 3, in der für verschiedene Anlagenarten als fakultativ zu messende Parameter aufgeführt sind [12].

Es war somit sinnvoll und schlüssig, ein standardisiertes Verfahren für die Messung von Endotoxinemissionen zu beschreiben. Nach eingehender Diskussion verständigte sich die KRdL-Arbeitsgruppe darauf, abweichend von der Vorgehensweise im Arbeitsschutz, bei der partikelgebundene Endotoxine auf Filtern gesammelt werden, das Impingement-Verfahren nach der Richtlinie VDI 4257 Blatt 2 [1] als Grundlage für die Probenahme festzulegen. Hiermit wird bei Emissionsmessungen die Möglichkeit eröffnet, in einem einzigen Arbeitsschritt eine Probenahme sowohl von Bakterien als auch von Endotoxinen durchzuführen. Das Verfahren beruht darauf, einen Teilvolumenstrom der Abluft unter definierten Bedingungen durch den Emissions-Impinger zu leiten. Vorhandene Partikel einschließlich Mikroorganismen werden dabei in einer Sammelflüssigkeit abgeschieden und angereichert.

Für den quantitativen Nachweis der Endotoxine aus der Sammelflüssigkeit stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Als Standardtest im Bereich des Arbeitsschutzes wurde bisher nach Probenahme auf Filtern gemäß IFA-Arbeitsmappe, Kennziffer 9450, der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test eingesetzt [13]. Das LAL-Reagens wird aus der Hämolymphe von Pfeilschwanz-Krebsen (Limulidae; engl.: horse shoe crab) hergestellt. Bei Kontakt mit Endotoxinen oder anderen pyrogen wirkenden Stoffen wird eine Gerinnungskaskade ausgelöst, die zu einer Trübung, oder, bei der chromogen-kinetischen Variante des Tests, zu einer Farb-reaktion führt. Dementsprechend werden die Endotoxinwerte – nach erfolgter Kalibrierung – turbidimetrisch oder photometrisch bestimmt. Beim rekombinanter-Faktor-C (rFC)-Test erfolgt die Endotoxinmessung mit einem rekombinant erzeugten Enzym (Faktor C) aus der Enzymkaskade des Limulus, das durch Endotoxin aktiviert wird. Grundlage sowohl des LAL- als auch des rFC-Tests ist somit die Fähigkeit des Endotoxins zur Enzymaktivierung, weshalb die Messergebnisse als Aktivitätseinheiten (Endotoxin Units = EU) angegeben werden. Der rFC-Test hat sich generell als weniger störanfällig gegenüber Matrixeffekten erwiesen, da nur ein Teil der beim LAL-Test ablaufenden Gerinnungskaskade an der Reaktion beteiligt ist. Beispielsweise treten keine Querempfindlichkeiten durch β -Glucane auf, die beim LAL-Test falsch positive Ergebnisse auslösen können. Die Quantifizierung der Endotoxine erfolgt beim rFC-Test durch Fluoreszenzdetektion. Der rFC-Test wurde zum 1. Juni 2016 in die Europäische Pharmakopöe 8.8 Kap. 5.1.10 als alternatives Verfahren zum LAL-Test aufgenommen [14]. Dort findet sich auch der Hinweis, dass durch die Anwendung des rFC-Tests der Einsatz lebender Tiere überflüssig wird. Da das natürliche Vorkommen von Pfeilschwanzkrebsen begrenzt ist und ethische Aspekte deren Einsatz immer mehr infrage stellen, gewinnt der rFC-Test im pharmazeutischen Anwendungsbereich zunehmend an Bedeutung.

Bisher gibt es nur wenig Erfahrung bei der Analyse von Emissionsproben auf Endotoxine mit LAL- und rFC-Tests. Da systematische Untersuchungen hierzu nicht vorliegen, schlug das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) vor, zu diesem Themenkomplex im Rahmen der Standardisierung des Messverfahrens als VDI-Richtlinie eine Vergleichsuntersuchung durchzuführen. Hierbei sollten sowohl die Eignung beider Tests als Analyseverfahren für Emissionsproben geprüft als auch Verfahrenskenngrößen für das vollständige Messverfahren ermittelt werden. Zusätzlich sollten die Versuche weitere Hinweise zur konkreteren Beschreibung des Verfahrens in der Richtlinie VDI 4254 Blatt 2

liefern. Im Folgenden werden Planung, Vorgehensweise und Ergebnisse der Untersuchungen zusammenfassend dargestellt.

2 Vorgehensweise und Methoden

2.1 Allgemeines und Organisatorisches

Das Untersuchungsvorhaben wurde vom Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft, Natur- und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen finanziell unterstützt. Alle beteiligten mikrobiologischen Labore führten die Analysen in personeller Eigenleistung durch.

Die Organisation der Vergleichsmessung, die Durchführung der Probenahmen sowie die Auswertung der von den Laboren zur Verfügung gestellten Ergebnisse erfolgten durch das LANUV NRW. Die arbeitstägliche Bearbeitung und Aliquotierung der einzelnen Proben nach den Probenahmen für die anschließenden Analysen wurde im Mikrobiologischen Labor Dr. Lohmeyer, Münster, durchgeführt. An der analytischen Bestimmung der Endotoxine beteiligten sich insgesamt fünf Labore, wahlweise mit einer oder beiden Methoden (LAL- und rFC-Test). Man vereinbarte, dass die Labore diejenigen Tests einsetzen, die im Laborbetrieb üblicherweise zur Anwendung kommen, um den routinemäßigen Umgang mit den entsprechenden Gerätschaften und der dazugehörigen Software sicherzustellen. Alle Arbeitsschritte wurden im Vorfeld mit den beteiligten Laboren umfassend diskutiert und abgestimmt. Dies betraf insbesondere Verdünnungsschritte, sowie das Einfrieren und Verteilen der Proben.

2.2 Bestimmung der Messunsicherheit

Bei Emissionsmessungen erfolgt die Bestimmung der Messunsicherheit üblicherweise nicht durch sukzessive Beprobung desselben Messobjektes zu unterschiedlichen Zeitpunkten, da im Messquerschnitt zeitlich und örtlich variierende Konzentrationen auftreten können. Eine geeignete Möglichkeit zur Ermittlung der Unsicherheiten von Messergebnissen, die mit diskontinuierlichen Emissionsmessverfahren gewonnen werden, sind zeitgleiche Doppelbestimmungen mit zwei baugleichen Messeinrichtungen gemäß der Richtlinie VDI 4219 [15]. Hierbei werden parallele Probenahmen an eng beieinanderliegenden Stellen im Abluftkanal durchgeführt. Bei dieser Vorgehensweise wird davon ausgegangen, dass die Zusammensetzung der Abluft an den jeweiligen Probenahmeorten keine systematischen Unterschiede aufweist. Um eine ausreichende Anzahl an gültigen Werten zu erzielen, wurde festgelegt, insgesamt 25 Doppelbestimmungen (DB) durchzuführen, da die Anzahl auswertbarer Datenpaare mindestens 20 betragen soll.

Die Standardabweichung s aus Doppelbestimmungen berechnet sich zu

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x'_i - x''_i)^2}{2N}} \quad (1)$$

mit

x'_i = i'ter Messwert der DB X.1

x''_i = i'ter Messwert der DB X.2

N = Anzahl der ausgewerteten Doppelbestimmungen.

Die erweiterte Messunsicherheit $U_p(y)$ eines Messergebnisses y für ein Vertrauensniveau p wird durch Multiplikation der Standardabweichung s mit dem Erweiterungsfaktor k berechnet. Für ein Vertrauensniveau p von 95 % wird bei genügend hohem Stichprobenumfang (Freiheitsgrade >30) mit $k = 2$ gerechnet. Somit gilt:

$$U_{95} = s \cdot 2$$

Tabelle 1. Parameter während der Probenahmen (GV = Großvieheinheit).

Parameter	Messtag				
	1	2	3	4	5
Masstag	29	30	31	35	36
Anzahl Tiere	34 135	34 120	34 107	34 070	34 063
Mittlere Einzeltiermasse in kg	1,603	1,665	1,707	2,062	2,131
Anzahl Großvieheinheiten	109	114	116	141	145
Luftdruck in hPa	1006	1010	1006	1023	1033
mittlere Außentemperatur Probenahmezeitraum in °C	26,0	21,8	20,1	10,5	10,0
Relative Luftfeuchte in %	53	59	53	55	66
mittlere Ablufttemperatur Probenahmezeitraum in °C	29,1	26	25,2	20,8	21,2
Luftfeuchte Abluft in g/m ³	14	13	13	13	14

2.3 Durchführung der Probenahmen

Die Messungen erfolgten an einem zwangsbelüfteten Stall, der Teil einer Anlage zur Haltung oder Aufzucht von Nutztieren gemäß Nr. 5.4.7.1 TA Luft ist und der dem LANUV aus vorangegangenen Untersuchungen gut bekannt war [16; 17]. Die Hähnchen werden als Eintagesküken eingestallt und ca. 40 Tage auf gebrochenen Holzpellets gehalten. Ein Teil der Tiere wird nach dem Splitting-Verfahren bereits nach 28 Tagen vorzeitig ausgestallt, um den verbleibenden Hähnchen mehr Platz zu geben und die maximal zulässige Besatzdichte nicht zu überschreiten. Alle Probenahmen erfolgten zum Zeitpunkt hoher bakterieller Emissionen in den letzten beiden Mastwochen der Mastperiode. An jedem Messtag wurden fünf parallele isokinetische Probenahmen durchgeführt und zwei Feldblindwertproben erzeugt. Zusätzlich wurden die Abluftrandbedingungen ermittelt. Das abgesaugte Normvolumen variierte geringfügig von Probe zu Probe und betrug zwischen 0,7 und 0,75 m³ (bezogen auf Normbedingungen). Nähere Angaben zu den Parametern während der Probenahmen sind **Tabelle 1** zu entnehmen.

Alle für die Probenahme eingesetzten Glasgeräte wurden gemäß der in der Richtlinie VDI 4254 Blatt 2 (Entwurf) beschriebenen Vorgehensweise in mehreren Arbeitsschritten vorbereitet und gereinigt [5]. Als Sammelflüssigkeit diente eine endotoxinfreie, gepufferte Kochsalzlösung (Saline TMS-012-A, Fa. Merck). Jeder Impinger wurde unter aseptischen Bedingungen mit 30 ml Sammelflüssigkeit befüllt. Zur Entfernung von Ablagerungen wurden nach jeder Probenahme Sonde und Einlassrohr des Impingers mit jeweils 20 ml endotoxinfreier physiologischer Kochsalzlösung (Aqua B. Braun Spüllösung) gespült (vier Spülvorgänge mit je 5 ml) und diese Suspension der jeweiligen Probe zugegeben. Alle Proben wurden zunächst bei 4 °C gelagert und arbeitstäglich zum Mikrobiologischen Labor Dr. Lohmeyer transportiert, in dem die weitere Aufteilung der zu untersuchenden Proben erfolgte.

2.4 Weiterverarbeitung der Proben

Nach Ermittlung der Menge der Sammelflüssigkeit in jedem Impinger wurde zunächst jede Probe im Verhältnis 1:10 mit endotoxinfreiem Wasser verdünnt. Dieser Schritt war vorab festgelegt worden, um Matrixeinflüsse bei der anschließenden Analytik zu verringern. Für jedes Labor und jedes Verfahren wurden von jeder Probe zwei Röhrchen (davon eine Rückstellprobe) mit jeweils 2 ml bereitgestellt. Damit die Analysen unter vergleichbaren Bedingungen erfolgen konnten, wurde vereinbart, alle Proben bei mindestens -20 °C einzufrieren. Die Proben wurden in gefrorenem Zustand zum LANUV gebracht und dort bis zum Versand an die Laboratorien tiefgekühlt gelagert. Anschließend wurden

sie, ebenfalls gefroren, nach Absprache zu den einzelnen Laboren transportiert. Erst an dem Tag, an dem die Analysen durchgeführt werden sollten, wurden die Proben aufgetaut und bearbeitet. Ein Wiedereinfrieren der Proben war nicht erlaubt. Sofern Nachuntersuchungen erforderlich waren, standen die Rückstellproben für die Messung zur Verfügung.

2.5 Eingesetzte Testkits und Durchführung der Tests

In der Vergleichsuntersuchung wurden von den teilnehmenden Laboren folgende Testkits eingesetzt:

Chromogen-kinetische LAL-Tests:

- Endochrome-KTM, Charles River Laboratories International, Inc (Test 1),
- Pyrochrome[®], Associates of Cape Cod Europe (Test 2),

rFC-Tests:

- Haemotox[®] rFC, Haemochrom Diagnostica (Test 1),
- PyroGeneTM, Lonza Walkersville, Inc. (Test 2),
- EndoZyme[®] II, Hyglos - a bioMérieux company (Test 3).

Der Endotoxinstandard wurde gemäß Herstellerangaben in endotoxinfreiem Wasser gelöst. Für die Kalibrierung wurden in einer Verdünnungsreihe fünf Konzentrationen von 0,005 bis 50 EU/ml angesetzt. Alle Proben wurden mindestens in Doppelbestimmung gemessen. Zur Qualitätssicherung wurde jede Probe zusätzlich in Doppelbestimmung mit Endotoxinstandard aufgestockt (Spike oder positive Produktkontrolle). Die Messung erfolgte grundsätzlich nach Herstellervorgaben. Um eine einheitliche Behandlung der Proben zu gewährleisten, wurde zusätzlich festgelegt, die Proben vor jedem Verdünnungsschritt 30 s mit einem Vortexer zu durchmischen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Nach Eingang der Ergebnisse wurden die Datensätze durch das LANUV zunächst auf Gültigkeit überprüft. Als Kriterium für einen gültigen Analysenwert wurde die Wiederfindung der Spikes in den definierten Grenzen angesetzt. Ein Spike ist eine definierte Menge an Endotoxinstandard, die als Qualitätssicherung jeder Probe zusätzlich zugegeben werden muss. Gemäß Testherstellereingaben gilt sowohl für den LAL- als auch für den rFC-Test, dass die Wiederfindung mindestens 50 und maximal 200 % des Sollwertes der Aufstockung betragen muss. Messwerte, die dieses Kriterium nicht einhielten, wurden aussortiert. Zusätzlich wurde gemäß der Richtlinie VDI 4219 [15] festgelegt, dass zur Bestimmung der Messunsicherheit für eine Methode mindestens 20 gültige Doppelbestimmungen vorliegen müssen.

Alle Feldblindwerte lagen unterhalb der Nachweisgrenzen der Analysenverfahren oder wiesen sehr geringe Werte auf. Das be-

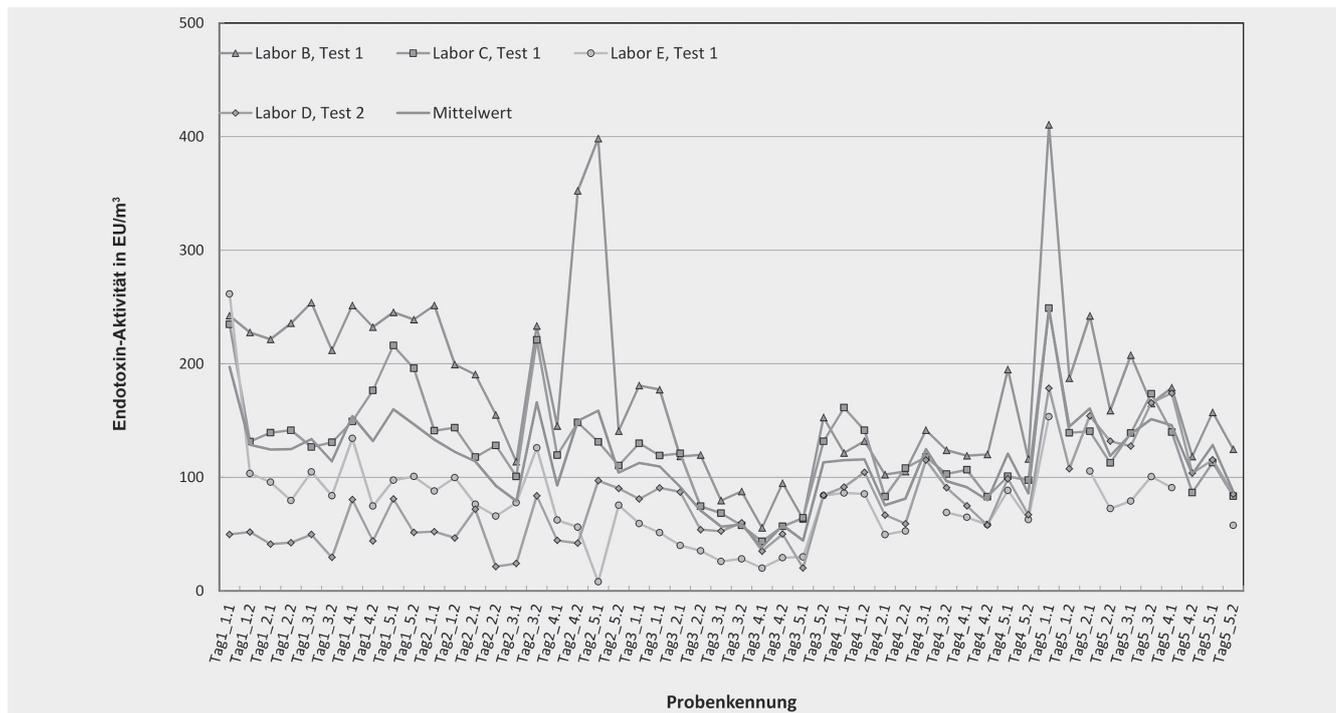


Bild 1. Ergebnisse der Analysen mit den chromogen-kinetischen LAL-Tests. *Quelle: Autoren*

deutet, dass die Vorbereitung der Probenahmegeräte sachgemäß durchgeführt wurde und im Versuchsverlauf keine Kontamination der Proben aufgetreten ist.

Bild 1 zeigt die gültigen Ergebnisse der Analysen aller Einzelproben, gemessen mit den chromogen-kinetischen LAL-Tests, sowie die Mittelwerte aus den entsprechenden Daten. Drei Labore haben Test 1 eingesetzt, ein Labor Test 2. Gut erkennbar ist, dass die während des Mastverlaufs auftretenden Änderungen der Emissionsaktivitäten in EU/m³ von allen vier Laboren im Wesentlichen erkannt wurden. An den beiden ersten Messtagen wiesen die Analysenwerte größere Unterschiede auf, im weiteren Verlauf der Messung zeigten die Daten der Labore eine bessere Übereinstimmung.

Vergleicht man die Mittelwerte aller Proben, die von einem Labor untersucht wurden, ergibt sich eine Spannweite der Konzentrationen zwischen 76 und 231 EU/m³, wobei auch dann größere Abweichungen auftraten, wenn der Test desselben Herstellers verwendet wurde.

In **Bild 2** sind die Ergebnisse der Analysen mit den rFC-Tests sowie die Mittelwerte aus den entsprechenden Daten dargestellt. Wie bereits bei den Daten des LAL-Tests festgestellt, zeigten auch hier die Werte an den ersten beiden Probenahmetagen eine schlechtere Übereinstimmung als an den Folgetagen. Bezogen auf die Mittelwerte unterschieden sich die Messwerte der Labore um den Faktor 1,3. Auffällig ist, dass die mit den rFC-Tests erhaltenen Endotoxinwerte systematisch um circa das Dreifache höher sind als die Werte, die mit den chromogen-kinetischen LAL-Tests erhalten wurden.

Betrachtet man die relativen Standardabweichungen der Doppelbestimmungen (parallel genommene Emissionsproben) nach der Richtlinie VDI 4219, so ergaben sich für die einzelnen Labore bei den LAL-Tests relative Standardabweichungen zwischen 26 und 42 %. Bei den rFC-Tests lagen die Werte auf einem etwas

geringeren Niveau zwischen 19 und 29 %. Die Unterschiede der statistischen Kenndaten zwischen den beiden Testverfahren lassen darauf schließen, dass der rFC-Test eine geringere Störanfälligkeit aufweist als der LAL-Test. Die Unterschiede innerhalb des jeweiligen Verfahrens deuten darauf hin, dass es bei der praktischen Durchführung in den Laboren Unterschiede gibt.

Die Standardabweichung für den LAL-Test, ermittelt aus einem Datensatz von 96 Doppelbestimmungen, die unter Beteiligung von vier Laboren mit zwei verschiedenen Tests durchgeführt wurden, betrug 42 EU/m³ bzw. 36 %. Die Standardabweichung bezogen auf einen Datensatz von insgesamt 118 Doppelbestimmungen, die mit rFC-Tests dreier Hersteller von vier Laboren durchgeführt wurden, war mit 26 % niedriger. Damit kann die erweiterte relative Messunsicherheit für einen Einzelwert und ein Vertrauensniveau von 95 % mit 52 % angegeben werden. Dies gilt zunächst für den untersuchten Konzentrationsbereich der Endotoxine an Hähnchenmastanlagen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die erweiterte Messunsicherheit auch für höhere Konzentrationsbereiche gilt, sofern keine weiteren Verdünnungsschritte bei der Analyse der Proben erforderlich sind.

Die Vergleichsuntersuchung hat gezeigt, dass sowohl der LAL- als auch der rFC-Test grundsätzlich für eine Bestimmung der Endotoxin-Aktivitäten in Emissionsproben aus Hähnchenmastanlagen eingesetzt werden können. Beide Testverfahren lieferten allerdings Ergebnisse in unterschiedlicher Höhe, sodass Daten der beiden Verfahren nicht innerhalb einer Auswertung betrachtet werden sollten. Untersuchungen an Proben aus dem Bereich des Arbeitsschutzes haben gezeigt, dass eine signifikante Korrelation zwischen Ergebnissen aus rFC- und LAL-Test besteht. Die Korrelation wird aber auch von der Höhe der gemessenen Endotoxinaktivität beeinflusst. Am Beispiel von 124 Staubfilterproben zeigte sich, dass unterhalb von 3,4 EU/ml eine geringere Korrelation

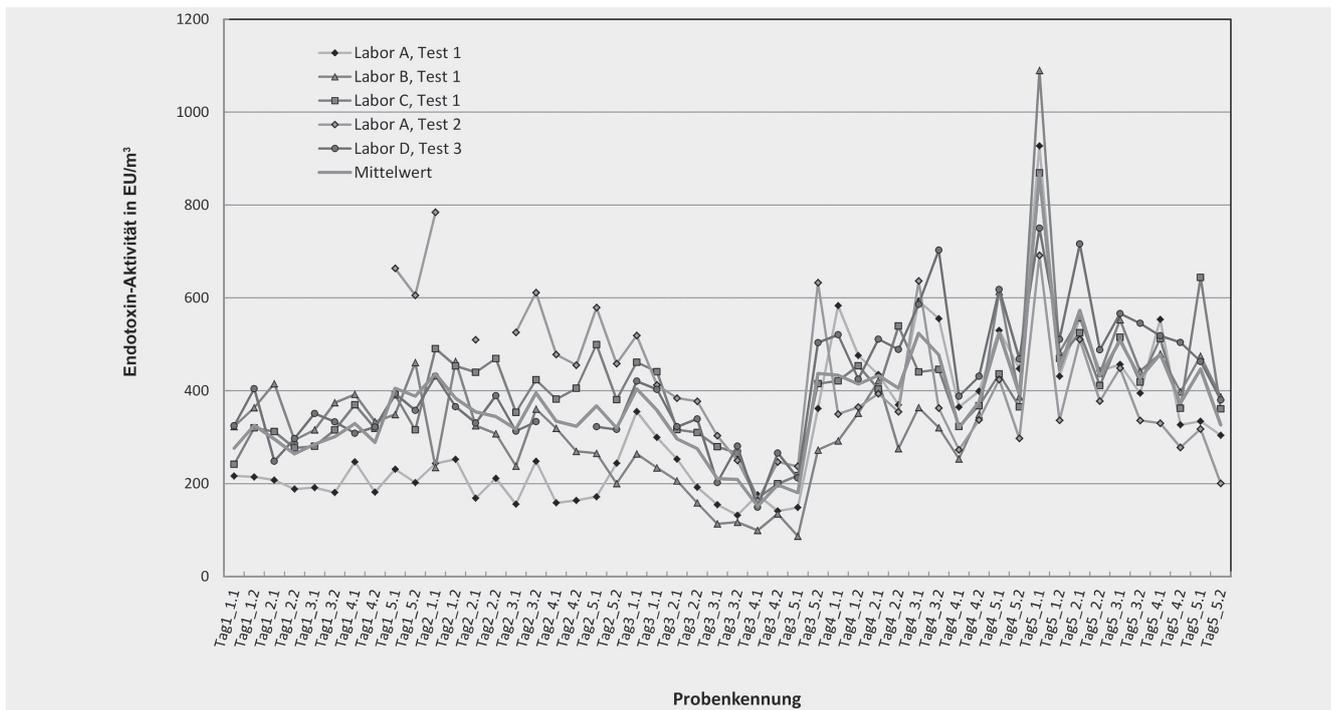


Bild 2. Ergebnisse der Analysen mit den rFC-Tests. Quelle: Autoren

Tabelle 2. Statistische Kenndaten der Ergebnisse der einzelnen Labore für beide Testverfahren.

Statistische Kenndaten	Labor A	Labor B	Labor C	Labor D	Labor E
Analysenmethode	LAL-Test				
Test-Kit		Endochrome-K _{TM}	Endochrome-K _{TM}	Pyrochrome®	Endochrome-K _{TM}
Median aller Proben in EU/m ³		162	127	73	76
Standardabweichung (Doppelbestimmung) in EU/m ³		65	33	24	32
Relative Standardabweichung (Doppelbestimmung) in %		36	26	31	42
	Labor A	Labor A	Labor B	Labor C	Labor D
Analysenmethode	rFC-Test				
Test-Kit	Haemotox® rFC	PyroGene™	Haemotox® rFC	Haemotox® rFC	EndoZyme II®
Median aller Proben in EU/m ³	250	381	329	397	391
Standardabweichung (Doppelbestimmung) in EU/m ³	91	109	114	88	76
Relative Standardabweichung (Doppelbestimmung) in %	29	26	33	22	19

zwischen den Testverfahren bestand und der rFC-Test vergleichsweise höhere Messwerte lieferte als der LAL-Test [18; 19].

Aufgrund der niedrigeren Messunsicherheit und der Unempfindlichkeit des Messverfahrens gegenüber β-Glucanen hat sich die KRDL-Arbeitsgruppe darauf verständigt, in der Richtlinie VDI 4254 Blatt 2 zur Ermittlung der Endotoxinemissionen ausschließlich den rFC-Test zu beschreiben und zu standardisieren. Dies ist ein wichtiger Schritt, um den jahrzehntlang eingesetzten LAL-Test auch im Umweltbereich abzulösen.

4 Fazit

Die Probenahme von Endotoxinen in Emissionen einer Hähnchenmastanlage wurde in Anlehnung an die Vorgehensweise zur Probenahme von Bakterien und Schimmelpilzen mit dem Impingementverfahren (Richtlinie VDI 4257 Blatt 2) durch Abscheidung und Anreicherung der Bioaerosole in einer Sammelflüssigkeit durchgeführt. Alle Proben konnten ohne Probleme routine-

Tabelle 3. Statistische Kenndaten der Analysenverfahren im Vergleich.

Statistik	LAL-Test	rFC-Test
Anzahl gültiger Datensätze von Teilnehmern	4	5
Anzahl gültiger DB (Summe aller Labore)	96	119
Standardabweichung (Doppelbestimmung) [EU/m ³]	42	97
Relative Standardabweichung (Doppelbestimmung) [%]	36	26
Erweiterte Messunsicherheit U _{0,95} (y) [EU/m ³]	84	193
Erweiterte Messunsicherheit U _{0,95} (y) [%]	72	52

mäßig gewonnen werden. Niedrige bzw. unterhalb der Nachweisgrenze liegende Blindwerte bestätigten, dass die Beprobung der Endotoxine mit diesem Verfahren im Feldeinsatz gut praktikabel ist und eine Kontamination der Proben vermieden werden kann. Die weiteren Arbeitsschritte der Aufbereitung, Aliquotierung, Lagerung und Bearbeitung der Proben wurden von der KRdL-Arbeitsgruppe im Vorfeld der Vergleichsuntersuchung dezidiert festgelegt, um im Hinblick auf die Analysen in den Laboren ein möglichst einheitliches Vorgehen zu gewährleisten. Dies war erforderlich, da die Labore einzelne Arbeitsschritte im Routinebetrieb unterschiedlich handhaben. Die Diskussion während der Abstimmung der Versuchsplanung bestätigte ein weiteres Mal, welche große Bedeutung einer möglichst weitgehenden Harmonisierung und Standardisierung von Mess- und Analyseverfahren bei der Bestimmung von Endotoxinaktivitäten zukommt.

Mit dem Entwurf der Richtlinie VDI 4254 Blatt 2 wird nunmehr ein vollständiges Messverfahren vorgestellt, um die Endotoxinemissionen aus Anlagen quantifizieren und bewerten zu können. Vorteile einer ausschließlichen Verwendung des rFC-Tests als Analyseverfahren ergeben sich aus einer besseren Vergleichbarkeit der Emissionswerte sowie der Schonung der Pfeilschwanzkrebse.

DANKSAGUNG

Wir danken *A. Langner, Ch. Berus, T. Benning* und *Ch. Buchner* vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW) herzlich für die Durchführung der Probenahmen. Für die Realisierung der Endotoxinanalysen danken wir *N. Heubach* und *N. Hüttig*, beide von der Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) in Berlin, *S. Nischwitz* vom bifa Umweltinstitut, *M. Düser* vom Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA) und *Y. Otte* vom Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA).

Literatur

- [1] VDI 4257 Blatt 2: Bioaerosole und biologische Agenzien – Emissionsmessungen; Probenahme von Bioaerosolen und Abscheidung in Flüssigkeiten (9/2011). Berlin: Beuth 2011.
- [2] VDI 4253 Blatt 2: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft – Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilz-Konzentrationen in der Luft – Indirektes Verfahren nach Probenahme auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern (6/2004). Berlin: Beuth 2004.
- [3] VDI 4253 Blatt 3: Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft – Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft – Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten (5/2019). Berlin: Beuth 2019.

- [4] VDI 4253 Blatt 4: Bioaerosole und biologische Agenzien – Bestimmung der Gesamtzellzahl mittels Fluoreszenzanalyse nach Anfärbung mit DAPI (2/2013). Berlin: Beuth 2013.
- [5] VDI 4254 Blatt 2 (Entwurf): Bioaerosole und biologische Agenzien – Emissionsmessung von Endotoxinen (4/2020). Berlin: Beuth 2020.
- [6] *Kolk, A.; van Gelder, R.; Schneider, G.; Gabriel, S.*: Mikrobiologische Hintergrundwerte in der Außenluft – Auswertung der BGIA-Expositionsdatenbank MEGA. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 69 (2009) Nr. 4, S. 130-136.
- [7] *Lohberger, M.*: Hintergrundkonzentrationen für Bioaerosole. Schriftenreihe des LfULG (2016) Nr. 4. <https://publikationen.sachsen.de/bdb/artikel/25866>
- [8] *Lippmann, J.; Mietke-Hofmann, H.; Deichmann, J.*: Bioaerosole aus Anlagen der Geflügelhaltung. Schriftenreihe des LfULG (2016) Nr. 13.
- [9] Intensivierhaltung: Umweltrelevante Emissionen und Immissionen (Feinstaub, PM₁₀, PM_{2,5}, NH₃, N₂O, CH₄, NMVOC, Keime, Pilze, Endotoxine), Endbericht 2011. Hrsg.: Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg 2011.
- [10] *Liebers, V.; Raulf-Heimsoth, M.; Brüning, T.*: Health effects due to endotoxin inhalation (re-view). Arch. Toxicol. 82 (2008) Nr. 4, S. 203-210.
- [11] Erste Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundes-Immissionsschutzgesetz (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft – TA Luft) vom 24. Juli 2002.
- [12] VDI 4250 Blatt 3: Bioaerosole und biologische Agenzien – Anlagenbezogene, umweltmedizinisch relevante Messparameter und Beurteilungswerte (8/2016). Berlin: Beuth 2016.
- [13] *Linsel, G.; Kolk, A.*: Verfahren zur Bestimmung der Endotoxinkonzentration in der Luft am Arbeitsplatz (Kennzahl 9450). In: IFA-Arbeitsmappe Messung von Gefahrstoffen. 28. Lfg. IV/02. Hrsg.: Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung e. V. (DGUV), Berlin. Berlin: Erich Schmidt 1989 – Losebl.-Ausg. www.ifa-arbeitsmappedital.de/9450.
- [14] Europäisches Arzneibuch 8. Ausgabe, 8. Nachtrag, amtliche deutsche Ausgabe (Ph.Eur. 8.8). Deutscher Apotheker Verlag 2016.
- [15] VDI 4219: Ermittlung der Unsicherheit von Emissionsmessungen mit diskontinuierlichen Messverfahren (8/2009). Berlin: Beuth 2009.
- [16] *Gärtner, A.; Gessner, A.*: Ermittlung der Gesamtstaub-Emissionen und der Feinstaubanteile aus Hähnchenmastanlagen. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 71 (2011) Nr. 9, S. 357-361.
- [17] *Gärtner, A.; Gessner, A.; Martin, E.; Jäckel, U.*: Emissionsmessungen von Mikroorganismen aus Hähnchenmastanlagen – Aktuelle Messergebnisse und vergleichende Untersuchungen von drei verschiedenen Ställen. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 71 (2011) Nr. 9, S. 362-366.
- [18] *Liebers, V.; Düser, M.; Kendzia, B.; Brüning, T.; Raulf, M.*: Quantifizierung von Endotoxin mit dem rekombinanten Faktor-V(rFC)-Test – Vergleich mit dem LAL-Test. Gefahrstoffe – Reinhalt. Luft 79 (2019) Nr. 9, S. 337-341.
- [19] *Liebers, V.; Gärtner, A.; Düser, M.; Kendzia, B.; Brüning, T.; Raulf, M.*: Quantification of endotoxin activity with recombinant Factor C assay – method for avoiding animal experiments. Posterbeitrag auf "VDI/BAuA Expert Forum Bioaerosols: From measurement to assessment", Berlin 2019.

Dr. Andrea Gärtner,
B. Eng. Sandra Knust,
Dipl.-Chem. Sarah Peters,
 Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) NRW, Essen.

Dr. Klaus Hoppenheidt,
 bifa Umweltinstitut, Augsburg.

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

Dr. Michael Lohmeyer,
 Mikrobiologisches Labor Dr. Michael Lohmeyer, Münster.

Dr. Verena Liebers,
 Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung Institut der Ruhr-Universität Bochum (IPA), Bochum.

Dr. Gunter Linsel,
 Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA), Berlin.