# Entwicklung einer Methodik zur quantitativen Textilfaserbestimmung in der Trachealflüssigkeit obduzierter Verstorbener

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sonja Dragan-Sassler

Betreuer: PD Dr. med. Marko Weber

Gutachter: Prof. Rüdiger Lessig, Halle (Saale) Prof. Reinhard Dettmeyer, Giessen

Datum der Verteidigung: 21.05.2025

# Referat

Beim Ersticken unter weicher Bedeckung handelt es sich um ein spurenarmes Tötungsdelikt, bei welchem die Atemöffnungen meist mit textilen Gegenständen verschlossen werden. Textilfasern werden beim Erstickungsvorgang eingeatmet und wurden in Tracheallavageflüssigkeit qualitativ nachgewiesen. Das Ziel dieser Studie ist die Entwicklung einer Methodik zur quantitativen Erfassung von Textilfasern in der Trachealflüssigkeit. Die in der Literatur beschriebene Methodik der Zentrifugation wurde getestet und als nicht anwendbar befunden, da Fasern in allen Sedimentationsphasen gefunden wurden. Nachfolgend wurde eine auf Filtration basierende Analysemethode entwickelt, validiert und beurteilt. Die Probengewinnung erfolgte mittels Tracheallavage und Absaugen via Intubation von obduzierten Verstorbenen am Institut für Rechtsmedizin. Bei der Filtration erfüllte der Nylonnetzfilter (NNF) die an einen Filter gestellten Kriterien. Das Zusetzen der Filterporen konnte durch die Reihenschaltung von vier NNF mit den Porengrößen 100µm, 41µm, 11µm, und 5µm sowie der Probenvorbehandlung mit Ultraschallbad und Vortex verhindert werden. Die Matrixbelastung konnte durch die Filtration mit 150ml 5mol/l Ameisensäure und die kleinen, nicht eindeutig als Fasern identifizierbaren Partikel durch Begrenzung der Filterporen auf 5µm reduziert werden. Zur Faserdarstellung wurde die Filtereinbettung zwischen Objektträger und Hämatozytenglas mittels Glycerin in ertesteter Menge, die Anwendung von Druckluft sowie die Mikroskopie und Einbettung von Dichtungsgummi, oberer Lochplatte (beidseitiges Abklatschen auf doppelseitigem Klebeband) und oberer Filterhalterhälfte am besten bewertet. Die Auswertung erfolgte mittels digitalem Mikroskop. Hier eignete sich eine Kombination aus Auflicht- und Dunkelfeldmikroskopie, koaxialem Licht mit Polarisationsfilter sowie seitlichem Licht und Ringlicht am besten. Lösungen für das Problem der Probenkontamination und ein zweiphasiger Spülprozess der Filterhalter wurden erarbeitet. Die Faserbelastung der Studienumgebung wurde mit aktiven Luftproben via Vakuumpumpe und passiven Abklatschproben der Flächen gemessen. Blindproben wurden zur Messung der Fremdfaserkontamination erstellt. Die Validierung der Methode zeigt, dass mit einer Gesamtwiederfindungsrate von 89,44%, für die Konzentrationen von 50, 70 und 90 Fasern/Probe, die Methodik geeignet ist, um gefärbte Fasern zu detektieren. Dabei liegt das 95%-Konfidenzintervall der Präzision zwischen 87,23% und 96,89%. Für weiße Fasern kann die Methodik nicht validiert werden, da die Werte hohen Schwankungen unterlagen und diese nicht von Fremdfaserkontaminationen unterscheidbar sowie ubiquitär vorhanden waren. Allerdings sind noch weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis des Fasertransfers beim Ersticken unter weicher Bedeckung notwendig. Ob sich das Ersticken unter weicher Bedeckung allein quantitativ bestimmen lässt, oder ob eine Kombination aus quantitativen und qualitativen Untersuchungen zielführend ist, muss im Rahmen künftiger Forschung untersucht werden.

Dragan-Sassler, Sonja: Entwicklung einer Methodik zur quantitativen Textilfaserbestimmung in der Trachealflüssigkeit obduzierter Verstorbener. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., 84 Seiten, 2024

# Inhaltsverzeichnis

### Inhaltsverzeichnis

Verzei	chnis der Abkürzungen und Symbole
1	Einleitung 1
1.1	Ersticken unter weicher Bedeckung 1
1.2	Trachealsekret
1.3	Textilfasern
2	Zielstellung
3	Material und Methodik
3.1	Studienbeschreibung und Studienpopulation
3.2	Probengewinnung und Probenaufbewahrung
3.3	Probenvorbereitung und Faserdarstellung
3.3.1	Zentrifugation und Filtration
3.3.2	Einbettung und Materialreinigung
3.4	Maßnahmen zur Vorbeugung von Faserkontamination
3.4.1	Blindproben
3.4.2	Environmental Monitoring
3.5	Methodenvalidierung und Statistik
3.5.1	Blanks und Negativproben
3.5.2	Wiederfindungsrate und Präzision
4	Ergebnisse
4.1	Probenvorbereitung: Zentrifugation und Filtration
4.1.1	Filtertypen
4.1.2	Matrixbelastung
4.2	Faserdarstellung
4.2.1	Einbettung
4.2.2	Mikroskopie
4.3	Materialreinigung
4.4	Faserkontamination
4.4.1	Blindproben
4.4.2	Environmental Monitoring
4.5	Validierung
4.5.1	Blanks
4.5.2	Negativproben
4.5.3	Wiederfindungsrate

4.5.4	Präzision
5	Diskussion
5.1	Probengewinnung
5.2	Probenvorbereitung
5.2.1	Zentrifugation
5.2.2	Filtrierung 50
5.3	Faserdarstellung 54
5.3.1	Einbettung
5.3.2	Mikroskopie 56
5.4	Faserkontamination
5.4.1	Spülprozess und Blindproben
5.4.2	Environmental Monitoring
5.5	Validierung
5.6	Weiße Fasern
5.7	Forensische Aspekte
5.7.1	Faserhäufigkeit
5.7.2	Fasertransfer und Faserpersistenz 71
6	Zusammenfassung
7	Literaturverzeichnis
8	Thesen

# Anhang

Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung

Danksagung

# Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ACC	Acetylcystein
AS	Ameisensäure
В	Blanks (Blindprobe aus Sektionssaal im Rahmen der Validierung)
BA	Blank alt
BN	Blanks neu
Ch1	Laborraum mit Abzug
Ch2	Laborraum mit Mikroskop
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CMF	Cellulosic Manufactured
dest. Wasser	destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	Deckplättchen
Engl.	Englisch(en)
HDR	High Dynamic Range
HG	Hämatozytenglas
KB	Klebeband
LB	Blindprobe aus Laborräumen
MLU	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
NA	Negativprobe alt
NN	Negativprobe neu
NP	Negativprobe
NNF	Nylonnetzfilter
Р	Probe
p.a.	pro analysi (Reinheitsbezeichnung für Chemikalien)
PTCE	Polycarbonate Track Etched (PTCE) Membrane
RSD	Relative Standardabweichung
S	Sektionssaal
SB	Blindproben aus dem Sektionssaal
SD	Standardabweichung
SIDS	Sudden Infant Death Syndrome
TP	Tracheallavageprobe
US-Bad	Ultraschall-Bad
WDF	Wiederfindung oder Wiederfindungsrate (in %)
v/v	Voluemnprozent
~	ungefähr

# 1 Einleitung

Schyma und Madea (2011) berichten von einem Fall, in dem eine 72 Jahre alte Frau tot in ihrem Wohnzimmer aufgefunden wurde. In der Autopsie zeigten sich Folgen einer Thoraxkompression und Petechien an den Augenlidern, den Konjunktiven, im Gesicht und dem Nacken. Vertrocknungen an Stirn, Wangen und Nasolabialfalten sowie oberflächliche Einrisse an den Lippen ließen in Zusammenschau mit einem am Tatort gefundenen grünen Kissen den Verdacht zu, dass dem Opfer das grüne Kissen auf das Gesicht gedrückt worden war. Auf Grund dieser Annahme wurde eine Tracheallavage durchgeführt und das durch Zentrifugation gewonnene Sediment auf Objektträgern ausgestrichen und getrocknet. Bei der mikroskopischen Auswertung zeigten sich blaue, grüne und cyanfarbene Fasern in dem Sediment, diese waren höchstwahrscheinlich beim Ersticken eingeatmet worden. Später gestand der Täter, dem Opfer bei zeitgleichem Burking Mund und Nase mit dem grünen Kissen bedeckt zu haben. Mit Burking wird eine Tötungsform bezeichnet, bei welcher der auf dem Brustkorb sitzende Täter den Thorax komprimiert und alle Atemöffnungen zuhält (Dettmeyer et al., 2014).

Der Verschluss der Atemwege durch z.B. ein Kissen wird als Ersticken unter weicher Bedeckung bezeichnet und als besonders spurenarm und daher als schwer detektierbar beschrieben (Prokop, 1960, Hicks et al., 1990, Banaschak et al., 2003, Bohnert et al., 2005, Wirth et al., 2007, Schmeling et al., 2009, Dettmeyer, 2011, Jang et al., 2013, Herrmann et al., 2016). Dadurch zählt es zu den rechtsmedizinischen Ausschlussdiagnosen, was dazu führt, dass man oft von den Geständnissen der Täter abhängig ist (Keil und Berzlanovich, 2010).

Ein Weg, um das Ersticken unter weicher Bedeckung zuverlässig und möglichst unabhängig von anderen Befunden nachzuweisen, ist die Untersuchung der Faseraspiration. Dabei wird davon ausgegangen, dass Fasern in der Trachea im Sinne einer Faseraspiration beweisen, dass das Opfer während des Tathergangs gelebt hat (Dettmeyer, 2011, Schyma und Madea, 2011), was als Vitalzeichen gewertet wird. Dabei stellt sich die Frage, ob schon allein von der aspirierten Faseranzahl her auf ein Ersticken geschlossen werden kann, also unabhängig von der Faserfarbe oder einem vor Ort gefundenen Tatwerkzeug, z.B. einem Kissen. Dafür muss die aspirierte Faserzahl methodisch präzise und verlässlich festgestellt werden können.

Im Fokus dieser Studie steht die Entwicklung und Validierung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Textilfasern in der Trachealflüssigkeit. Im Folgenden werden Hintergründe und forensische Aspekte des Erstickens, der Trachealflüssigkeit und von Fasern erläutert.

# 1.1 Ersticken unter weicher Bedeckung

Das Ersticken "[…] umfasst alle tödlichen Formen der Störung des Gasaustausches" (Dettmeyer et al., 2014) und wird in äußeres und inneres Ersticken unterteilt. Unter äußerem Ersticken werden mechanische Ursachen, etwa eine gestörte Thoraxexkursion oder der Verschluss der Atemwege, und eine zu geringe Sauerstoffkonzentration in der Atemluft oder Atmosphäre gefasst.

Beim inneren Ersticken ist hingegen die Sauerstoffbindung oder –abgabe des Hämoglobins gestört. Die häufigste Form des äußeren Erstickens ist der mechanische Verschluss der Atemwege oder Atemöffnungen (Dettmeyer et al., 2014). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Atemöffnungen zu verschließen (sog. oronasale Okklusionen). Dazu gehören z.B. das Zuhalten mit den Händen oder weichen Gegenständen, die Knebelung, das Zukleben und Zubinden, das Zusammenquetschen, das Andrücken des Gesichts an den Körper des Täters sowie das Auflegen des Gesichts schwacher oder bewegungsunfähiger Menschen auf eine weiche Unterlage, wobei auch Mischformen möglich sind (Keil und Berzlanovich, 2010, Madea, 2014). Eine Sonderform der oronasalen Okklusion ist das Ersticken unter weicher Bedeckung. Hierbei werden die Atemwege mit weichen Gegenständen verschlossen, meist unter Verwendung textiler Materialien. Am häufigsten kommen Decken, Kissen und Tücher zum Einsatz (Keil und Berzlanovich, 2010). Mögliche Befunde beim Ersticken unter weicher Bedeckung werden von Keil und Berzlanovich (2010) wie folgt beschrieben:

*Äußere Befunde*: Sofern überhaupt vorhanden, besitzen sie meist eine geringe Ausprägung. Beispiele sind Abschürfungen, Rötungen, Blutergüsse, Schleim- oder Schaumbildung an den Atemöffnungen und Gesichtszyanose. Auch in dem von Schyma und Madea (2011) beschriebenen Fall wurden Hämatome an den Armen, Vertrocknungen im Gesicht und Einrisse an den Lippen gefunden. *Petechien*: Beim Ersticken unter weicher Bedeckung sind meistens keine Petechien zu finden, da in der Regel keine Blutstauung auftritt. Eine Ausnahme stellt die zusätzliche Kompression von Hals oder Thorax z.B. durch Burking dar, wie in dem eingangs beschriebenen Fall.

*Innere Befunde*: Beispiele sind ein akutes Lungenemphysem, Schleim- oder Schaumbildung in den Atemwegen, Blutstauung der Organe (außer Milz) und flüssiges Leichenblut (s. auch Schmeling et al., 2009).

*Histologische Befunde*: Z.B. eine Blutstauung der Lunge, ein akutes Lungenemphysem, das Haemorrhagic-dysoric syndrome (alveolär-interstitielles Ödem und intraalveoläre Blutungen) und das Mikroemboliesyndrom (s. auch Brinkmann et al., 1984). Das zeitgleiche Auftreten von Emphysem, Mikroemboliesyndrom, Haemorrhagic-dysoric syndrome und ein frühes alveolärseptales Ödem wurde von Brinkmann et al. (1984) und Schmeling et al. (2009) als pathognomonisch für die obstruktive Asphyxie beschrieben.

Die Opfer sind dem Täter meist physisch unterlegen, dies gilt insbesondere für Säuglinge und Kleinkinder (Keil und Berzlanovich, 2010, Madea, 2014), die sich aufgrund noch nicht entwickelter motorischer Fähigkeiten und geringer Kraft nicht wehren können (Banaschak et al., 2003, Dettmeyer et al., 2014). Es betrifft aber auch Erwachsene, die infolge einer Intoxikation z.B. durch Alkohol (Wirth et al., 2007), akuter Krankheit z.B. einem epileptischen Anfall (Fischer, 1968) oder eines akuten psychotischen Syndroms mit Dehydratation (Jang et al., 2013) vorübergehend handlungsunfähig sind (Keil und Berzlanovich, 2010, Madea, 2014). In seltenen Fällen tritt das Ersticken durch weiche Bedeckung auch unfallbedingt auf (Schmeling et al., 2009).

Kriminalpolizeiliche Hinweise auf ein Ersticken unter weicher Bedeckung sind u.a. weiche Gegenstände im Umfeld des Opfers, evtl. mit Speichel- oder Blutspuren, Fasern im Gesicht des Opfers (Schyma und Madea, 2011) und Kampfspuren (Keil und Berzlanovich, 2010). Differentialdiagnostisch müssen auch andere Krankheiten ohne morphologisch feststellbare Veränderungen in Betracht gezogen werden, etwa epileptische Anfälle, der Status Asthmaticus oder Herzrhythmusstörungen (Keil und Berzlanovich, 2010). Bei Säuglingen und Kleinkindern ist Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) eine wichtige Differentialdiagnose (Bohnert et al., 2005, Keil und Berzlanovich, 2010). Es wird geschätzt, dass bis zu 10% der SIDS -Fälle bei Kindern in Wahrheit nicht erkannte Erstickungsfälle sein könnten (Emery und Emery, 1985, Keil und Berzlanovich, 2010). Auch im Rahmen des Münchhausen-Syndrom-by-Proxy, das in 6-33% der Fälle letal endet, kann es vor allem im Säuglingsalter zum Ersticken unter weicher Bedeckung kommen, wodurch es oft fälschlicherweise als SIDS gewertet wird (Herrmann et al., 2016).

#### 1.2 Trachealsekret

Trachealsekret wird mittels Bronchiallavage gewonnen, einer Spülung der Luftröhre und Bronchien mit Ringer- oder isotoner Kochsalzlösung (Gillissen, 2020). Diese findet bei Lebenden im Rahmen einer Bronchoskopie statt. Die so gewonnene Flüssigkeit enthält neben der Spülflüssigkeit auch Bronchialsekret, das zusammen mit den Zilien der Bronchialepithelien (Ficker, 2008) zu der mukoziliären Clearance als Teil der Immunabwehr gehört. Das Bronchialsekret wird durch Becherzellen und Drüsen produziert, es besteht aus 95% Wasser sowie aus Salzen, Lipiden und Glykoproteinen (Hüter-Becker und Bacha, 2005) und setzt sich letztlich aus einer wässrigen Sol-Phase und einer viskösen Gel-Phase zusammen (Ficker, 2008). Durch nach oral gerichteten Bewegungen der Zilien wird der Bronchialschleim, in dem sich z.B. Staub und Bakterien befinden, nach oben transportiert und die Lunge gereinigt (Ficker, 2008). Physiologisch werden täglich 150-1500ml Trachealbronchialsekret gebildet (Matthys und Seeger, 2008). Durch chronische Entzündungen kann die Produktion von Bronchialsekret dauerhaft erhöht sein (Ficker, 2008).

Der aus Glycoproteinen bestehende fibrilläre Schleim der Bronchien ist wasserunlöslich und besteht aus Schleimfasern, die eine netzartige Struktur ergeben. Diese Vernetzung nimmt in den oberen Atemwegen zu und führt zu einer Zunahme von Viskosität und Adhäsionskraft. Bei eitrigem Sputum ist die Viskosität nochmals durch Faserbildung der DNS-Molekülen der Zellreste erhöht (Ulmer et al., 1979). Auswurf stellt eine Mischung aus Trachealbronchialsekret mit Nasopharyngealsekret und Mundsekret dar (Matthys und Seeger, 2008). Das Sekret kann je nach Erkrankung unterschiedlich zusammengesetzt sein, z.B. führen Asthmaanfälle zu zähem Sputum (Herold, 2019). Je nach Erkrankung variieren auch die Zellzahl, Zellart (Matthys und Seeger, 2008) und Sputummenge. Letztere kann z.B. bei COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) erhöht sein (Herold, 2019). Das Bronchialsekret kann sich also abhängig von Erkrankungen und Lokalisation im Respirationstrakt in Menge, Zusammensetzung und damit auch Konsistenz unterscheiden. Postmortal sind zusätzlich fäulnisbedingte Veränderungen zu erwarten. Bei Verdacht auf Ersticken unter weicher Bedeckung wird, wie bereits erwähnt, die Durchführung einer Tracheallavage und die anschließende Zentrifugation und Mikroskopie empfohlen, um ergänzend zur Obduktion den Verdacht erhärten oder gar beweisen zu können. Da es sich bei den Tatwerkzeugen meist um textile Materialien handelt, wird in der Literatur angenommen, dass Textilfasern beim Erstickungsvorgang eingeatmet werden und in den Atemwegen nachweisbar sein sollten. Dettmeyer (2011) und Schyma und Madea (2011) konnten mittels Tracheallavage mit destilliertem (dest.) Wasser Textilfasern sichern und nachfolgend untersuchen. Die gefundenen Fasern konnten anschließend durch qualitative Merkmale dem identifizierten Tatwerkzeug zugeordnet werden. Im Vergleich dazu ist der Ansatz unserer Studie die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung von Textilfasern in der Trachealflüssigkeit. Basierend auf der Anzahl eingeatmeter Fasern soll ein Verdacht auf Ersticken unter weicher Bedeckung formuliert werden. So könnte auch unabhängig vom Tatwerkzeug ein Verdacht auf Ersticken geäußert werden.

#### 1.3 Textilfasern

Textilien sind in der heutigen Welt ubiquitär vorhanden. Sie sind nicht nur Teil von Bekleidung oder Alltagsgegenständen, sondern auch technischer Textilien, die z.B. in der Medizin, der Autoindustrie, im Umweltschutz und im Baugewerbe genutzt werden (Umweltbundesamt, 2019). Textilfasern können in synthetische und natürliche Fasern unterteilt werden. Natürliche Fasern sind entweder pflanzlichen Ursprungs, d.h. auf Cellulose-Basis, oder tierischen Ursprungs und somit Proteinfasern (Humphries, 2009). Als Manufactured Fibres oder Man Made Fibres bezeichnet man Fasern, die ursprünglich nicht als solche vorliegen, sondern durch verschiedene Prozesse aus einem Rohmaterial hergestellt werden. Die Rohmaterialien für solche Fasern können entweder natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein. Eine Eigenschaft aller Fasern ist, dass sie im Vergleich zu ihrer Länge sehr dünn sind (Humphries, 2009).

Die Anzahl verschiedener Fasermaterialien ist seit der Entwicklung chemisch modifizierter und moderner synthetischer Chemiefasern stark gestiegen. Nicht nur die Textilproduktion im Gesamten ist in den letzten Jahrzehnten stark gewachsen, auch das Verhältnis verwendeter Materialien hat sich verändert. So wurden im Jahr 1900 3,9 Tonnen Textilfasern produziert, von denen 80% Baumwolle, 19% Wolle und nur 1% Cellulosic Manufactured waren (Humphries, 2009). Dazu im Vergleich wurden im Jahr 2019 weltweit 111 Millionen Tonnen Textilfasern produziert (s. Abb. 1.) Die Textilindustrie umfasst die Herstellung von Garnen, Zwirnen und textilen Flächen sowie die Textilveredlung (Umweltbundesamt, 2019). Bei der Veredelung werden Flächen, z.B. Flocken, Garne, Gewebe oder bereits fertige Kleidungsstücke, häufig gefärbt, wobei es sein kann, dass nicht jede einzelne Faser die Farbe aufnimmt (Bode et al., 2007, Koch und Nehse, 2020).



Abbildung 1: Weltweite Faserproduktion nach Fasermaterialien in %. Nachbildung aus dem Jahresbericht 2020 der NGO Textile Exchange (Opperskalski et al., 2020). Zu den MMCF (Man Made Cellulosic Fibres) zählen z.B. Viscose, Acetate, Lyocell, Modal, Cupro. Zu Andere pflanzliche Faserstoffe werden Jute, Hanf, Leinen u.a. gezählt. Andere synthetische Faserstoffe umfassen z.B. Polypropylen, Acryl und Elastan.

#### **Forensische Aspekte**

Das Locard'sche Prinzip besagt, dass jeder Kontakt eine Spur hinterlässt (Robertson et al., 2017). Daher finden auch Faserübertragungen zwischen Täter und Opfer statt (Pounds und Smalldon, 1975a, Kidd und Robertson, 1982, Grieve et al., 1989, Koch und Nehse, 2020). Die Anzahl der übertragenen Fasern hängt ab von der Kontaktart und -intensität, der Beschaffenheit und Struktur von Spender- und Empfängermaterial und der Persistenz (Pounds und Smalldon, 1975c, Kidd und Robertson, 1982, Grieve et al., 1989, Schnegg et al., 2017, Koch und Nehse, 2020). Eine besondere Rolle spielen die Beschaffenheit des Textils (Faserart und –länge) und die Textilveredelung, Stoffkonstruktion und Abnutzung des Stoffes (Koch und Nehse, 2020, Skokan et al., 2020).

Bei der Faserübertragung unterscheidet man zwischen Primär-, Sekundär- und Tertiärtransfer. Beim Primärtransfer erfolgt die Faserübertragung direkt zwischen Spender und Empfänger, beim Sekundär- und Tertiärtransfer über ein bis mehrere Zwischenobjekte (Grieve et al., 1989). Zu den höhergradigen Transfers zählt auch die Kontamination mit Umgebungsfasern (Pounds und Smalldon, 1975c). Wie Dettmeyer (2011) und Schyma und Madea (2011) zeigen, ist auch die Einatmung in den Respirationstrakt eine Art des Transfers.

Textilstoffe haben eine unterschiedliche Tendenz, Fasern abzugeben. So ist es weniger wahrscheinlich, dass sehr glatte und glänzende Stoffe Fasern in großen Mengen abgeben (Robertson et al., 2017). Das Ablösen von Fasern aus dem Stoff wird engl. als "Shedding" bezeichnet, es ist ein bedeutender Faktor in der Faserübertragung und wurde von zahlreichen Autoren untersucht (Pounds and Smalldon, 1975c, Kidd und Robertson, 1982, Parybyk und Lokan, 1986, Salter et al., 1987, Coxon et al., 1992, De Wael et al., 2010, Schnegg et al., 2017, Skokan et al., 2020). Der Fasertransfer kommt dabei durch Reibung und Faserfragmentierung zustande (Pounds und Smalldon, 1975c, Roux et al., 1996). Auch die Faserübertragung- und -persistenz wurde vielfach untersucht, siehe u.a. Pounds und Smalldon, 1975a,b,c, Kidd und Robertson, 1982, Robertson et al., 1982, Cordiner et al., 1985, Moore et al., 1986, Grieve et al., 1989, Roux et al., 1996, Grieve und Biermann, 1997b, Palmer und Banks, 2005, De Wael, 2008, Palmer und Burch, 2009, Palmer und Polwarth, 2011, Hong et al., 2014, Sheridan et al., 2020, Skokan et al., 2020. Diese Aspekte beeinflussen die Menge an aspirierten Fasern, sodass sie eine besondere kriminaltechnische Rolle beim Ersticken unter weicher Bedeckung spielen.

Da Fasern in unserer Umgebung ubiquitär vorhanden sind, ist davon auszugehen, dass sie auch zu Lebzeiten eingeatmet werden (Pauly et al., 1998). Die Autoren wiesen bei der Untersuchung von 114 Lungenproben in 87% der Fälle nicht mineralische, d.h. pflanzliche und chemische Fasern nach, damit stellten sie die allgemeine Annahme, dass Pflanzen- oder Chemiefasern nicht in der menschlichen Lunge vorhanden sind, in Frage. Sie postulierten, dass die Fasern klein genug sind, um in die Atemwege zu gelangen (Durchmesser und Länge einer Bronchiole: 540 µm bzw. 1410 µm; Länge einer im Lungengewebe gefundenen Faser: 135 µm) und, dass manche dieser Fasern den Clearance-Mechanismen der Lunge (Husten, mukoziliäre Clearance, Phagozytose durch Gewebsmakrophagen, chemische Auflösungsmechanismen) entkommen und als Fremdkörper in der Lunge verbleiben. Pauly et al. (1998) vermuteten zudem, dass vor allem bei Rauchern oder anderen Personen, deren Clearance-Mechanismen beeinträchtigt sind, Fasern vermehrt in der Lunge verbleiben. In den letzten Jahren wurden einige Studien zu den Übertragungswegen und der Erfassung von Mikroplastik (das auch synthetische Fasern beinhaltet) im menschlichen Organismus angefertigt. Gasperi et al. (2018) unterscheiden zwischen inhalierbaren und aspirierbaren Fasern: erstere würden in die oberen Atemwege und letztere in die tieferen Atemwege gelangen, dabei sei die Fasergröße der entscheidende Faktor. Diese spiele auch bei der Persistenz der Fasern eine Rolle, da längere Fasern leichter den Clearance-Mechanismen entwischen können. Es wird geschätzt, dass allgemein täglich 26-130 (Prata, 2018) und bei leichter Aktivität einer männlichen Person 272 Mikroplastikpartikel aus der Luft eingeatmet werden (Vianello et al., 2019). Mikroplastik konnte aus Lungengewebe nachgewiesen werden, das z.B. in Autopsien (Amato-Lourenco et al., 2021), in Operationen (Jenner et al., 2022), aus Sub-/Lobektomien (Chen et al., 2022) gewonnen wurde sowie in Sputum und Nasenspülflüssigkeit (Jun et al., 2021) und Sputumproben (Huang et al., 2022). Baeza-Martínez et al. (2022) untersuchten zudem Flüssigkeit aus bronchoalveaolären Lavagen, die 44 sedierten Personen entnommen wurde, auf Mikroplastik. Dabei konnten sie  $9,18 \pm 2,45$  Mikrofasern/100ml bronchoalveoläre Lavage nachweisen.

# 2 Zielstellung

Beim Ersticken unter weicher Bedeckung handelt es sich um ein spurenarmes Tötungsdelikt, sodass die Faserdetektion ein notwendiger Schritt in der Formulierung und Unterstützung der Erstickungsthese ist. Sie erfolgte bisher durch Probenzentrifugation und qualitativer/vergleichender Faserbetrachtung. Das setzt den bereits bestehenden Verdacht auf ein Ersticken und den anschließenden Vergleich mit dem mutmaßlichen Tatwerkzeug voraus, daher wäre es hilfreich, bereits anhand der Faseranzahl den Verdacht auf ein Ersticken ableiten zu können. Dies erfordert die quantitative Bestimmung der aspirierten Fasern.

Das Ziel dieser Studie ist die Entwicklung einer Methodik zur quantitativen Erfassung von Textilfasern in der Trachealflüssigkeit. Hierfür wurde die in der Literatur beschriebene Methodik der Zentrifugation getestet und dann eine auf Filtration basierende Analysemethode entwickelt, validiert und beurteilt.

## 3 Material und Methodik

#### Ethikvotum

Die ethische und rechtliche Prüfung des Forschungsvorhabens wurde durch die Ethik-Kommission der Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg geprüft, da Körpermaterialien in Form von Trachealflüssigkeit entnommen, sowie persönliche Daten erhoben wurden (§15 Abs.1 Berufsordnung der Ärztekammer Sachsen-Anhalt). Das Votum erfolgte am 12.03.2020 mit der Bearbeitungsnummer 2020-001, die abschließende Beurteilung am 26.07.2021.

#### 3.1 Studienbeschreibung und Studienpopulation

Die Studie ist rein deskriptiv. Es wird eine Methode für die Erfassung und Beschreibung der Faserwerte entwickelt und ihre technische Durchführbarkeit beurteilt. Kriterien hierfür sind das Handling, Vor- und Nachteile der angewandten Analysemethodik und das Risiko für Fehlmessungen. In diesem Rahmen erfolgt die Validierung der Methode, d.h. die Prüfung ihrer Eignung für den Einsatzzweck. Erweist sich die Methode als gut anwendbar und werden die Ergebnisse der Methodenvalidierung als zufriedenstellend angesehen, werden weitere Untersuchungen nötig sein, um daraus eine konkrete Anleitung für die rechtsmedizinische Praxis herleiten zu können. Es wurde eine zufällige Stichprobe der Trachealflüssigkeiten von 33 volljährigen Verstorbenen gewonnen, die im Zeitraum der Studie im Institut für Rechtsmedizin Halle obduziert und durch die zuständigen Obduzierenden für die Teilnahme an der Studie freigegeben wurden. Ein Ausschluss erfolgte bei Verstorbenen, bei deren Obduktion und durch weiterführende Untersuchung keine Todesursache festgestellt werden konnte und wenn sich bei der äußeren Leichenschau oder der Obduktion Hinweise für ein Ersticken ergeben hatten. Einige Proben wurden in mehrere Teile aliquotiert, sodass sie für mehrere Versuche verwendet werden konnten. Acht Proben mussten nachträglich aus der Studie ausgeschlossen werden. Ein Ausschluss erfolgte, wenn eine Fehlintubation (Absaugung aus dem Ösophagus) festgestellt oder im Verlauf der Studie eine Schimmelbildung beobachtet wurde.

#### 3.2 Probengewinnung und Probenaufbewahrung

Die Probengewinnung erfolgte ausschließlich im Institut für Rechtsmedizin in Halle (Saale). Zur Probengewinnung wurde nach den in 3.1 beschriebenen Ein- und Ausschlusskriterien eine Tracheallavage der Verstorbenen durchgeführt (s. Abb. 2). Dazu wurde ein Absaugkatheter (Absaugkatheter gebogen Typ "Ideal", REF 43031411 MEDINORM, Braun, Sempach, Schweiz) durch die Mundhöhle in die Trachea des Leichnams eingeführt. Bei der Einführung besteht die Problematik, dass der Katheter eine Fehllage im Ösophagus einnehmen kann. Um dies zu vermeiden, wurde bei komplexeren Fällen ein Laryngoskop (Laryngoskop SET, Erwachsene mit: 1 Griff, 3 Spatel, REF 03.51020.011, KaWe, Asperg, Deutschland) verwendet, weil der Katheter dadurch unter verbesserter Sicht eingeführt werden konnte. In Fällen, in denen aufgrund der sehr weichen

und flexiblen Materialbeschaffenheit des Katheters eine korrekte Platzierung nicht gewährleistet werden konnte, wurde ein Beatmungstubus (Trachealtubus, oral/nasal, mit Cuff, 6,5mm, Super Safety Clear, REF 112482, RÜSCH, Fellbach, Deutschland) als "Führungsschiene" eingesetzt. Der Tubus wurde in der Trachea belassen, um im Verlauf der Obduktion eine Fehlintubation ausschließen zu können. In dem Fall, in dem ein Verstorbener vorbehandlungsbedingt bereits intubiert oder tracheotomiert war, wurde der Absaugkatheter direkt über das vorliegende System eingeführt.

Über eine Katheterspritze (TERUMO SYRINGE without needle, steril, Catheter Tip 50ml, REF SS+50C1, Terumo Europe, Leuven, Belgien) schloss sich eine Spülung mit 10 ml dest. Wasser über den Absaugkatheter an. Danach wurde der Absaugkatheter über ein Trachealsaugset (Tracheal Saugset steril, REF 94780000, SMS medipool GmbH, Gauting-Buchendorf, Deutsch-







Abbildung 4: Falle des Trachealsaugsets

Abbildung 3: Plastikbehälter mit Deckel

Abbildung 2: Tracheallavage

land, siehe Abb. 4) und einen Verbindungsschlauch (Verbindungsschlauch/Fingertip steril, REF 16024182, Unomedical, ConvaTec, Flintshire, Vereinigtes Königreich) an das Absauggerät (Type 03612 Medela, Baar, Schweiz) angeschlossen und der Trachealinhalt abgesaugt. Dieser wurde in einen Plastikbehälter mit Deckel (Versandgefäß aus PP mit Schraubverschluss, 50ml, Diagonal GmbH, Münster, Deutschland, s. Abb. 3) umgefüllt. Bei einer großen Menge an Trachealinhalt musste der Schritt des Umfüllens mehrfach erfolgen. Anschließend wurden aus einem weiteren Plastikbehälter 6 ml dest. Wasser aufgesaugt. Diese Flüssigkeit verblieb in der Falle des Trachealsaugsets; der Schritt diente der Spülung des Absaugkatheters, sodass keine Trachealflüssigkeit in dem Katheter verblieb. Jede Probe (P) wurde in einen Befundbogen (s. Anhang) eingetragen. Nach der Probenvorbereitung wurde dieser um folgende Aspekte ergänzt:

Tabelle 1: Ergänzende Aspekte des Befundbogens nach Probenvorbereitung

Datum der	Faseranzahl pro	u.U. Fasergröße	u.U. Faserfarbe	Ausschluss
Aufbereitung	ml und Filter		und – merkmale	(ja/nein)

Pro Proband fielen eine Falle sowie mind. ein Plastikbehälter mit Trachealinhalt an. Die Aufbewahrung der gewonnenen Proben erfolgte bei 4 °C im Kühlschrank im Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale). Für eine längerfristige Aufbewahrung wurden die Proben bei etwa -20°C gelagert. Beide Temperaturangaben wurden mittels Thermostat überprüft. Zur Aufbewahrung wurden Plastikboxen (App Box, Clear, 2l, Rotho Kunststoff AG, Würenlingen, Schweiz) verwendet.

# 3.3 Probenvorbereitung und Faserdarstellung

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden Möglichkeiten der Probenvorbereitung (Zentrifugieren und Filtrieren der Trachealflüssigkeit) und der Faserdarstellung (Einbettung und Materialreinigung) getestet.

# 3.3.1 Zentrifugation und Filtration

Für die differentielle **Zentrifugation** wurden die Proben (jeweils ~10-15ml) in Zentrifugenröhrchen umgefüllt und bei Raumtemperatur mit mind. 4000 rpm für 5min zentrifugiert. Dabei entstanden aus jeder Probe durch die Sedimentationsgeschwindigkeit (Barker et al., 2013) ein Überstand in Form von zwei flüssigen Phasen sowie ein Sediment. Der Überstand wurde grob dekantiert und anschließend mittels Eppendorf-Pipette (100-1000  $\mu$ l, Eppendorf Reference, Hamburg, Deutschland) abgesaugt. Aus allen drei Phasen wurde ein 20 $\mu$ l-Tropfen mittels Pipette auf jeweils einem Objektträger ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte visuell unter dem Mikroskop.

Für die **Filtration** wurden wiederverwendbare Filterhalter aus Kunststoff mit einem 25mm Durchmesser benutzt, bestehend aus zwei Filterhalterhälften mit jeweils einer herausnehmbaren Lochplatte und einem Dichtungsgummiring dazwischen, in welche die Filter und Membranen mittels einer Pinzette eingesetzt wurden (Filterhalter für Spritzen, Polysulfon, Ø 30mm x H 34mm, für Filter Ø 25mm, FP 025/1, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe Deutschland, s. Abb. 5 & 6). Mit Hilfe steriler Spritzen (10ml Syringe Luer-Lok Tip, REF 300912, BD, Temse, Belgien) wurden die Proben über die in der Filterhalterung befindlichen Filter/Membranen gedrückt (s. Abb. 7).



Abbildung 5: Filterhalter



Abbildung 6: Filterhalter in

Einzelteilen



Abbildung 7: Filtrierung

Die Plastikbehälter oder Bechergläser, aus denen Tracheallavageprobe (TP) aufgezogen wurde, wurden mit dest. Wasser. gespült. Diese Spülflüssigkeit wurde ebenfalls über den Filter gedrückt, um einen möglichen Materialverlust zu minimieren. Bei den Luer-Lock-Spritzen wurden 20mlund 10ml-Spritzen getestet (s. weiter unten Vorfiltertestreihen, v.a. (d) und (f) und 3.4.1 B2). In den restlichen Versuchen wurde stets die 10ml-Spritze verwendet. Die Arbeiten erfolgten aus Sicherheitsgründen unter einem betrieblich geprüften Abzug. Die Kriterien zur Beurteilung der verschiedenen Filter waren die Porengröße und Textur. Die Filter wurden mit Probenflüssigkeit bespült. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Mikroskops, wobei die Erkennbarkeit der Fasern und damit die Möglichkeit der Faserabgrenzung – v.a. weißer und farbloser Fasern – von der Oberfläche entscheidend war. Wichtige Aspekte waren somit die Homogenität, Struktur und Farbe der Filteroberfläche. In diesem Rahmen wurden auch verschiedene Mikroskopeinstellungen, wie die des Lichts, getestet, s. 4.2. Für die Filtration wurden verschiedene **Filtertypen** getestet:

#### Glasfaserfilter

#### (Grade GF/D, Ø 25mm, Porengröße 2,7, Whatman, Maidstone, Vereinigtes Königreich)

Der Glasfaserfilter wurde mit 3 präparierten Lösungen getestet: zweimal 10ml dest. Wasser mit jeweils 10 weißen Fasern (Watte aus 100% Baumwolle, dm-drogerie markt GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgestockt, einmal 10ml dest. Wasser mit 10 blauen Fasern (unbekanntes Material und Hersteller) aufgestockt und 2 präparierten TP (zweimal Trachealsekret, ~10-15ml/P, mit jeweils 10 weißen Fasern aufgestockt).

#### Versapor-Membran

(Versapor-450 Membranscheiben, Ø 47mm, Porenweite 0,45 $\mu$ m, Pall Life Sciences, New York, USA): bestehend aus einem Acryl Copolymer

Die Membran wurde mit einer präparierten Lösung (10ml dest. Wasser mit 10 weißen Fasern aufgestockt) und einer präparierten TP (~10ml Trachealsekret mit 10 weißen Fasern aufgestockt) getestet. Die TP wurde zuerst zentrifugiert. Zur Reduzierung der Matrixbelastung (s. 4.1.2) wurde nur die flüssige Phase, mit den 10 weißen Fasern versetzt, nachdem sie grob dekantiert wurde. Supor-Membran

# (Supor-800, Membrane Filter, Ø 25mm und 47mm, Porengröße 0,8μm, Pall Life Sciences, New York, USA): bestehend aus Polyethersulfon

Die Membran wurde mit 2 präparierten Lösungen (zweimal 10ml dest. Wasser mit jeweils 10 weißen Fasern aufgestockt) und zwei präparierten TP (zweimal ~10-15ml Trachealsekret mit jeweils 10 weißen Fasern aufgestockt) getestet. Die TP wurden, wie bei der Versapor-Membran, erst zentrifugiert und nur die flüssige Phase mit 10 weißen Fasern versetzt.

# Polycarbonate Track Etched (PTCE) Membran

(*PTCE Membrane Ø 25mm, Porengröße 20µm, GVS Life Sciences North America, Sanford USA*) Die PTCE-Membran wurde in den Experimenten a und b der Vorfiltrierung (siehe weiter unten) getestet. In beiden Versuchen wurde sie zwischen die Nylonfilter mit 100µm- und 11µm-Porengröße im Versuchsaufbau eingereiht. Beide Filterreihen wurden mit jeweils einer TP bespült.

# Nylon-Netzfilter (NNF)

(NNF White Plain, Ø 25mm, Maschengröße 100μm, Katalognr. NY1H02500; Maschengröße 41μm, Katalognr. NY4102500; Maschengröße 30μm, Katalognr. NY3002500; Maschengröße 11μm, Katalognr. NY1102500; Maschengröße 5μm, Katalognr. NY0502500; Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland)

Zu Beginn wurden die NNF visuell unter dem Mikroskop beurteilt und im Anschluss als Hauptbestandteil der Vorfiltertests. Zunächst wurden die NNFs mit den Porengrößen 100µm und 11µm, im weiteren Verlauf die Porengrößen 5µm, 30µm, und 41µm getestet.

# Matrixbelastung

Im Rahmen der Filtrierung lagerte sich eine bedeutende Menge an organischem Material, im weiteren Verlauf Matrix genannt, auf den Filtern und dem Filterhalter ab. Das führte sowohl zu Verstopfung des Filters als auch zu eingeschränkter Beurteilbarkeit der Fasern, daher wurden verschiedene Substanzen zur Zersetzung organischen Materials, Vorfiltrierungstests in Form von in Reihe geschalteten Filtern mit verschiedenen Porengrößen und physikalische Maßnahmen getestet: Ultraschallbad- (RK 102 H, Bandelin, Berlin, Deutschland, s. Abb. 9) und Vortex-Behandlung (Vortex-Genie 2 PULSE. Model No.SI P266, Scientific Industries INC, Bohemia, New York, USA, s. Abb. 8) der Proben.



Abbildung 8: Einsatz Vortex



Abbildung 9: Ultraschallbehandlung der Probe

Substanzen zur Matrixzersetzung wurden an Proben getestet, die eine große Matrixbelastung aufwiesen. Auf Grund der beschriebenen Heterogenität der TP konnte keine Substanz zum Einsatz gebracht werden, die nur ein bestimmtes Material auflöst. Daher war das Ziel eine Substanz in einer bestimmten Konzentration zu wählen, welche die Matrix auflöst, ohne die Fasern anzugreifen. Hierfür wurden folgende Substanzen geprüft:

Salzsäure (37%, p.a, ACS, CAS: 7647-01-0, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) mit dest. Wasser verdünnt (10-90 ml, 1:10 v/v).
10 ml HCl wurden an einem 20µm-Filter getestet, der vorher mit 50ml Ameisensäure (AS) behandelt worden war. 20ml, 60ml und 90ml HCl wurden an einem 100µm-Filter getestet.

- Methanol (Methanol ≥99.8%, HiPerSolv CHROMANORM®, gradient grade for HPLC, CAS: 67-56-1, VWR Chemicals BDH®, Darmstadt, Deutschland) wurde an einem 100µm-Filter getestet, der mit 10ml AS vorbehandelt wurde.
- Acetylcystein (ACC) (akut 600mg/Tablette Hexal AG Holzkirchen, Deutschland)
   Zwei Tabletten à 300mg ACC wurden in 150ml dest. Wasser gelöst und 1min ins Ultraschallbad gehalten, sowie kurz vor Gebrauch weitere 1,5min im Ultraschallbad behandelt. Die Lösung wurde an einem 100µm-Filter getestet.
- Ameisensäure (AS) (Rotipuran ≥98%, p.a., ACS, CAS: 64-18-6, Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) in 5mol/l
   Getestet wurde die AS an einem 100µm-Filter mit 10ml AS, an einem 20µm-Filter mit 50ml AS, an einem100µm-Filter der mit 20-90ml HCl vorbehandelt wurde mit 100ml AS, an einem100µm-Filter mit 100ml AS, an einem 100µm-Filter der mit 100µm-Filter der mit 100µm-Filter mit 100µm-Filter der mit 100µm-Filter de

Nach den Säurebehandlungen wurden die Filter mit dest. Wasser gespült, um eine Zersetzung des Filters oder der Fasern sowie eine Beschädigung des Filterhalters zu vermeiden. Zudem wurden die Filter innerhalb von 24h ausgewertet, sodass Zersetzungsprozesse minimiert wurden. Die drei oben genannten Aspekte (Behandlung mit chemischen Substanzen, physikalische Maßnahmen, Vorfiltrierungstest) wurden parallel in mehreren Versuchsreihen getestet. Dafür wurden Vorfiltertestreihen angefertigt, bei denen mehrere Filter mit verschiedenen Porengrößen in absteigender Größenordnung in Reihe geschaltet wurden. So wurde eine TP über den Filter mit den größten Poren gefiltert. Im Anschluss wurde die gefilterte Flüssigkeit über den Filter mit der nächstkleineren Porengröße gefiltert.

#### Vorfiltertestreihen

(a) Nach der Vortex-Behandlung erfolgte die Aliquotierung einer makroskopisch sedimentreichen Probe in zwei Teile à ~20ml. Zuletzt erfolgte die Filtrierung eines Probenteils über die in Abb. 10 dargestellten Filter. Der 100 $\mu$ m-Filter wurde mit 10ml 5mol/l AS und dann mit Methanol behandelt. Der 20 $\mu$ m-Filter wurde mit 50ml 5mol/l AS und dann mit 10ml HCl behandelt.



Abbildung 10: Vier hintereinander geschaltete Filtersysteme, die nacheinander mit der jeweils vorher filtrierten Probenflüssigkeit filtriert wurden.

(b) Erst Versuchsaufbau wie in (a), aliquotierter zweiter Probenteil aus (a) wurde verwendet. Aufgrund der Filterverstopfung Modifikation des Versuchsaufbaus durch Einbau eines 5 $\mu$ m-NNF (s. Abb. 11). Behandlung des 100 $\mu$ m-Filter mit 20ml, 60ml, 90ml HCl und 100ml AS



Abbildung 11: Erweiterter Versuchsaufbau mit 5µm-Filter.

(c) Die TP (~22ml) wurde 5min ins Ultraschallbad gehalten und anschließend Vortex-behandelt. Die Probe wurde über die in Abb. 12 dargestellten Filter filtriert.





Der 100µm-Filter wurde mit 100ml 5mol/l AS behandelt. Die filtrierte Flüssigkeit inkl. filtrierte Säure wurde aufgehoben und ein zweites Mal über die Filter aus Versuchsaufbau (c) wie in Abb. 13 filtriert. Über den 100µm-Filter wurden zusätzlich 50ml AS filtriert.



Abbildung 13: Zweiter Durchgang der filtrierten Flüssigkeit aus (c)

(d) Eine TP wurde 5min ins Ultraschallbad gehalten, im Anschluss gevortext, in zwei gleich große Teile à ~18ml aliquotiert und für die in Abb. 14 und 15 dargestellten Versuchsreihen verwendet. Die Filtrierung erfolgte mit 20ml- statt 10ml-Spritze. Da sich der Versuchsaufbau aus Abb. 14 bewährte, wird der Aufbau aus 100 $\mu$ m-/41 $\mu$ m-/11 $\mu$ m-/5 $\mu$ m-Filter im weiteren Studienverlauf unter dem Begriff "NNF-Reihe" zusammengefasst.



Abbildung14: Versuch 4 mit 41µm

Abbildung 15: Versuch 4 mit 30µm

(e) Zwei Tabletten ACC à 300mg wurden in 150ml dest. Wasser gelöst. Anschließend wurde die angerührte ACC-Lösung 1min und kurz vor Gebrauch weitere 1,5min im Ultraschallbad behandelt. Im Vergleich dazu wurden 150ml 5mol/l AS benutzt. Die Probe (~20ml) wurde 5min im Ultraschallbad behandelt und unmittelbar vor der Benutzung 1min gevortext, 3min im Ultraschallbad behandelt, 1min gevortext und weitere 3min im Ultraschallbad behandelt. Sie wurde über zwei 100µm-NNF filtriert. Anschließend wurde einer der Filter langsam mit der AS und der andere Filter mit dem ACC filtriert. Im weiteren Verlauf beinhaltete die Filtrierung einer TP oder Blindprobe immer einer AS Behandlung mit 150ml 5mol/l AS. Dies bedeutet, dass die AS analog zur TP über die NNF-Reihe gefiltert wird.

(f) Die TP (~18ml) wurde im Vorfeld 1min gevortext, 3min mit Ultraschall (US)-Bad und noch 1min Vortex-behandelt. Die Probe wurde mit einer 20ml statt einer 10ml Luer-Lock-Spritze über die NNF-Reihe filtriert. Die Filter wurden anschließend für die Einbettungsversuche verwendet.

#### 3.3.2 Einbettung und Materialreinigung

Anfangs erfolgte die visuelle Auswertung der Fasern an einem Stereomikroskop im Institut für Rechtsmedizin Halle (Saale). Der überwiegende Teil der Studie wurde mit einem digitalen Mikroskop (VHX- 6000 Digitalmikroskop Keyence, Neu-Isenburg, Deutschland) im Chemischen Institut der MLU erstellt. Die einzelnen Textilfasern wurden gezählt und in späteren Versuchen in den Kategorien gefärbte und ungefärbte/weiße Fasern erfasst. Je nach Fragestellung wurden diese genauer betrachtet und nach qualitativen Merkmalen, wie Faserfarbe und Faserstruktur, beurteilt. Es wurde die Hellfeld- und Dunkelfeldmikroskopie getestet. Auch wurde mit Polarisationslicht und verschiedenen Beleuchtungseinstellungen gearbeitet. Um sich mit der Fasermikroskopie vertraut zu machen, wurden zu Beginn der Studie Fasern von 7 verschiedenen Stoffen unterschiedlichen Materials und Farbe unter dem Mikroskop betrachtet.

#### Einbettung

Die Schritte zur Einbettung der Filter wurden experimentell erarbeitet:

(a) Zur Beurteilung, ob sich trockene oder nasse Filter besser mikroskopisch auswerten lassen, wurde ein trockener Filter (100µm-NNF) der Verpackung entnommen und ein weiterer mit dest. Wasser befeuchtet. Beide wurden jeweils auf einen Objektträger gelegt und unter dem Mikroskop betrachtet.

(b) Die Einbettung der Filter zwischen verschiedenen Materialien wurde getestet. Die Kombinationen aus zwei Deckplättchen (DP), zwei Hämatozytengläsern (HG), zwei Objektträgern, einem HG und einem Objektträger wurden erprobt. Vergleichend wurde das obere Glas von oben oder von der Seite auf den Filter aufgelegt. Als Kriterien dienten die Handhabbarkeit und die Luftfreiheit zwischen Glas und Filter.

(c) Zwei NNF wurden in dest. Wasser und Glycerin als Medium eingebettet und mikroskopisch verglichen. Dafür wurde auf einen 5µm-Filter mittels Pasteur-Pipette ein Tropfen dest. Wasser aufgebracht und der Filter mit einem HG abgedeckt. Ein zweiter Filter wurde mit dest. Wasser befeuchtet und auf diesen ein Tropfen Glycerin mittels Pasteur-Pipette aufgebracht. Das HG wurde seitlich aufgedrückt. Die Menge an Einbettungsmedium wurde in sechs Versuchsdurchläufen mit 2-7 Tropfen Glycerin ermittelt, wobei vorab eine Behandlung der 5µm-NNF mit dest. Wasser und AS 5mol/l erfolgte. Zusätzlich wurde bei der Einbettung das HG seitlich oder senkrecht aufgebracht. Als Beurteilungskriterium diente die Fläche an Lufteinschlüssen.

(d) Durch das Aufbringen einer bestimmten Anzahl violetter Fasern (s. 3.5.2) auf 5µm-NNF, wurde die Wiederfindungsrate (WDF) der Fasern nach Einbettung in 6 Durchläufen bestimmt und das Vorgehen optimiert. In diesem Rahmen wurde auch der Verbleib von Fasern auf Komponenten des Filterhalters sowie deren Einbettung getestet. Violette Fasern (Farbe 013, 100% Baumwolle, Summer Cotton, Austermann, Schoeller und Stahl) wurden mittels Präzisionspinzette direkt auf einen 5µm-NNF aufgebracht. In Durchlauf 1 wurde der Filter unmittelbar danach eingebettet. In den Durchläufen 2 bis 4 wurde der Filter in den Filterhalter eingebaut, mit dest. Wasser filtriert und anschließend eingebettet. In den Durchläufen 5 und 6 wurde mit AS statt mit dest. Wasser filtriert. Zudem wurde bei Durchlauf 6 Luft mit der Luer-Lock-Spritze über den Filter gedrückt.

(e) Es wurde eine Blindprobe (s. 3.4.1) angefertigt. Die Filtrierung erfolgte mit einer 10ml Luer-Lock-Spritze. Zusätzlich wurden auch die Lochplatten und Filterhalterhälften auf einer Petrischale mikroskopiert, da Fasern auch auf den Filterhalterkomponenten gefunden wurden (s. 4.2.1, Punkt (d)). Deshalb wurde auch der Dichtungsgummi betrachtet, indem er auf einen Objektträger gelegt und, um Kontaminationen zu vermeiden, mit einem HG abgedeckt wurde. Die Einbettung des Filters erfolgte mit zwei Tropfen Glycerin. (f) Zur Isolierung der sich auf der oberen Lochplatte möglicherweise befindlichen Fasern wurden verschiedene Materialien mikroskopisch getestet. Das Beurteilungskriterium war, wie bei den Filtertypen, die Möglichkeit der Faserabgrenzung von der Oberfläche, insbesondere in Bezug auf weiße/farblose Fasern. Es wurden zwei Materialien getestet: Klebeseite von zwei verschiedenen Wandhaken (Klebehaken Powerstrips Small Weiß 0,06 m (L) Kunststoff, Tesa, Offenburg/Hamburg, Deutschland) und doppelseitiges Klebeband (KB) (Doppelseitiges Klebeband universal, Tesa, Offenburg/Hamburg, Deutschland).

Nach der Entscheidung für das KB wurde dieses zurechtgeschnitten und auf einen Objektträger



Abbildung 16: Aufbringen eines Deckplättchens (DP) auf das Klebeband.

geklebt. Auf die freie Seite des KBs wurde ein DP aufgebracht (s. Abb. 16). Das Kleben und Bekleben des KBs wurde dreimal wiederholt, sodass sichergestellt werden konnte, dass hierdurch keine relevante Faserkontamination in den Versuch eingebracht wird. Des Weiteren wurden verschiedene Lichteinstellungen zur optimalen Darstellung des KBs getestet (s. 4.2.2 Mikroskopie). Ferner wurde verifiziert, dass auf

der Lochplatte befindliche Fasern nach Präparation mit dem KB wiedergefunden werden konnten. Hierfür wurden 5 violette (s. 3.5.2) Fasern auf eine Lochplatte gesetzt. Die Lochplatte wurde auf ein KB, das auf einem Objektträger fixiert war, abgedrückt. Dies wurde mit einem DP abgedeckt und unter dem Mikroskop ausgewertet.

(g) Da die WDF der Fasern auf dem Filter durch die Anwendung von Druckluft nach der Filtration gesteigert werden konnte (s. 4.2.1 Punkt (d)), wurde die Menge an benötigter Druckluft (nicht brennbar, Dust Off 67, 33163-DE, Kontakt Chemie, Zele, Belgien) experimentell ermittelt. Dafür wurden violette Fasern auf einen 5µm-NNF mittels Pinzette unter mikroskopischer Kontrolle aufgebracht. Der Filter wurde in einen Filterhalter eingebaut und über eine 10ml Luer-Lock-Spritze mit dest. Wasser filtriert. Dieser Versuch wurde 5 Mal mit 10 violetten Fasern, die auf den Filter aufgebracht wurden, durchgeführt. Die Versuche wurden mit 3, 5, 8 und 10 Hüben Druckluft durchgeführt. Anschließend wurden die Filter und Bestandteile der Filterhalterung mikroskopisch ausgewertet.

(h) Mit der endgültigen Version der Einbettungsmethodik (s. Ergebnisse unter 4.2.1 und 5.3.1) wurde die WDF unter Verwendung einer TP ermittelt. Dafür wurde im Vorfeld eine TP (~12ml) mit 10 blauen und 10 weißen Fasern versetzt, aufgearbeitet (Filtrierung der TP über die NNF-Reihe und anschließende AS-Behandlung) und unter dem Mikroskop ausgewertet.

#### Materialreinigung

Das Risiko der Faserkontamination durch die Einbringung von Fremdfasern und Faserverschleppung ist innerhalb der Studie als hoch zu bewerten. Daher wird der Materialreinigung große Bedeutung zugeschrieben, sie stellt einen eigenständigen Teil der Methodik dar. Alle verwendeten Materialien wurden einem Spülprozess unterzogen. Dabei musste das Vorgehen im Verlauf der Methodenentwicklung aufgrund von Kontaminationen mit Umgebungsfasern und Faserverschleppungen mehrfach angepasst und optimiert werden.

Nach der Arbeit mit Trachealsekret wurden die Flächen mit Flächendesinfektionsmittel desinfiziert und die Materialien mit Waschmittel (Ultra-Fix Spülmittel, Reinex GmbH & CO KG, Castrop-Rauxel, Deutschland) unter fließendem Wasser gereinigt. Abschließend wurden diese ebenfalls desinfiziert. Dafür wurden die Filterhalter auseinandergebaut, die Filter verworfen und die Einzelteile dem Reinigungsprozess unterzogen (s. Detailbeschreibung in 4.3). Alle Materialien zum Einmalgebrauch wurden sachgemäß entsorgt. Verunreinigte Arbeitskleidung wurde ausgewechselt. Zwischen den Versuchen wurden die Materialien im Laborabzug abgedeckt gelagert. Zur Entfernung von Kleberückständen an den mit KB abgeklatschten Filterhalterkomponenten (obere Filterhalterkomponente und Lochplatte) wurden verschiedene Substanzen getestet, um eine Schädigung des Materials zu vermeiden: Essigsäureethylester (technische Reinheit), Aceton (technische Reinheit) sowie Ethanol ≥ 70% (MEK vergällt, Biomel GmbH, Dessau, Deutschland). Das Material wurde mit den Substanzen in Petrischalen gebadet und sanft mit Reinigungsstäbchen (Polyurethanschaum, Critical Swab, Modell 149-0264, VWR, Darmstadt, Deutschland) gereinigt, wobei Ethanol als am besten geeignet angesehen wurde.

#### 3.4 Maßnahmen zur Vorbeugung von Faserkontamination

Zur Vermeidung von Faserkontaminationen wurden neben der Materialreinigung verschiedene Antikontaminationsmaßnahmen entwickelt und die Faserbelastung der Räumlichkeiten durch ein sog. Environmental Screening gemessen. Die Maßnahmen zur Vorbeugung der Faserkontamination mit Umgebungsfasern basieren einerseits auf in der Literatur erprobten Maßnahmen (Moore et al., 1986, Grieve, 2000, Roux et al., 2001, Robson und Coyle, 2001, Nuelle et al., 2014, Woodall et al., 2015, Dris et al., 2016, Klasmeier und Wissing, 2016, Robertson et al., 2017) und andererseits auf Beobachtungen während der Studie.



- Es wurde eine Schutzausrüstung getragen (s. Abb. 17): Haarnetz, Mundschutz, *Abbildung 17:* Handschuhe (Nitra-Touch, Long Cuff, Ansell, Brüssel, Belgien; und Micro-

Touch, Blue Nitrile, Ansell, Brüssel, Belgien), eine laborgeeignete Hose (Kasak, blau, 100% Baumwolle), festes Schuhwerk sowie ein wasserabweisender OP-Kittel (SP Mantel Universal L, Artikelnummer 665502000, Chirutex, Elis Group Services GmbH, Hamburg, Deutschland) aus Mikrofaser.

- Alle Materialien (Petrischalen, Bechergläser, Pinzetten usw.) wurden vor Gebrauch gründlich gespült. Dies beinhaltete eine Reinigung unter fließendem Wasser mit entsprechendem Wasser-

druck sowie eine anschließende kurze Spülung mit dest. Wasser. Die Materialien wurden unmittelbar abgedeckt (z.B. eine Petrischale auf das Becherglas oder zwei Petrischalen übereinander) oder mit Alufolie (Gut&Günstig, Hamburg, Deutschland) verschlossen und in den Abzug gestellt. - Alle zu benutzenden Flächen in Ch1 (Abzug, Spülbeckenrand) und Ch2 (Mikroskop, Tisch, Spülbeckenrand) wurden vor jedem Versuch mit einem im Haushalt üblichen Schwammtuch (18x20cm Gut&Günstig, Hamburg, Deutschland) und Leitungswasser gründlich gewischt (s. Abb. 18 und 19). Nach jeder längeren Zeitspanne (mehrere Wochen), in der keine Versuche stattfanden, wurde der Abzug grundgereinigt.



Abbildung 18: Wischen des Spülbeckenrands

Abbildung 19: Wischen des Abzugs

- Die Materialen wurden im Abzug oder im Schrank aufbewahrt. Der Abzug wurde immer geschlossen gehalten. Materialen, wie in den Versuchen benutzte textile Proben, wurden in Plastikbeuteln gelagert.

- Die Filterboxen wurden nur für einige Sekunden geöffnet, um einen Filter zu entnehmen, anschließend wurden sie direkt verschlossen. Die Filter wurden sofort in den Filterhalter gelegt, der wiederum sofort verschlossen wurde. Die Luer-Lock-Spritzen wurden erst kurz vor Gebrauch aus der sterilen Verpackung entnommen.

- Die Materialien wurden nach jeder potenziellen Kontamination, auch während der Versuche, gespült. Dies betraf auch die behandschuhten Hände. Vor Einbringung in den Abzug wurden die Probenbehälter zu Versuchsbeginn abgespült. Leitungswasser sollte nur zum Spülen der Materialien und zum Reinigen der Flächen benutzt werden, da es je nach Region und Haushalt unterschiedlich zusammengesetzt ist und eine unbekannte Menge an Verunreinigungen beinhalten kann (Barker et al., 2013). Das dest. Wasser wurde im Chemischen Institut der MLU zentral gewonnen und für die Nachspülung der Materialien und als Substanz in den Versuchen benutzt.

- Während des Filtrierens wurden alle Bechergläser und Plastikbehälter mit Petrischalen oder ihrem zugehörigen Deckel abgedeckt. Nur bei unmittelbarer Arbeit an einem Gefäß wurde die Abdeckung beiseitegelegt und zwar die Petrischalen und Deckel mit dem Boden in Richtung Arbeitsfläche.

- Textilien wurden so weit wie möglich von den Proben und den Materialen ferngehalten.
- Um Kontaminationen während des Mikroskopierens zu vermeiden, wurden sowohl die Filter,

als auch die zu mikroskopierenden Filterhalterkomponenten mit HG oder DP abgedeckt. Die Einbettung der vier Filter erfolgte einzeln, jeweils erst unmittelbar vor dem Mikroskopieren des entsprechenden Filters.

- Die Materialreinigung wurde auf Grund von beobachteten Probenkontaminationen im Laufe der Methodenentwicklung ständig weiter optimiert.

- Zu Beginn der Methodenentwicklung erfolgte die Probenvorbereitung im toxikologischen Labor des Instituts für Rechtsmedizin in Halle (Saale) und nur die Faserdarstellung im Labor der Organischen Chemie des Instituts für Chemie der MLU. Im Laufe der Studie wurden alle Arbeitsschritte bis auf die Probengewinnung und -aufbewahrung in das Labor der Organischen Chemie verlegt, um die Kontaminationen durch Transportwege zu vermeiden.

#### 3.4.1 Blindproben

Im Verlauf der Methodenentwicklung und Validierung wurden als Kontrolle der Probenvorbereitung immer wieder Blindproben (engl. Blanks) angefertigt. Das bedeutet, die gesamte Methodik wurde von Anfang bis Ende angewandt, jedoch unter Verwendung von dest. Wasser anstelle einer TP. Das dest. Wasser wurde dabei entweder bereits im Sektionssaal (SB) oder erst im Labor (LB) entnommen. Dies erlaubt die differenzierte Betrachtung der Methodik in den Phasen Probengewinnung (dest. Wasser ab SB) und Probenvorbereitung (dest. Wasser ab LB).

Bei den Blindproben aus dem SB wurden 10ml dest. Wasser mit der Katheterspritze über den Absaugkatheter in einen Plastikbecher gespült. Weiter wurde wie in der Probengewinnung verfahren: Der Absaugkatheter wurde über das Trachealsaugset und den Verbindungsschlauch an das Absauggerät angeschlossen und das dest. Wasser in die Falle aufgesaugt. Dieses wurde in einen weiteren Plastikbecher umgefüllt und es wurden weitere 6ml dest. Wasser zur Spülung des Absaugkatheters aufgesaugt, die in der Falle verblieben. Somit beziehen sich die Faserangaben auf 16ml/P. Die Proben (P) wurden vor Filtrierung 1min gevortext. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Filtrierung und Faserdarstellung mit der endgültigen Methodik. Die Abnahme von SB erfolgte an verschiedenen Tagen, zu verschiedenen Tageszeiten und von verschiedenen Sektionstischen. Die Fasern wurden ohne Unterkriterien erfasst.

SB1: Die Einbettung erfolgte bereits mit Glycerin, jedoch vor der Glycerinmengenbestimmung.

SB2: Benutzung einer 20ml Luer-Lock-Spritze statt einer 10ml Luer-Lock-Spritze.

SB3: Anschließend wurden Versuche für die geeignete Menge an Glycerin durchgeführt.

SB4: Auch hiernach erfolgten Versuche für die geeignete Menge an Glycerin.

SB5: Die Blindprobe wurde mit der endgültigen Einbettungsmethodik durchgeführt. Danach wurde die Materialreinigung weiter optimiert.

LB: Zur Kontrolle und raschen Erkennbarkeit von Faserkontaminationen und Faserverschleppung wurde nach Möglichkeit versucht, jeden Wiederfindungs- oder Präzisionsversuch mit einer Blindprobe aus dem Labor oder dem reinen Matrixanteil (Anteil der aliquotierten Probe, dem keine Fasern zugesetzt wurden) abzuwechseln. Dafür wurden 20ml dest. Wasser in einen Plastikbehälter gefüllt und analog zu den TPs filtriert, die Faserangaben beziehen sich also auf 20ml/P. Nach der ersten Stufe der WDF, die im Nachhinein wieder verworfen wurde, wurde eine Blindprobe angefertigt. Im Zuge der Ermittlung der WDF wurden insgesamt 6 Blindproben angefertigt, 2 pro Stufe. Bei Bestimmung der Präzision wurden ebenfalls 2 Blindproben angefertigt. Die Erfassung erfolgte in den Kriterien violette, weiße/farblose und andere Farben.

# 3.4.2 Environmental Monitoring

Zur Analyse der Faserbelastung in der unmittelbaren Umgebung des Arbeitsplatzes wurden aktive und passive Proben angefertigt. Der Ansatz orientiert sich an Woodall et al. (2015) und Klasmeier und Wissing (2016). Woodall et al. (2015) verstehen unter Environmental Monitoring das "Water monitoring", "Air monitoring using damped filter paper" und "Test laboratory for contamination using taping lifts (TLS)". Da sie quasi einen Reinraum schafften, wurden diese Ansätze modifiziert. Bei Klasmeier und Wissing (2016) entspricht das Screening mit Damped filter paper den Aktivproben mittels Vakuumpumpe und das Screening mittels Taping lifts den passiven Abklatschproben mittels Filter. Beide Screeningverfahren wurden im Laufe der Studie einmalig angewandt und dienten als Ersteinschätzung und Vergleich der Faserbelastung in den benutzten Räumlichkeiten. Die Studie war auf drei Orte aufgeteilt: den Sektionssaal der Rechtsmedizin (S), den Laborraum mit Abzug (Ch1) und den Mikroskopierraum (Ch2) im Chemischen Institut, daher wurden die Messungen an allen 3 Orten durchgeführt.

# Aktivproben

Klasmeier and Wissing (2016) ließen mit einer Vakuumpumpe über 24 Stunden lang Luft über einen Filter saugen und teilten dies auf vier Tage mit jeweils sechs Stunden Laufzeit auf.



Abbildung 20: Versuchsaufbau für Vakuumpumpe



Abbildung 21: Filter in Filterhalter auf Kernolive an Gummischlauch. Abdichtung mit Parafilm

Sie maßen das beprobte Luftvolumen mit einem Gaszähler und werteten den Filter quantitativ gravimetrisch aus. In Anlehnung an diese Vorgehensweise wurde in dieser Studie die Faserbelastung der Luft über 24h lang mittels Vakuumpumpe (Typ N820.3 FT.18, KNF Neuberger 79112 Freiburg Deutschland, max. Flussrate 20l/min) gemessen. Das entspricht in der Theorie einem Luftvolumen von 28.800l oder 28,8m<sup>3</sup>. Bei der verwendeten Vakuumpumpe handelte es sich um ein älteres Modell, sodass von einer Leistungsminderung auszugehen ist. Dadurch liegt das reale Luftvolumen vermutlich unter dem errechneten Wert. Die Inbetriebnahme der Pumpe und damit Beprobung der Filter erfolgte pro Raum 24h lang, und zwar aufgeteilt auf drei aufeinander folgende Tage mit jeweils 5-11h/Tag, während des üblichen Arbeitsbetriebs (07:40-19:34 Uhr).

Eine Kernolive (Normalschliff, Durchmesser 29mm, Länge 32mm) aus Glas wurde mittels einer Klemme an ein Stativ befestigt. Die schmale Öffnung wurde über einen Vakuumschlauch aus Gummi mit der Vakuumpumpe verbunden. Auf die breite Öffnung der Kernolive wurde ein Filterhalter mit einem 5µm-NNF gelegt. Dies wurde mit drei Lagen Parafilm (Parafilm "M", Laboratory Film, American National Can, Greenwich, Connecticut, USA) abgedichtet (s. Abb. 21).

Alle Materialen wurden bei einem Raumwechsel gereinigt und die Filter ausgewechselt. Die Konstruktion wurde in den verschiedenen Räumen an gut zugänglichen Orten nahe des Arbeitsplatzes aufgestellt (s. Abb. 20). Die verschiedenen Räume zeigten verschiedene Merkmale. Die mit der Vakuumpumpe beprobten Filter wurden regulär eingebettet und anschließend unter dem Mikroskop betrachtet. Auch die Filterhalter wurden ausgewertet.

### Laborraum mit Abzug (Ch1), s. Abb. 22 und 23

Etwa 20m<sup>2</sup>; ein großes Fenster; eine Raumteilung in zwei Arbeitsbereiche; ein Abzug, der ständig in Betrieb ist und Luft im Raum ansaugt; eine Tür mit Spalt zum gefliesten Boden; ein großes Spülbecken in der Raummitte; Stoffhandtücher, die neben dem Abzug hängen. Die Vakuumpumpe etwa 2m neben dem Abzug, etwa 4m vom Spülbecken und etwa 2m vom Fenster entfernt.



Abbildung 22: Laborraum Ch1 Spülbecken und rechts hinten Fenster



Abbildung 23: Abzug in Ch1

#### Mikroskopierzimmer (Ch2), s. Abb. 24 und 25

Etwa 15m<sup>2</sup>; zwei große Fenster; zwei Türen, von denen die eine permanent geschlossen ist und zum Flur hinausgeht. Die andere Tür ist ständig offen und führt zu zwei weiteren Laborräumen, in denen Abzüge stehen; das Mikroskop steht am Fenster; der Boden ist komplett mit graubraunem Teppich ausgelegt; die Stühle sind in den Farben des Teppichs gepolstert ist; das Spülbecken

#### befindet sich zwei Räume weiter.



Abbildung 24: Laborraum Ch2 Links Mikroskopiertisch mit Mikroskop unter dem Fenster, rechts Schreibtisch



Abbildung 25: Spülbecken

#### Sektionssaal (S), s. Abb. 26 und 27

Etwa 50m<sup>2</sup>; 3 Sektionstische in der Mitte des Raums; 3 große Fenster an der langen Kante, darunter lange Arbeitsfläche aus Metall; 2 Türen, beide an den kurzen Kanten, eine führt zum Aufzug, die andere zur Schleuse; neben dem Aufzug ist das Spülbecken; Materiallagerung an der langen Wand gegenüber den Fenstern, genauso wie an der kurzen Raumseite in einem Glasschrank; alles ist gefliest oder aus Metall; Frischluftzufuhr von außen über die Klimaanlage neben den Deckenlichtern. Die Vakuumpumpe stand auf der Arbeitsfläche, einige Meter von dem linken und dem mittleren Tisch entfernt. Von dem rechten Tisch war die Pumpe etwa 2m, von dem Fenster etwa 1m entfernt.



Abbildung 26: Sektionssaal Mittlerer und linker Sektionstisch, im Hintergrund Fliesenregal und links Spülbecken



Abbildung 27: Sektionssaal Arbeitsplatte unter dem Fenster

#### Passivproben

Auch die Anfertigung der Passivproben orientierte sich an Klasmeier and Wissing (2016). Aus den Räumen Ch1, Ch2 und S wurden Abklatschproben genommen. In diesen Räumen wurden jeweils 4 Entnahmeorte gewählt. Von jedem Entnahmeort wurden drei Abklatschproben angefertigt. Dies ergab pro Entnahmeort eine Fläche von 14,72cm<sup>2</sup>. Die NNF (d=25mm, Porengröße 5µm) wurden mit einer Präzisionspinzette gegriffen, in einer Petrischale mit dest. Wasser befeuchtet, auf die Fläche gelegt und mit einem behandschuhten Finger angedrückt. Anschließend wurde der

Filter zwischen Objektträger und HG eingebettet, ohne Glycerin zu verwenden, da der Filter feucht und plan war und sich problemlos ohne Lufteinschlüsse einbetten ließ. Am Ende erfolgte die mikroskopische Auswertung. Die Abnahme der Ch2-Proben erfolgte im Anschluss an eine Probenvorbereitung. Für den Transport aus dem Sektionssaal ins Labor (zum Mikroskop) wurden die Proben auf ein großes Plastiktablett gelegt, mit Laboralufolie abgedeckt, in eine Spurensicherungstüte (Asservatentaschen Deba-Breathe<sup>TM</sup> - ETO-sterilisiert und DNA-frei, Coloprint GmbH, Hilden, Deutschland) gelegt und in das Labor des chemischen Instituts verbracht.

#### 3.5 Methodenvalidierung und Statistik

Die Methodenvalidierung orientiert sich an der Validierung analytischer Methoden. Die Validierung wurde durch die DIN ISO 8402 festgelegt und besagt: "Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellen eines Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind" (Kromidas und Ermer, 2000). Die Autoren bezeichnen die Validierung als einen "Nachweis von Qualität", unter der sie "[...] [die] Eignung für einen bestimmten Gebrauch [...]" verstehen. Im Rahmen der Studie soll nachgewiesen werden, dass die entwickelte Methode geeignet ist, Fasern in einer TP darzustellen. Geprüft wird also die Methodik der Probenvorbereitung, Faserdarstellung und Materialreinigung.

Im Rahmen der Validierung gibt es verschiedene Validierungsparameter, die geprüft werden kön-

nen. Zu Beginn wird durch den Untersucher festgelegt, welche Parameter im gegebenen Fall notwendig sind, in dieser Studie sind das die Richtigkeit und die Präzision. Die "Richtigkeit ist das Maß der Übereinstimmung zwischen dem ermittelten Wert und einem als richtig angesehenen Wert." Sie trifft eine Aussage über systematische Fehler und ist ein sog. Lageparameter, während die Präzision eine Aussage über zufällige Fehler trifft und einen sog. Streuparameter darstellt (Kromidas und Ermer, 2000).

Für die Bestimmung wurden im Vorfeld Blindproben und Negativproben angefertigt. Um die Blindproben, die im Rahmen der Validierung im Sektionssaal angefertigt wurden, von den Blindproben zu unterscheiden, die zwischen den Versuchen immer wieder zur Kontrolle angefertigt wurden, werden sie im Folgenden mit dem engl. Blanks (B) be-

Bl	ank (B): P	robe mit A	Aqua dest.	aus de	m Sektions	saal	
1	B1		B2			B3	
1	Negativpro	be (N): Tr	achealpro	be ohn	e Faserzusa	tz	
N1 N2				N	3		
wiederfindungsrate (WDF)							
WDF1			WDF2		WDF3		
1.1			2.1		3.1		
1	1.2		2.2		3.2		
1	1.3		2.3		3.3		
1.4 (reine Matrix)		2.4 (	2.4 (reine Matrix)		3.4 (reine Matrix)		
v Präzision (P)							
P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7 (reine Matrix)	

Abbildung 28: Validierungsplan

zeichnet. Auf dieser Grundlage schloss sich die Bestimmung der Wiederfindungsraten und der Präzision an (s. Abb. 28: Flussschema Methodenvalidierung).

Die Fasern wurden in den Kategorien gefärbt und ungefärbt/weiß erfasst. Im Verlauf der Methodenvalidierung wurde zusätzlich die Kategorie der violetten Fasern eingeführt, da dies die Farbe der künstlich zugesetzten Fasern war. Da die zur Ermittlung der Wiederfindungsraten und Präzision genutzten Proben aliquotiert wurden, erfolgte die Erfassung der Fasern in ml/Probenaliquot. Ein Probenaliquot entsprach 1/4 TP bei der WDF und 1/7 TP bei der Präzision. Die Validierung erfolgte mit der endgültigen Methodik.

#### 3.5.1 Blanks und Negativproben

#### Blanks

Für die Bestimmung des "Grundrauschens" an Fasern wurden Blanks entnommen (s. 3.4.1 und Abb. 29). Die "Entnahme" des dest. Wasser erfolgte in Sektionssaal (S), um das Absaugen eines Verstorbenen zu simulieren. Die Bestimmung sollte mind. dreifach (B1-3) erfolgen.

Es wurden fünf Blanks (BA1-5) aus dem Sektionssaal erstellt. Sie mussten wieder verworfen werden, da der Spülprozess optimiert wurde (s. 4.3 Materialreinigung und 4.5.3 Wiederfindungsrate). Nach der Optimierung des Spülprozesses wurden vier neue Blanks (BN1-4) aus dem Sektionssaal angefertigt.



# Negativproben

Unter einer Negativprobe versteht man eine "reine" TP, die keine künstlich beigesetzten Fasern enthält. Durch die Bestimmung der Fasermenge in nicht modifizierten TP lässt

Abbildung 29: Absaugung von dest. Wasser über das Trachealsaugset zur Herstellung eines Blanks in S

sich in einem sehr kleinen Rahmen eine Art Grundbelastung an Fasern in der Trachealflüssigkeit bestimmen. Die Faseranzahl und deren Größenbereich bilden die Grundlage für die WDF und die Präzision. Dort dienen sie als Orientierungsgröße für die Faseraufstockung. Es wurden 3 Negativproben angefertigt (NA1-3), die wieder verworfen wurden, da der Spülprozess optimiert wurde. Hiernach wurden 3 weitere Negativproben erstellt (NN1-3).

# 3.5.2 Wiederfindungsrate und Präzision Wiederfindungsrate (WDF)

Mit der WDF lassen sich Aussagen zur Richtigkeit treffen. "Die Wiederfindung oder Wiederfindungsrate ist das Verhältnis des unter Wiederholungen gemessenen Mittelwerts zum richtigen Wert des Analyten in der Probe" (Kromidas und Ermer, 2000). Die WDF ist unter Idealbedingungen 100%. Entspricht der gemessene Wert 100%, so ist die Selektivität, Robustheit und Richtigkeit nur für diese Probe und Konzentration unter den durchgeführten experimentellen Bedingungen bewiesen. Die Richtigkeit kann durch den Vergleich einer Probe mit einem sog. Referenzstandard, dessen Gehalt an Material bekannt ist, auf mind. drei Konzentrationsniveaus geprüft werden (Kromidas und Ermer, 2000). Da es keine Methode gibt, um Fasern in Trachealflüssigkeit quantitativ nachzuweisen, gibt es auch keine Möglichkeit, die Fasermenge einer TP genau zu kennen. Deshalb wurde eine Referenzlösung erstellt. Die Richtigkeit wird mit einer Referenzlösung anhand von WDF-Experimenten geprüft. Dabei werden die ermittelten Werte (Ist-Werte) mit den Werten der präparierten Lösungen (Soll-Werte) verglichen.

Zur Bestimmung der WDF wurde eine Referenzlösung durch Zusatz von Fasern erstellt, sog. Aufstockungsexperimente, auch "Spiken" genannt (Kromidas und Ermer, 2000). Dafür wurde eine definierte Menge an Fasern in eine TP gegeben. Um sie von bereits in der TP befindlichen Fasern unterscheiden zu können, wurden violett gefärbte Fasern (Farbe 013, 100% Baumwolle, Summer Cotton, Austermann, Schoeller und Stahl) gewählt, da es als unwahrscheinlich erachtet wird, dass diese zufällig in der TP vorkommen. Als Kontrolle wurde die TP vorher aliquotiert und ein reiner Matrixanteil ohne Faserzusatz ausgewertet. Beim Faserzusatz muss beachtet werden, dass die zugesetzten Fasern in einer vergleichbaren Form, wie sie in einer "natürlichen" Probe erwartet würden, vorliegen müssen, z.B. in einer ähnlichen Länge. Die WDF kann auch von der Faserkonzentration abhängig sein, sodass die Konzentration an zugesetzten Fasern in etwa der natürlich vorkommenden Konzentration entsprechen sollte. Hierfür wurde sich an den erhobenen Faserkonzentrationen in den Negativproben orientiert.

Für die Aliquotierung wurden die Proben 1min Vortex-behandelt, 5min ins Ultraschallbad gehalten, eine weitere Minute Vortex-behandelt und mittels Lineal die Anteile am Becher markiert. Anschließend wurde der erste Teil grob in einen sauberen Becher abgegossen und mittels Eppendorf-Pipette (100-1000µm) die Feinaufteilung vollzogen. Die Pipettenspitze wurde mit dest. Wasser gespült. Die Spülflüssigkeit wurde ebenfalls Teil der Probe. Dies entsprach dem Vorgehen bis zum letzten Anteil. Jeweils ein Probenteil wurde repräsentativ ohne Faserzusatz aufbereitet, um auszuschließen, dass in der Probe violette Fasern vorhanden sind. Dieser wird im weiteren Verlauf Matrixanteil genannt. Um zu zeigen, dass auch weiße Fasern gefunden werden können, wurde jeder gespikte Probenteil mit einer festen Konzentration von 20 weißen Fasern versetzt (Farbe 1006, Stopfgarn, 100% Baumwolle, Gütermann GmbH, Gutach-Breisgau, Deutschland). Die Fasern wurden mit einer Schere geschnitten und mittels Präzisionspinzette auf ein HG in einer Petrischale gelegt. Unter dem Mikroskop wurden die einzelnen Fasern auf dem HG gezählt und alle überschüssigen sowie alle durch die Faserbelastung der Umgebung eingebrachten Fasern entfernt. Mittels einer Spritzflasche mit dest. Wasser wurden die abgezählten Fasern in die Probe gespült. Anschließend wurde das Deckglas auf zurückgebliebene Fasern überprüft. Da es je nach Faseranzahl gegebenenfalls schwierig war, die einzelnen Fasern zu zählen und gleichzeitig den Überblick über diese zu behalten, wurde die Faserbeisetzung zum Teil in zwei Schritte aufgeteilt. Vor Beginn der WDF wurden violette (8) und weiße (9) Fasern unter dem Mikroskop zurechtgeschnitten und auf einen 5µm-NNF gelegt. Diese wurden unter dem Mikroskop betrachtet, um Kenntnis über das Erscheinungsbild der Fasern zu erhalten. Dies wurde in einem zweiten Versuch

wiederholt, in welchem der Filter anschließend in den Filterhalter eingebaut und mit 150ml AS bespült wurde. So konnte das Verhalten der Fasern unter Einwirkung von AS beobachtet werden, etwa ob eine Zersetzung/Fragmentierung oder eine Entfärbung der Fasern einsetzte. Die zurechtgeschnittenen violetten Fasern hatten eine durchschnittliche Länge von 2433µm (650-3844µm) und eine Breite von 11-32µm. Die weißen Fasern waren durchschnittlich 1801µm (226-2503µm) lang und hatten eine Breite von 22-26,20µm. Die Versuche der WDF wurden, wie bei der Prüfung mit einem Referenzstandard üblich, in drei Konzentrationsstufen durchgeführt.

Als statistische Maße wurden der Mittelwert, die Standardabweichung (SD), die relative Standardabweichung (RSD) und das Konfidenzintervall bestimmt. In der statistischen Auswertung wurden der Stufe 2 die Werte aus der Präzision hinzugefügt, da sie denselben Soll-Wert besaßen. In Stufe 1 der WDF wurden drei Probenanteile mit 50 violetten und 20 weißen Fasern versetzt. Der vierte Probenanteil fungierte als Matrixkontrolle/Matrixanteil. Nach Optimierung des Spülprozesses wurde diese Stufe wiederholt. In Stufe 2 erfolgte die Beisetzung von 70 violetten und 20 weißen Fasern. In Stufe 3 wurden 90 violette und 20 weiße Fasern beigesetzt.

#### Präzision

"Präzision ist das Maß für die Übereinstimmung unabhängiger Analysenergebnisse untereinander oder einfach ausgedrückt: das Maß für die Streuung von Analysenergebnissen" (Kromidas und Ermer, 2000). Es wurde eine Methodenpräzision unter Wiederholbedingungen bestimmt. "Wiederholbedingungen (DIN 51848, ISO 5725) sind Bedingungen [...] mit demselben Verfahren, an identischen Objekten (selbe Probe), in demselben Labor, durch denselben Bearbeiter und mit derselben Geräteausrüstung", welche durch die Vorbereitung und Auswertung 6 verschiedener Proben ermittelt wird (Kromidas und Ermer, 2000). Die Wiederholversuche konnten nicht an derselben Probe erfolgen, da die Proben nach der Aufbereitung kein zweites Mal verwendet werden können. Daher wurde für jede Wiederholung eine neue Probe verwendet. Nach dem Schema der Wiederfindung wurden die Proben gespikt. Für die Präzision wurden 70 violette und 20 weiße Fasern beigesetzt. Dafür wurde eine TP in 7 Teile (P1-7) aliquotiert. Sechs Probenteile wurden mit Fasern versetzt. Der siebte Teil (P7) diente als Matrixkontrolle. Als statistische Maße wurden der Mittelwert, die SD, die RSD und das Konfidenzintervall bestimmt. Zur Prüfung auf Normalverteilung wurde der Schnelltest nach David angewandt und der Ausreißertest nach Dixon sowie der Trendtest nach Neumann benutzt. In der statistischen Betrachtung wurden zusätzlich zu den 6 Messwerten der Präzision die 3 Messwerte der zweiten WDF-Stufe herangezogen, da sie dieselbe Faserkonzentration aufwiesen (70 violette Fasern).

# 4 Ergebnisse

#### 4.1 Probenvorbereitung: Zentrifugation und Filtrierung

Nach dem Zentrifugieren der TPs war das Sediment schwer pipettierbar. Es enthielt viele organische Bestandteile (Matrix). Unter dem Mikroskop wurden in jeder Phase vier bis sechs Fasern gefunden. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch im zweiten Versuchsdurchlauf festgestellt werden.

# 4.1.1 Filtertypen

Die Filtration erfolgte mit den fünf getesteten Filtertypen (s. Kap. 3.3.1).

#### Glasfaserfilter

Der Glasfaserfilter mit einer Porengröße von 2,7µm ist weiß und zeichnet sich durch eine sehr heterogene Oberfläche mit eigener Faserstruktur aus. Dies stört erheblich bei der Detektion v.a. weißer oder farbloser Fasern (s. Abb. 30 und 31).



Abbildung 30:Glasfaserfilter unter dem Mikroskop; mutmaßlich weiße/farblose Faser in der Bildmitte, darum verteilt einige Partikel

Es konnten beinahe alle beigesetzten Fasern gefunden werden (8-11 von 10 zugesetzten Fasern/ Probe (dest. Wasser und TP). Auch Verunreinigungen (4-13 Fasern/Filter) wurden detektiert. Es wurden 4-18 Partikel/Probe gefunden, die nicht eindeutig als Fasern identifiziert werden konnten. Bei der Filtrierung einer TP verstopfte der Filter.



Abbildung 31: Glasfaserfilter unter dem Mikroskop; eindeutige Faser in der Bildmitte, daneben Partikel



#### Versapor-Membran

Die Versapor-Membran mit einer Porengröße in Teilring-Lichteinstellung

Abbildung 32: Weiße Faser auf Versapor-Membran in Teilring-Lichteinstellung

von 0,45µm ist weiß und zeigte unter dem Mikroskop eine inhomogene, unruhige Oberfläche, auf der sich weiße/farblose Fasern kaum erkennen ließen. Unter der Benutzung einer Teilring-Lichteinstellung konnte eine geringe Verbesserung erzielt werden (s. Abb. 32). Obwohl nur die flüssige Phase der TP benutzt wurde, kam es bei der Filtration zum Verstopfen der Membran. Auch kleine und nicht eindeutig als Fasern zu identifizierende Partikel wurden gefunden. Zudem konnte eine erhebliche Kontamination beobachtet werden.

# Supor-Membran

Die Supor-Membran mit 0,8µm Porengröße ist weiß. In der mikroskopischen Betrachtung wies sie eine sehr homogene und ruhige Oberfläche auf. Dadurch ließen sich weiße/farblose Fasern besser erkennen (s. Abb. 34). Die Darstellung wird zudem durch Verwendung von koaxialem oder seitlichem Licht verbessert. Die Filtrierung der Membran mit der aus der Zentrifugation gewonnenen flüssigen Phase führte nicht zum Verstopfen. Allerdings wurden auch kleine und nicht eindeutig als Fasern zu identifizierende Partikel gefunden (s. Abb 33) und es lag eine erhebliche





Abbildung 33: Partikel mit 14,73µm Länge

Abbildung 34: 265µm-große weiße/farblose Faser

Kontamination vor.

Polycarbonate Track Etched (PTCE) Membran

Die PTCE-Membran hat eine Porengröße von 20µm und erschien unter dem Mikroskop transparent mit unregelmäßig angeordneten Poren, sodass sie zwar keine eigene Faserstruktur aufweist, jedoch unruhig in der Betrachtung wirkt (s. Abb. 36). Zudem zeigten sich große Matrixrückstände auf der Membran, die eine Faserbeurteilung erschwerten (s. Abb. 35).



Abbildung 35: Weiße Fasern mit gelblich beiger Matrixbelastung auf PTCE-Membran



Abbildung 36: Weiße Faser auf PTCE-Membran

Nylon-Netzfilter (NNF)

Die NNF zeigten in der mikroskopischen Betrachtung eine ruhige, homogene Struktur, die sich symmetrisch gitterartig präsentierte. Dadurch waren Faserstrukturen und Faserfarben gut erkennbar. Besonders in Kombination mit koaxialem Licht und einem Polarisationsfilter ließen sich die Fasern gut identifizieren (s. Abb. 37 und 38). Obwohl der Filter nicht verstopfte, bestand bei dem 100µm-NNF das Problem der Matrixbelastung. Kleine und nicht eindeutig als Fasern zu identifizierende Partikel wurden nicht gefunden.







Abbildung 38: Weiße Faser auf 100µm-NNF mit koaxialem Licht und Polarisationsfilter

# 4.1.2 Matrixbelastung

Die Matrixbelastung zeigt sich durch Verstopfen der Filter/Membranen und ist zudem auf den Filtern und der Lochplatte (Porengröße 1mm) des Filterhalters, die den Filtern vorgeschaltet ist, zu finden (s. Abb. 39 und 40). Zur Matrixreduktion wurden in den Versuchsreihen (a)-(f) chemische und physikalische Behandlungen sowie die Vorfiltrierung untersucht.





Abbildung 39: Matrixrückstände auf dem 100µm-NNF

Abbildung 40: Matrixrückstände auf der 20µm-PTCE-Membran

# (a) 100µm-NNF – 20µm-PTCE-Membran – 11µm-NNF – 0,8µm-Supor-Membran

Die Probe konnte ohne viel Druck filtriert werden, nur die Filtration des 20µm-Filters war etwas erschwert. Der 100µm-NNF, die Lochplatte (Porengröße 1mm) des 100µm-NNF und die PTCE-Membran wiesen große Matrixrückstände auf. Dadurch konnten darunterliegende Fasern nicht sicher detektiert werden. Zur Minimierung der Matrixrückstände wurde der 100µm-NNF mit 10ml AS filtriert, was die Detektion der Fasern leicht verbesserte. Anschließend wurde der Filter mit Methanol filtriert, was durch die Gerinnung der Proteine zu einer Verschlechterung der Beurteilbarkeit führte. Die 20µm-Membran wurde mit 50ml AS behandelt, wodurch sich die Detektierbarkeit nur minimal verbesserte. Die Membran wurde weiter mit 10ml HCL behandelt, was zu einer leichten Verbesserung der Beurteilbarkeit führte.

Auf den Filtern wurden einige weiße und blaue Textilfasern gefunden. Während der Probenvorbereitung und Faserdarstellung wurde ein weißer Kittel und schwarze Straßenkleidung getragen. (b)100µm-NNF – 20µm-PTCE-Membran – 11µm-NNF – 5µm-NNF – 0,8-Supor-Membran Da die 0,8µm-Supor-Membran verstopfte, wurde ihr ein 5µm-NNF vorgeschaltet. Dieser ließ sich gut filtrieren. Trotz des 5µm-NNFs verstopfte die 0,8µm-Supor-Membran erneut. Über die anderen Filter konnte leicht filtriert werden. Der 100µm-NNF wies erneut eine hohe Matrixbelastung auf. Daher wurde er nach dem in Abb. 41 dargestellten Schema mit Säure behandelt.

Zur Beurteilung der Faser-Detektion wurde eine Textilfaser betrachtet. Diese war anfangs unter der Matrix schwach erkennbar und wurde im Verlauf der Säurebehandlung deutlicher sichtbar (s. Abbildung 42 und 43). Außerdem wurden die Matrixareale im Allgemeinen transparenter, sodass man die Filterstruktur und damit auch Fasern darunter erkennen konnte.

Auch auf der Lochplatte des 100µm-NNF

20ml <b>HCl</b>	• keine Verbesserung der Matrixbelastung
60ml HCI	•keine Verbesserung der Matrixbelastung
90ml HCI	• keine Verbesserung der Matrixbelastung
100ml AS	• eindeutige Verbesserung der Matrixbelastung

Abbildung 41: Säurebehandlung mit HCl und AS

befanden sich anfangs große Matrixablagerungen, die sich im Verlauf der Säurebehandlung nicht verbesserten.



Abbildung 42: Matrixbelastung auf 100µm-NNF mit blauer Faser vor Säurebehandlung



Abbildung 43: Matrixbelastung auf 100µm-NNF mit derselben blauen Faser wie in Abbildung 42, jedoch nach Säurebehandlung mit AS
# (c) 100µm-NNF – 30µm-NNF – 11µm-NNF – 5µm-NNF – 0,8µm-Supor-Membran 30µm-NNF – 11µm-NNF – 5µm-NNF – 0,8µm-Supor-Membran

Die Probe war leicht zu filtrieren. Lediglich die Filtrierung über den 5µm-NNF war etwas erschwert. Die 0,8µm-Supor-Membran verstopfte. Die Matrixrückstände des 100µm-NNFs wurden



Abbildung 44: Matrixbelastung auf 100µm-NNF; potenzieller Schimmel

mit 100ml AS behandelt. Dies führte nicht zu einer ausreichenden Matrixzersetzung. Allerdings stellte sich aufgrund der auffälligen Symmetrie der Matrix die Frage, ob die Probe verschimmelt sein könnte (s. Abb. 44). Der 100µm-NNF wurde zusätzlich mit 50ml AS behandelt, wodurch die Matrixbelastung noch etwas reduziert werden konnte. Der Filter war zwar insgesamt gut einsehbar, die vermeintlich Schimmel belastete Stelle veränderte sich aber

nicht. Die Stellen mit viel Matrix blieben etwas unübersichtlich. Es erforderte mehr Konzentration die darin enthaltenen weißen/farblosen Fasern zu erkennen. Dies lag an der Heterogenität, der Struktur und der Dicke der Matrix sowie an der Lichtreflexion unter dem Mikroskop. Die Matrixstruktur beinhaltete feine faserähnliche Strukturen, die die Identifizierung weißer/farbloser Fasern weiter erschwerten.

Sowohl der 30µm- als auch der 11µm-NNF hatten durch die hohe Matrixbelastung eine unruhig erscheinende Oberfläche (s. Abb. 45 und 46). Die Faserdetektion wurde hierdurch aber nicht beeinträchtigt.

Als Folge der Nässe der Filter war die mikroskopische Auswertung zudem durch Lichtreflexionen erschwert, welche jedoch durch die Einstellung "Reflexionsminderung" am Mikroskop etwas reduziert werden konnten. Weiße/farblose Fasern waren bei den Filtern mit geringerer Porengröße etwas erschwerter erkennbar.





Abbildung 45: Blaue Fasern auf 30µm-NNF mit Matrixbelastung

Abbildung 46: 284,49μm große weiße Faser auf 11μm-NNF mit Matrixbelastung

Die aufgehobene filtrierte Restflüssigkeit wurde ein zweites Mal filtriert. In ihr waren noch die 100ml AS aus der ersten Filtration enthalten. Auch hierbei verstopfte die 0,8µm-Supor-Membran. Der 30µm-NNF erschien auch nach dem zweiten Durchlauf unruhig durch die Matrixbelastung. Die Lichtreflexion war erneut zu beobachten. Auch der 5µm-Filter erschien etwas unruhig, wodurch es mehr Konzentration erforderte die weißen/farblosen Fasern zu detektieren.

### $(d) 100 \mu m \text{-} NNF - \underline{41 \mu m \text{-} NNF} - 11 \mu m \text{-} NNF - 5 \mu m \text{-} NNF$

## $100 \mu m\text{-}NNF - \underline{30 \mu m\text{-}NNF} - 11 \mu m\text{-}NNF - 5 \mu m\text{-}NNF$

### Filtrierung mit 20ml- statt 10ml-Spritze.

Auch wenn die Filtrierung mit der 20ml-Spritze deutlich schneller als mit der 10ml-Spritze erfolgte, so war der Widerstand während der Filtrierung mit der 20ml-Spritze größer. Der 41µmund 30µm-NNF ließen sich ähnlich gut filtrieren, wobei die Versuchsreihe mit dem 41µm-NNF weniger matrixbelastet war.

Die visuelle Auswertung war zufriedenstellend, aber die Detektion weißer/farbloser Fasern erforderte weiter eine erhöhte Aufmerksamkeit. Die Detektion farbiger Fasern stellte kein Problem dar. Es entstand der Eindruck, dass durch Ausschluss der 0,8µm-Supor-Membran weniger kleine und nicht eindeutig als Fasern zu identifizierende Partikel gefunden wurden.

### (e) 2x 100µm-Filter, 300g ACC vs. 150ml 5mol/l AS

Die Ameisensäure löste fast alle Matrixbestandteile auf. Auf dem Filter waren keine undurchsichtigen Areale mehr sichtbar. Es wurde erneut eine Textilfaser betrachtet, welche anfangs unter der Matrix schwach erkennbar war (s. Abbildung47) und im Verlauf der Säurebehandlung deutlich sichtbar wurde (s. Abbildung 48). Durch das ACC konnte die Matrixbelastung nicht wesentlich verbessert werden (s. Abb. 49 und 50).



Abbildung 47: Faser auf 100µm-NNF vor AS-Behandlung



Abbildung 48: dieselbe Faser wie auf Abbildung 47 auf 100µm-NNF nach AS-Behandlung



Abbildung 49: Matrixbelastung auf 100µm-NNF vor ACC-Behandlung

Abbildung 50: Matrixbelastung auf 100µm-NNF nach ACC-Behandlung

### (f) 20ml-Spritze

In der TP wurden 66Fasern/18ml gefunden Dies umfasste überwiegend weiße und blaue Fasern. Die Filtrierung, insbesondere durch den 5µm-NNF, erfolgte mit erhöhtem Druck.

### 4.2 Faserdarstellung

### 4.2.1 Einbettung

#### (a) *Lichtreflexion*:

In den Versuchsreihen der Matrixbelastung fiel eine Lichtreflexion bei der Mikroskopie der nassen Filter auf. Daher wurden ein feuchter und ein trockener Filter mikroskopisch miteinander verglichen. Dabei fiel auf, dass die Oberfläche des feuchten Filters ruhiger erscheint und dadurch einfacher zu beurteilen ist, jedoch durch die Wärme der Mikroskoplampe zu trocknen beginnt und dadurch eine unruhig erscheinende Oberfläche entsteht (s. Abb. 51).



Es zeigte sich, dass für die Einbettung der Filter die



Abbildung 51: feuchter 5µm-Filter mit teilweise trockenen Stellen

DP zu klein und dünn (0,12-0,16mm) waren. Größere Formate waren jedoch nicht verfügbar. Auch die Kombination aus zwei Objektträgern, zwischen denen der Filter eingebettet wird, war unhandlich, da die Objektträger zu groß und dick waren. Allerdings konnte das Handling durch die Einbettung des Filters zwischen einem Objektträger und einem HG verbessert werden.

(c) *Einbettungsmedium*, *Wiederfindung*, *Aufbringen des HG*:

Die beschriebenen Lufteinschlüsse konnten durch Aufbringen eines Tropfens dest. Wassers auf den Filter mittels Pasteur-Pipette etwas reduziert werden, jedoch bildete sich durch die Wärme der Mikroskoplampe Kondenswasser in den Lufteinschlüssen am HG (s. Abb. 52 und 53), was zu einer Verdeckung der Fasern führen kann.



Abbildung 52: Kondenswasserbildung



Abbildung 53: Übergang vom normal einsichtigen Filter zur Kondenswasserbildung zwischen Filter und HG

Daher wurde auch Glycerin als Einbettungsmedium getestet. Die Einbettung zeigte nach einigen Übungsdurchläufen sehr gute Ergebnisse. Alle Areale konnten gut eingesehen werden.

Im Rahmen der Testungen musste beobachtet werden, dass in den Blindproben Glycerin unter dem HG herausfloss. Ebenso wurden Fasern neben dem Filter gefunden, welche möglicherweise durch zu viel Glycerin heruntergespült wurden (s. SB3 und 4.4.1). Um diese Probleme zu vermeiden, wurde die optimale Glycerinmenge experimentell bestimmt. In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass die Filter durch die Filtrierung leicht verformt werden und damit nicht mehr vollständig plan sind. Dies erschwerte das luftfreie Einbetten der Filter. Um dies zu simulieren wurden die Filter in den Einbettungsversuchen mit dest. Wasser und AS filtriert. In der Methode, wie das HG aufzubringen ist, erwies sich das seitliche Aufbringen im Vergleich zum senkrechten Aufbringen als deutlich vorteilhafter, da weniger Lufteinschlüsse zu verzeichnen waren. Weiter zeigten sich vorerst 2 Tropfen Glycerin auf dem Objektträger und 5 Tropfen Glycerin auf dem Filter als am besten geeignet, dadurch konnten auch leichte Verformungen des Filters besser kompensiert werden.

• 5 Fasern auf Filter nach • 6 Fasern auf Filter nach • 6 Fasern auf Filter nach • 6 Fasern auf Filter nach Einbettung, WDF 50% Bespülen aber vor der Bespülen aber vor der Bespülen aber vor der Einbettung, WDF 75% Einbettung Einbettung • 1 Faser auf dem • 2 Fasern auf dem • 1 Faser auf Filter nach Dichtungsgummi Dichtungsgummi • WDF 100% insgesamt Einbettung, der Rest 1 Faser auf der oberen neben dem Filter, WDF Lochplatte 16,67% • WDF 100% insgesamt • 6 von 6 Fasern auf Filter nach Einbettung, WDF 100% • 6 von 6 Fasern auf Filter nach Einbettung, WDF 100%

(d) Wiederfindung, Glycerinmengenbestimmung und Filterhalterkomponenten:

Abbildung 54: Wiederfindung violetter Fasern nach Einbettung (1: Filter wurde direkt nach Faser-Zusetzung eingebettet. 2-4: Filter nach Zusetzung in den Filterhalter eingebaut, mit dest. Wasser durchgespült und anschließend eingebettet

Die WDF violetter Fasern auf dem Filter nach der Einbettung wurde überprüft, s. Abb. 54. Nach Durchlauf 1 waren nach der Einbettung nur 5 von 10 beigesetzten Fasern zu finden. Dies entspricht einer WDF von 50%. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass in den Zwischenschritten Fasern verloren gehen. Daher wurde in Durchlauf 2 kontrolliert, ob die beigesetzten Fasern nach der Filtrierung noch vorhanden sind. Nach der Filtrierung wurde der Filterhalter geöffnet und der Filter noch in dem Halter einliegend mikroskopiert. Auch hier zeigten sich nur 6 von 8 Fasern auf dem Filter, was einer WDF von 75% entspricht. Daher wurden die anderen Filterhalterkomponenten mikroskopiert. 2 weitere Fasern wurden auf der dem Filter aufliegenden Seite des Dichtungsgummis gefunden. Nach Filtereinbettung konnte von den 6 Fasern nur noch eine Faser auf dem Filter gefunden werden. Die restlichen 5 Fasern wurden neben dem Filter auf dem Objektträger gesichtet. Dies bestätigt mit einer WDF von 16,67% die Annahme, dass durch die Einbettung Fasern von dem Filter heruntergespült werden. Daher wurde in Durchlauf 3 die Einbettung angepasst: es wurde ein größerer Tropfen Glycerin in der Filtermitte und ein kleinerer Tropfen Glycerin am Filterrand, an derjenigen Seite, an der das HG aufgebracht wird, platziert. Auf den Objektträger wurde ebenfalls ein großer Tropfen Glycerin aufgebracht. Im Anschluss wurden alle Filterhalterkomponenten mikroskopiert. Dazu zählten die jeweils beiden Seiten der Lochplatten, die jeweils beiden Seiten des Dichtungsgummis und beide Filterhalterhälften. Hiernach konnten von 8 beigesetzten Fasern nach der Filtrierung 6 Fasern auf dem Filter, 1 Faser auf der dem Filter aufliegenden Seite des Dichtungsgummis und 1 Faser auf der oberen Lochplatte gefunden werden. Dies ergibt eine WDF von 100%. Nach der Einbettung konnten 6 von 6 Fasern auf dem Filter gefunden werden (WDF 100%). Die Anpassungen wurden in Durchlauf 4 wiederholt. Nach der Filtrierung wurden 6 von 8 beigesetzten Fasern auf dem Filter und zwei weitere Fasern auf der dem Filter aufliegenden Seite des Dichtungsgummis gefunden (WDF 100%). Nach der Einbettung konnten 6 von 6 Fasern wiedergefunden werden (WDF 100%).

Da sich Durchlauf 3 und 4 mit einer Gesamt-WDF von 100% als am besten erwiesen haben, wurden diese Einbettungsmodalitäten beibehalten und mit zwei weiteren Durchläufen getestet (s. Abbildung 55). Durch die Anwendung von Luft bei Durchlauf 6 konnte die auf dem Filter befindliche Anzahl von 2 auf 7 Fasern deutlich erhöht werden. In beiden Durchläufen konnte somit schlussendlich eine WDF von 100% erreicht werden.

#### 5: 8 Fasern dem Filter zugesetzt

- 2 Fasern auf Filter
- 2 Fasern auf Dichtungsgummi
- 3 Fasern auf Lochplatte
- 2 Fasern auf Filter nach Einbetten
- WDF 100%

#### 6: 8 Fasern dem Filter zugesetzt + Luft-Applikation

- 7 Fasern auf Filter
- 1 Faser auf Lochplatte
- •7 Fasern auf Filter nach Einbetten
- WDF 100%

Abbildung 55: Wiederfindung violetter Fasern nach Einbettung (6: Luft wurde über den Filter gedrückt)(e) Blindprobe und Filterhalterkomponenten:

Mit den bisherigen Erkenntnissen wurde eine Blindprobe angefertigt. Dafür wurden die Filterhalterkomponenten und damit auch beidseitig die Lochplatten mikroskopiert, sodass diese zur Kontaminationsvermeidung nicht abgedeckt werden konnten.

Es ist zu beachten, dass die Lochplatten eine glatte und eine gerillte Oberfläche besitzen. Die Identifikation weißer und farbloser Fasern vor allem auf der gerillten Seite der Lochplatten sowie auf den Filterhalterhälften war erschwert. Diese Problematik wurde aufgrund etlicher Kratzer im

Plastik gesteigert (s. Abb. 56).

Zur Vermeidung der Mikroskopie der Filterhalterkomponenten wurde die Beobachtung des Lufteffekts aus Punkt d aufgegriffen. Dafür wurden Druckluftsprays bestellt. Für die Verbindung des Druckluftsprays mit den Filterhaltern wurde ein Adapter in der Laborwerkstatt angefertigt. Zusätzlich sollten auf Grund der komplizierten mikroskopischen Auswertung die Fasern auf den Lochplatten isoliert und eingebettet werden.



Abbildung 56: Weiße Faser (grüner Pfeil) und Kratzer (roter Pfeil) auf gerillter Seite der Lochplatte

### (f) Faserdetektion auf Lochplatte:

Für die Detektion der Fasern auf der Lochplatte sollte ein "Abklatsch" der Platte, im Sinne eines Negativbildes, angefertigt werden. Dafür wurden verschiedene Klebebänder getestet. Dabei zeigte sich, dass das doppelseitige KB am besten geeignet war, da es eine weiße und homogene, ruhige Oberfläche besaß. Vor allem in Kombination mit seitlichem Licht konnten selbst weiße oder farblose Fasern gut erkannt werden. Das KB wurde zurechtgeschnitten und auf einen Objektträger geklebt. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde ein Deckplättchen aufgebracht. Es wurde gezeigt, dass 5 von 5 auf die Lochplatte gesetzte violette Fasern zwischen KB und Deckplättchen wiedergefunden werden konnten (s. Abb. 57). Zusätzlich musste die Reinigung der Lochplatten von Kleberückständen bedacht werden (s. dazu Materialreinigung).



Abbildung 57: violette Fasern zwischen Klebeband und Deckplättchen

Allgemein konnte beobachtet werden, dass sich auf der zum Filter zeigenden Lochplattenseite mehr Fasern absetzten. Daher sollte die glatte Seite der Lochplatte zum Filter zeigend in den Filterhalter eingebaut werden, da die glatte Seite vermutlich besser auf das KB abgeklatscht werden kann.

### (g) Druckluft:

Die Druckluftmenge wurde durch Faserwiederfindung bestimmt (s. Ergebnisse in Tab. 2). Die untere Lochplatte und die untere Filterhalterhälfte wurden zur Kontrolle mit mikroskopiert.

Anzahl an beigesetzten	Anzahl an Hüben	Gefund	ene Fasera	Fehlende Faseranzahl		
Fasern	Druckluft	Filter	Gummi	KB	Filterhalter	
10	10	8	2	0	0	0
	3	1	8	0	0	1
	5	6	4	0	0	0
	3	4	6	0	0	0
	8	7	4	0	0	0
12	10	7	5	0	0	0

Tabelle 2: Faserwiederfindung nach Druckluftbehandlung.

KB: Abklatsch der oberen Lochplatte auf Klebeband (KB). "Filterhalter" bezieht sich auf die obere Filterhalterhälfte.

Bei der Behandlung mit 10 Hüben Druckluft war eine kreisförmige Anordnung der Fasern am Filterrand zu beobachten. Die Fasern ragten teils über den Filterrand hinaus. Auf dem KB und der oberen Filterhalterhälfte sowie auf der unteren Filterhalterhälfte und der unteren Lochplatte wurden keine Fasern gefunden. Es wurde sich für 8 Hübe entschieden (s. 5.3.1).

(h) *Wiederfindung*:

Mit diesen Erkenntnissen wurde eine WDF mit 10 blauen und 10 weißen Fasern angefertigt (s. Tab. 3).

Porengröße Fi	lterhalter in	100			41			11			5		
Faserfarbe		Blau	Weiß	Andere	Blau	Weiß	Andere	Blau	Weiß	Andere	Blau	Weiß	Andere
Faseranzahl	Halter	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Filter	1	21	5	1	3	26	2	0	0	0	>100	>100
	Gummi	0	4	0	0	2	7	0	1	3	0	29	10
	KB I	1	1	0	1	1	0	0	3	0	0	4	1
	KB II	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Gesamt	5	26	5	2	6	33	2	4	3	0	>133	>111
							Faseranzahl						
Blau							9						
Weiß						>169							
Andere						>152							
Gesamt						>330							
Nicht beigeset:	zt						>310						

Tabelle 3: Wiederfindung nach Beisetzung 10 blauer und 10 weißer Fasern.

KB I: Abklatsch der oberen Seite der oberen Lochplatte, KB II: Abklatsch der unteren Seite der oberen Lochplatte

Es wurden 9 von 10 blauen Fasern wiedergefunden, davon 1 Faser auf dem KB der unteren Lochplattenseite und 2 Fasern auf dem oberen Filterhalter. Dies bestätigt die Notwendigkeit die Filterhalterkomponenten zu mikroskopieren. Die untere Lochplatte und die untere Filterhalterhälfte wurden zur Kontrolle mitmikroskopiert. Da die Mehrzahl der Fasern auf dem Filter gefunden wurde, scheint die Behandlung mit 8 Hüben Druckluft die adäquate Maßnahme darzustellen. Da der Filterhalter nicht abgedeckt werden kann, sollte er zur Vermeidung von Kontamination als erstes mikroskopiert werden. Auf der unteren Lochplatte und der unteren Filterhalterhälfte wurden in den letzten Versuchen keine Faserablagerungen beobachtet. Folglich konnte in den weiteren Versuchen von deren Mikroskopie abgesehen werden. Zusätzlich lag eine erhebliche Faserkontamination vor (>310 nicht beigesetzte Fasern).

### 4.2.2 Mikroskopie

Die größte Herausforderung der Mikroskopie war die Darstellung weißer und farbloser Fasern. Die Fasern waren in der Auflicht- besser als in der Durchlichtmikroskopie und in der Dunkelfeldbesser als in der Hellfeldmikroskopie erkennbar. Durch die Dunkelfeldmikroskopie waren vor allem weiße und farblose Fasern durch den stärkeren Kontrast besser erkennbar.

Es wurden verschiedene Lichteinstellungen, wie Ringlicht, koaxiales Licht, teilweise koaxiales Licht und seitliches Licht getestet. Zudem wurden verschiedene Einstellungen am Mikroskop zur Verbesserung der Bildqualität getestet: Anti-Reflexion, Reflexionsoptimierung, HDR (High Dynamic Range) -Funktion und hochauflösendes HDR. Keine der Einstellungen zur Optimierung der Bildqualität verbesserte die Erkennbarkeit der Fasern. Durch zusätzliche Anwendung eines Polarisationsfilters konnten vor allem weiße/farblose Fasern besser detektiert werden. Auch ein K20-Adapter, bei dem das Licht aus einem flachen Winkel von der Seite kommt und der für Dunkelfeld-Mikroskopie gedacht ist, brachte zunächst keine Verbesserung. Erst in Kombination mit Durchlicht und koaxialem Licht brachte der K20-Adapter ein einigermaßen annehmbares Ergebnis. Auch eine Lochblende wurde statt eines Diffusors in Kombination mit einem Polarisationsfilter getestet, das führte jedoch zu einer schlechteren Faserdarstellung. Das koaxiale Licht in Kombination mit einem Polarisationsfilter unter Auflicht wurde letztendlich als am besten geeignet für die visuelle Auswertung der Filter und des Dichtungsgummis befunden. Für die Mikroskopie des KBs eignete sich am besten seitliches Licht und für den Filterhalter Ringlicht. Der Filterhalter wurde in 20facher, der Filter in 50-100facher, der Gummi in 100facher und die Klebebänder in 30facher Vergrößerung betrachtet. Für die Faserübersicht sind kleinere Vergrößerungen und für die Faserdetektion größere Vergrößerungen besser geeignet. Vor Versuchsbeginn wurde eine Übersichtsaufnahme des Filters mittels Panorama-Funktion erstellt. Jede gefundene Faser wurde zudem im Navigationsbereich mittels Koordinaten erfasst. So konnte nachvollzogen werden, ob eine Faser bereits gezählt wurde und bei faserreichen Proben eine Doppelzählung verhindert werden.

### 4.3 Materialreinigung

Zu Beginn der Methodenentwicklung wurden zum Spülen der Filterhalter Laborbürsten benutzt. Allerdings hinterließen diese vor allem in den Lochplatten braune Rückstände, sodass im weiteren Verlauf keine Materialien wie Bürsten oder Schwämme benutzt wurden. Die Anwendung von Essigsäureethylester und Aceton verursachte mikroskopisch milchige Trübungen des Filterhalters. Bei der Benutzung von Ethanol wurde keine Materialveränderung beobachtet, sodass es als materialschonende und geeignete Reinigungssubstanz bewertet wurde.

Nachdem in der Blindprobe nach Einbettungsoptimierung eine große Faserkontamination und in den ersten Versuchen der WDF eine bedeutende Faserverschleppung beobachtet werden konnte, wurde der Spülprozess angepasst. Dieser sah neben den in der Methodik bereits beschriebenen Spül- und Reinlichkeitsmaßnahmen folgendermaßen aus:

- Die Filterhalter, deren Kleberückstände mit Ethanol bereits entfernt waren, wurden auseinandergebaut und für 15min mit AS-/dest. Wasser - Gemisch im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss wurden die Komponenten mehrfach mit Spülmittel und Wasser gespült, danach erneut unter fließendem Wasser und der Filterhalter nach und nach unter fließendem Wasser zusammengebaut. Die vollständigen Filterhalter wurden mit einer Luer-Lock-Spritze 20-mal mit dest. Wasser vor- und rückwärts sowie mit frischem dest. Wasser 5-mal vorwärts gespült.



Abbildung 58: Ineinander gesteckte Filterhalter



Abbildung 59: Mit Alufolie abgedeckte Filterhalter mit Filter

- Die Filterhalter wurden wieder auseinander gebaut und mit dest. Wasser für 5min im Ultraschallbad behandelt. Hiernach wurden sie unter fließendem Wasser einzeln gespült und zusammengebaut. Im Anschluss wurden sie erneut mit einer Luer-Lock-Spritze und dest. Wasser 20mal vor- und rückwärts gespült, sowie mit frischem dest. Wasser 5-mal vorwärts gespült. Danach galten die Filterhalter als sauber und konnten erneut mit Filtern belegt werden. Die fertigen Filterhalter wurden ineinandergesteckt, in einem Becherglas mit Alufolie abgedeckt und im geschlossenen Abzug bis zur nächsten Aufbereitung aufbewahrt (s. Abb. 58 und 59).

### 4.4 Faserkontamination

Die Antikontaminationsmaßnahmen sind in 3.4 dargestellt.

### 4.4.1 Blindproben

#### SB: Blindproben aus dem Sektionssaal während der Einbettungsversuche

SB1: Auf dem 41µm-NNF wurden unzählbar viele Fasern gefunden. Auf dem Filter sind nur bis zu 100 Fasern auswertbar (s. 5.2.2 Matrixbelastung). Daher wurde die Angabe >100 verwendet. Die Einbettung mit Glycerin verlief problemlos. Ergebnisse s. Tab. 4.

Tabelle 4: Blindprobe SB1 aus Sektionssaal

Porengröße in µm	100	41	11	5	Gesamt
Faseranzahl	22	>100	32	5	>159

SB2: Die Blindprobe ließ sich gut mit der 20ml-Spritze filtrieren und wies 31 Fasern/P auf.

SB3: Es wurden 25 Fasern/P gefunden. Es konnte beobachtet werden, dass Glycerin unter dem Hämatozytenglas hervortrat.

SB4: Es wurden 40 Fasern/P gefunden. Auch hier konnte beobachtet werden wie Glycerin unter dem Hämatozytenglas hervortrat.

SB5: Die Einbettung in der finalen Version verlief sehr gut. Es wurden 72 Fasern/P gefunden.

*LB: Blindproben aus dem Labor während Bestimmung der Wiederfindungsrate und Präzision* Nach der ersten Stufe der WDF, bevor der Spülprozess final optimiert wurde ("WDF 1.1-1.4 alt"), zeigte die Blindprobe eine Faseranzahl von 79 Fasern/P. Die Ergebnisse der Blindproben, die mit der finalen Spültechnik während der WDF und Präzision angefertigt wurden, sind in Tabelle 5 zusammengestellt, sie bewegten sich zwischen 6 und 19 Fasern/P. Das ergibt einen Mittelwert von 12,9 Fasern/P. In LB2 wurde eine violette Faser gefunden.

Tabelle 5: Blindproben aus Labor mit endgültiger Methodik

		Faseranzahl			
Blindprobe	Faserfarbe	Violett	Weiß	Andere	Gesamt
1		0	11	6	17
2		1	8	6	15
3		0	3	3	6
4		0	6	2	8
5		0	14	0	14
6		0	10	1	11
7		0	6	7	13
8		0	17	2	19

### 4.4.2 Environmental Monitoring

Als zusätzliche Information wurde die Frequenz der Raumreinigung erhoben, s. Abb. 60.



Abbildung 60: Frequenz und Intensität der Raumreinigung

### Aktivproben

In Ch1, dem Laborzimmer mit dem Abzug, wurde über 24h die geringste Anzahl an Fasern aus der angesaugten Luft filtriert (s. Tab. 6). Die Mehrheit der Fasern war weiß/farblos und lag im Größenbereich 50µm-2,2mm. Ch2, der Raum mit dem Mikroskop, sowie S, der Sektionssaal,

hatten eine so hohe Faserbelastung, dass sie nicht mehr auszählbar waren. Jedoch war die Faserbelastung im S vergleichsweise geringer.



Abbildung 61: S, Fasern und Partikel auf 5µm-NNF



Abbildung 62: Ch2, Fasern und Partikel auf Filterhalter unter Ringlicht

In Ch2 wurden vor allem weiße/farblose, schwarze, blaue und graue Fasern gefunden. Neben deutlich zu erkennenden Fasern fanden sich auch viele Partikel (s. Abb. 61 und 62), sodass eine untere Erfassungsgrenze von 20µm festgelegt wurde. Darunter wurden Partikel nicht mehr als Fasern gezählt, da sie nicht sicher Fasern zugeordnet werden konnten. Im S wurden vor allem schwarze, braune und weiße, aber auch violette Fasern (F) gefunden (Ch1: 3F, Ch2: 5F, S:1F).

Tabelle	6:	Aktivproben
---------	----	-------------

Räumlichkeiten	Faseranzahl			Faserfarben	
	Filterhal-	Fil-	Ge-		
	ter	ter	samt		
Ch1 (Laborzimmer)	89	30	119	v.a. weiß; etwas schwarz, violett (3), orange, blau	
Ch2 (Mikroskopier-	>100	>50	>150	v.a. weiß, schwarz, blau, grau; etwas grün, violett (5),	
zimmer)				rot, braun	
S (Sektionssaal)	37	>100	>137	v.a. schwarz, braun, weiß, 1 violett, etwas grün	

### Passivproben

Die Ergebnisse sind in Abb. 63 dargestellt. Auf dem Filter des Fensterbretts in Ch2 waren sehr viele Farbpartikel zu sehen, diese ähnelten den Partikeln auf dem Filter der Vakuumpumpe aus Ch2.



Abbildung 63: Vergleich Passivproben. Ch1: Spülbeckenrand (SR), Abzug (A), Arbeitsplatte (AP), Fensterbrett (F); Ch2: Spülbeckenrand (SR), Mikroskopiertisch (MT), Schreibtisch (S), Fensterbank (F); S: Spülbeckenrand (SR), Fliesenregal (M), Arbeitsplatte (AP), Sektionstisch (ST)

### 4.5 Validierung



Für die Methodenqualität wurden in Anlehnung an Kromidas und Ermer (2000) mehrere Aspekte beurteilt. Die Anforderungen für die Faktoren Mensch, Maschine und Methode (Qualifikation, Kalibrierung, Eignung) waren in dieser Studie kontrolliert, ihr Einfluss daher vernachlässigbar. Als relevante Einflussfaktoren erwiesen sich das Material (durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Matrix und deren unbekannte Menge an bereits vorhandenen Fasern) und

Abbildung 64: Weiße und violette Faser auf 5µm-NNF nach AS-Behandlung, Ringlicht

das Milieu (durch mögliche Kontamination mit Umgebungsfasern). Das Labor wird nicht ausschließlich für die Untersuchung von Fasern genutzt, daher gibt es hier viele, das Milieu beeinflussende Faktoren, die nicht ausgeschaltet oder konstant gehalten werden können, u.a. der Gebrauch weißer Laborkittel, Handwerker, die im Labor Arbeiten verrichten, das Vorhandensein von Teppichböden. Zudem besteht von den anderen Laboranten keine Anforderung an Faserarmut im Labor, sodass ihrerseits keine Maßnahmen zur Faserreduzierung getroffen werden. In der Validierungsvorbereitung zeigte sich, dass sich die Fasern durch die Säurebehandlung mit AS nicht entfärben ließen. Auch eine Fragmentierung konnte nicht beobachtet werden. Die violetten Fasern ließen sich gut wiederfinden (s. Abb. 64), sie noch kleiner zu schneiden war nicht möglich. Zur Detektion der weißen Fasern musste man achtsam sein, ein Polarisationsfilter vereinfachte dies deutlich.

### 4.5.1 Blanks

Anfertigung vor Bearbeitung des Spülprozesses ("Blanks alt"): BA1-5, s. Tab. 7

Tabelle 7: Blanks alt

Blank alt (BA)	1	2	3	4	5
Faseranzahl	24	29	23	41	46

BA5 zeigte sich mit auffällig vielen Fasern, welche morphologisch Bastfaser-typische Merkmale aufwiesen. Die Frage nach deren Ursprung konnte nicht beantwortet werden.

Wiederholung nach Präzision mit finaler Spültechnik ("Blanks neu"): BN1-4, s. Tab. 8

Tabelle 8: Blanks neu

Blank neu (BN)	1	2	3	4
Faseranzahl	19	16	13	23

In den Blanks nach terminaler Spülprozessanpassung fanden sich Faserzahlen mit einem Mittelwert von 17,8 Fasern/P als Korrelat der Fremdfaserbelastung. Insgesamt waren etwa 80% der gefundenen Fasern weiß/farblos und 20% "anderer" Farbe. Durchschnittlich wurde die Mehrzahl der gefundenen Fasern auf dem 100µm- und 41µm-NNF gefunden (6,25 Fasern auf dem 100µm-NNF, 8,5 Fasern auf dem 41µm-NNF und jeweils 1,5 Fasern auf dem 11µm- und 5µm-NNF).

## 4.5.2 Negativproben

Anfertigung vor Bearbeitung des Spülprozesses ("Negativproben alt"): NA1-3, s. Tab. 9

Tabelle 9: Negativproben alt

Negativproben alt (NA)	1	2	3
Faseranzahl/ml	55/16ml	78/19ml	95/18ml

NA1 ließ sich gut und ohne großen Widerstand filtrieren. Die 11µm- und 5µm-NNF waren vergleichsweise etwas schwerer zu filtrieren. NA2 wies eine große Anhäufung organischer Reste auf. Diese lag der Außenseite der oberen Lochplatte und dem zugehörigen Filter (100µm) auf. Die Anhäufung war vor allem auf dem Filter gut einsehbar und die Fasern waren gut erkennbar. Die 11µm- und 5µm-Filter waren gut, aber etwas schwerer zu filtrieren. Auch bei NA3 waren der 11µm- und 5µm-NNF schwer zu filtrieren. Alle Filter waren gut auswertbar.

Wiederholung nach Präzision mit finaler Spültechnik ("Negativproben neu"): NN1-3, s. Tab. 10 Tabelle 10: Negativprobe neu

Negativproben neu (NN)	1	2	3
Faseranzahl	94/16ml	45/15ml	137/20ml

## 4.5.3 Wiederfindungsrate

Die WDF wird in drei Konzentrations-Stufen bestimmt. In Stufe 1 werden der Probe etwa 80%, in Stufe 2 100% und in Stufe 3 120% des Soll-Wertes zugesetzt. Der Wert "100%" orientiert sich am Mittelwert der (alten) Negativproben, sodass bei einem Mittelwert von 76 Fasern/P (NA), 70 Fasern als "100%iger" Wert der Stufe 2 gewählt wurden. Für die Stufen 1 bzw. 3 wurden den Proben 50 bzw. 90 Fasern zugesetzt. Damit liegt die Stufe 1 mit 50 Fasern bei 71% und die Stufe 3 mit 90 Fasern bei 128% des Soll-Wertes.

Tabelle 11: WDF Stufe 1 alt, reiner Matrixanteil ohne Faserzusatz in grau markiert.

		Faseranzahl/7ml				
Faserfar	·be	Violett	Weiß	Andere	Gesamt	Nicht-beigesetzt
WDF-	1.1	42	74	8	124	62
Stufe 1	1.2	45	102	13	160	95
	1.3	47	69	10	126	59
	1.4	0	>258	7	>265	>265

Die Ergebnisse der ersten WDF-Stufe wurden in Tabelle 1 zusammengetragen. Bereits während der Negativproben entstand der Verdacht eines Fasertrends, der sich während der ersten WDF-Stufe erhärtete. Dafür wurden die Faseranzahlen nach Zeitpunkt der Anfertigung in Tab. 12 chronologisch zusammengetragen und in Abb. 65 dargestellt.

Tabelle 12: Übersicht Trend

Negativprobe	Faseranzahl absolut
1	55
2	78
3	95
Blindprobe Sektionssaal	
4	41



### Abbildung 65: Fasertrend

Durch die Faserverschleppung musste der Materialaufbereitungsprozess optimiert werden. Danach wurde die Bestimmung der Wiederfindungsrate mit Stufe 2 neu begonnen. Die Ergebnisse der WDF-Stufen 1-3 sind in Tabelle 3 zusammengefasst. In der Auswertung wurden zu den Werten der Stufe 2 die Werte der Präzision genommen, da beide einen Soll-Wert von 70 Fasern hatten. Die mittlere Gesamtwiederfindungsrate über alle drei Wiederfindungsstufen beträgt 89,44%.

Tabelle 13: Auswertung	Wiederfindungsrate	der violetten Fasern
------------------------	--------------------	----------------------

Stufen		1	2	3
Soll		50 (71%)	70 (100%)	90 (128%)
Ist	1	39 (78%)	71 (101%)	79 (88%)
	2	47 (94%)	70 (100%)	83 (92%)
	3	42 (84%)	65 (93%)	84 (93%)
	4		63 (90%)	
	5		59 (84%)	
	6		70 (100%)	
	7		56 (80%)	
	8		62 (89%)	
	9		64 (91%)	
Mittelwert		42,67 (85,33)	64,44 (92%)	82 (91%)
SD		4,04 (8,08%)	5,17 (7,35%)	2,65 (2,65%)
RSD		9,47 (9,47 %)	8,03 (7,99%)	3,23 (2,91%)
95% Konfindenzintervall mit α=0,05		4,57 (9,15%)	3,38 (4,8%)	2,99 (2,99%)
	untere Grenze	38,09 (76,19%)	61,06 (87,2%)	79,01 (88,01%)
	obere Grenze	47,24 (94,48%)	67,83 (96,8%)	84,99 (93,99%)

### 4.5.4 Präzision

Der 11µm- und 5µm-NNF waren vergleichsweise schwerer zu filtrieren. In dem zweiten Filtrationsdurchlauf mit AS war die Filtration wieder leicht durchführbar. P1, P4, P6: Auf der oberen Lochplatte des 100µm-NNF war eine große, verdichtete, muköse und weiße Matrixanhäufung, die nicht an dem KB haften blieb, sodass sie auf der Lochplatte mikroskopiert wurde. Außerdem war bei P6 auf dem oberen Filterhalter auch eine größere Matrixanhäufung zu finden. Zum Vergleich wurde die Anhäufung nach der Mikroskopie auf der Lochplatte mittels Pinzette auf das KB gebracht und ein weiteres Mal mikroskopiert. Die Anhäufung konnte am besten mit koaxialem Licht mikroskopiert werden. Die Lochplatte wurde hiernach zur Kontrolle ein weiteres Mal mikroskopiert, um unter der Anhäufung eventuell zurückgebliebene Fasern zu erfassen. Die Ergebnisse der Präzision sind in Tabelle4 zusammengefasst.

Faseranzahl/12ml						
Faserfarbe		Violett	Weiß	Andere	Gesamt	Nicht-beigesetzt
Präzision	1	63	73	1	137	54
	2	59	74	2	135	56
	3	70	59	5	134	44
	4	56	35	2	93	17
	5	62	44	5	111	27
	6	64	131	2	197	113
	7	2	70	6	78	78

Tabelle 14: Faseranzahl Präzision (P1-P7), reiner Matrixanteil ist grau markiert.

Die Anhäufung war gut zu mikroskopieren und beinhaltete bei P1 9 violette und 9 weiße Fasern, bei P4 13 violette, 3 weiße und 2 andere Fasern und bei P6 5 violette und 3 weiße Fasern. Besonders die violetten Fasern waren auf Grund ihrer Farbe gut zu erkennen. Die weißen Fasern waren etwas schwerer zu detektieren. Dies lag an dem geringen Farbkontrast und an der Matrixstruktur, die einzelne faserähnliche Strukturen besaß. Auf dem 11µm-NNF war relativ viel Matrixbelastung, die jedoch gut einsehbar war.

Die Standardabweichung s(x) und die relative Standardabweichung (RSD) stellen das Präzisionsmaß dar (Kromidas und Ermer, 2000): "Wenn [...] der Standardabweichung eine Wahrscheinlichkeit zugeordnet werden soll, so muss von einer Normalverteilung der Werte ausgegangen werden können." Die Normalverteilung wurde mit dem Schnelltest nach David überprüft (s. Abb. 66), der für wenige Messwerte (n<10) gut geeignet ist (Kromidas und Ermer, 2000). Die Normalverteilung der Messwerte kann auf einem Signifikanzniveau von 1% (Sicherheit 99%) angenommen werden. Mit dem Dixon-Test sollte geklärt werden, ob innerhalb der Messwertreihe ein Ausreißer vorliegt. Ein Ausreißer wäre durch zwei neu erstellte Werte ersetzt worden (Kromidas und Ermer, 2000). Auf einem Signifikanzniveau von 1% und 5% wurde festgestellt, dass kein Ausreißer vorliegt. Zur Frage eines Trends in den Messwerten wurde, Kromidas und Ermer (2000) folgend, der Trendtest nach Neumann angewendet. Auf einem Signifikanzniveau von 5% liegt kein Trend in der Messwertreihe vor.



Abbildung 66: Nachbildung des Schemas zur Beurteilung einer Messwertreihe nach Kromidas and Ermer (2000)

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Messwerte der violetten Fasern normalverteilt sind und die relative Standardabweichung 8,03% beträgt. Ein Trend oder Ausreißer ist nicht erkennbar. Durchschnittlich wurden 64,44 von 70 beigesetzen violetten Fasern gefunden Dies entspricht einer WDF von 92,06%. Das 95%-Konfidenzintervall liegt zwischen 61,06 und 67,83 Fasern, bzw. zwischen 87,23% und 96,89%.

### 5 Diskussion

### 5.1 Probengewinnung

Während der Probengewinnung durch die Tracheallavage zeigte sich, dass der Absaugkatheter auf Grund seiner Flexibilität nicht immer in die Trachea eingeführt werden konnte. Daher war die Intubation als Führungshilfe für den Katheter ein unerlässlicher Schritt. Im Laufe der Obduktionen konnte keine Verletzung von Gewebe, etwa dem Kehlkopf, beobachtet werden. Der Katheter wurde so weit wie möglich eingeführt und final unter Absaugung herausgezogen. Eine sichere Beurteilung der Positionshöhe des Katheters in den Atemwegen war nicht möglich. Bei Absaugen der Flüssigkeit gab es Fälle, in denen weniger Flüssigkeit abgesaugt werden konnte, als durch Spülung eingebracht worden war. Dies lässt die Vermutung zu, dass Flüssigkeit in tiefer gelegene Lungenabschnitte floss und somit nicht mehr durch den Absaugkatheter erreichbar war. Bei bronchoalveolären Lavagen lebender Personen werden Rückgewinnungsraten von 40-70% der eingebrachten Flüssigkeit beschrieben (Gillissen, 2020). Weniger könne im Allgemeinen bei Rauchern und z.B. bei Lungenemphysem zurückgewonnen werden.

Des Weiteren fiel in manchen Fällen auf, dass bereits in der Mundhöhle viel Sekret vorhanden war, welches teilweise bei Drehung des Kopfes und durch den Transport des Körpers herausfloss. In diesen Fällen hätte ev. sowohl ein Materialverlust als auch eine Fremdfaserkontamination stattfinden können. Der Verlust und die Gewinnung der Fasern aus der Trachea könnte Teil zukünftiger Forschung sein, z.B. in Form von Wiederfindungsversuchen - oder gar einer Validierung - durch Simulation einer Tracheallavage mit zuvor beigesetzen Fasern in einem Modell.

### 5.2 Probenvorbereitung

Die Probengewinnung wurde während der ersten Versuche optimiert. Die ersten erfolgten noch ohne Spülung des Katheters, so dass in den ersten Proben ein Faserverlust aufgetreten sein kann. Bei Aufbewahrung von Proben im Kühlschrank konnte bei einigen Proben eine vermeintliche Schimmelbildung beobachtet werden. Bei makroskopisch eindeutigem Schimmelbefund wurden die Proben entsorgt. Daraufhin wurden alle Proben vorsorglich eingefroren und nur noch kurz vor Benutzung in den Kühlschrank verlagert.

Erfahrungsberichten zufolge geschieht die Probenvorbereitung von in Flüssigkeit befindlichen Fasern in der forensischen Untersuchung durch das Ausstreichen der Flüssigkeit auf einer großen Fläche. Nach der Trocknung werden die Fasern unter dem Mikroskop betrachtet. Dieses Vorgehen findet sich z.B. bei Baeza-Martínez et al. (2022). In ihrer Studie trockneten sie die Proben (Bronchoalevolärlavageflüssigkeit lebender Personen à 100ml) in Petrischalen bei 60°C im Ofen. In unserer Studie wäre das kein geeigneter Ansatz gewesen, weil die Flüssigkeitsmenge der Tracheallavage groß sein kann und sich in ihrer Zusammensetzung maßgeblich von in der forensischen Faseranalyse eingesetzten Flüssigkeiten unterscheidet. Die Spülflüssigkeit von BaezaMartínez et al. (2022), bestehend aus 9% NaCl, war mit 100ml größer als die unserer Tracheallavage mit 5-84ml. Im Gegensatz zu unserer Probenflüssigkeit besaß sie jedoch eine geringere Belastung mit organischem Material, die keiner weiteren Behandlung im Sinne eines Aufschlussverfahrens bedurfte. Die höhere Belastung durch organisches Material in unserer Untersuchung dürfte Folge der postmortalen Veränderung sein. In manchen Fällen hatte sich die Trachealflüssigkeit durch verschiedene pathologische Prozesse (z.B. Blut oder Schleimbildung) verändert oder sich Leichenflüssigkeit in der Trachea oder der Mundhöhle gesammelt. Der Vorteil des Trocknens ist die fehlende Notwendigkeit des Filterns und die damit einhergehende Verringerung von Arbeitsschritten. Allerdings dauert das Trocknen auf natürlichem Wege sehr lange, es benötigt eine große Fläche, die quantitativ schwer auszuwerten ist und es birgt die Gefahr der Faserkontamination durch Umgebungsfasern, wobei bei der natürlichen Trocknung die Expositionsdauer und beim Ofen die Exposition durch innere Luftzirkulation entscheidend sind. Ferner können Matrixanteile die Beurteilbarkeit der Fasern verschlechtern. Eine daraus folgende Behandlung mit Säure produziert weitere Flüssigkeit und zögert den Trocknungsprozess somit weiter hinaus.

### 5.2.1 Zentrifugation

In beiden Versuchsdurchläufen der Zentrifugation wurden Fasern nicht nur im Sediment, sondern auch in den flüssigen Phasen gefunden. Somit kann keine quantitative Aussage über Fasern im Sediment getroffen werden. Damit wurde der Zentrifugationsansatz verworfen.

Mögliche Erklärungen für das unvollständige Absetzen der Fasern im Sediment liefern Klasmeier und Wissing (2016): Ein das Separationsverhalten der Fasern beeinflussender Faktor ist die Dichte. Verschiedene Fasern haben unterschiedliche Dichtewerte und daher ein unterschiedliches Absenkeverhalten. Eine weitere Rolle spielt auch die Flüssigkeit, in der die Fasern sich befinden, und ihre spezifischen Dichteeigenschaften. Die Autoren beschreiben, dass sich bei der Separation mit gesättigter Kochsalzlösung größere Faserteile auf Grund ihrer Dichte trennen lassen, kleinere Faserstücke jedoch keine dichtespezifische Absenkung aufweisen. Vielmehr berichten sie, dass diese an der Substanzoberfläche und der Glaswand haften bleiben. Sie erklären das durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit und der Adhäsion an der Gefäßwand und kommen zu dem Schluss, dass eine einfache Trennung der Fasern auf Grund der Dichte nicht möglich sei.

In unserer Studie kommt hinzu, dass die Dichte des verwendeten Reagenzes unbekannt ist, weil die Zusammensetzung des Trachealsekrets, auch abhängig von Erkrankungen, unterschiedlich ist (s. Kap. 1). Außerdem könnte z.B. muköser zäher Schleim ebenfalls zu einem veränderten Absenkeverhalten führen, da angenommen werden kann, dass die Viskosität und Adhäsionskräfte verändert werden und die Fasern im Schleim haften bleiben können. Ein weiteres Problem der Zentrifugation ist die Menge an Flüssigkeit. Bei der Probengewinnung wurden unterschiedliche Mengen an Tracheallavageflüssigkeit bei den Verstorbenen gewonnen. Da es sich um eine quantitative Erfassung der Fasern handelt, wurde so viel Trachealsekret wie möglich gewonnen. Der

auf den Objektträger nach der Zentrifugation aufgebrachte Tropfen durfte nicht zu groß sein, da die Flüssigkeitsschicht sonst zu dick wäre: somit wären die Fasern von Flüssigkeit, Matrix/ Schleim und anderen Fasern überlagert worden und hätten nicht sicher detektiert werden können. Bei einer Untersuchung aller Phasen nach der Zentrifugation würde sich sehr viel Flüssigkeit ergeben, die in kleinen Tropfen auf Objektträgern pipettiert werden müsste. Auch bei alleiniger Untersuchung des Sediments müssten vermutlich auf Grund der hohen Substanzmenge in manchen Fällen viele Objektträger benutzt werden. Dies würde einen immensen Aufwand in der anschließenden Auswertung unter dem Mikroskop bedeuten.

### 5.2.2 Filtrierung

Der Vorteil des Filtrierens ist, dass die gesamte Tracheallavageflüssigkeit untersucht wird und die Flüssigkeit nach der Filtration verworfen werden kann. Somit bleiben nur die gefilterten Bestandteile zurück. Eine mechanische Fragmentierung der Fasern durch den Prozess der Filtrierung war nicht ersichtlich, ist aber nicht vollständig auszuschließen und sollte weiter beobachtet werden. Im Laufe der Filtrierungsexperimente zeigten sich folgende Probleme:

*Problem 1*: Die Filteroberfläche ist entscheidend für die Faseridentifikation. Daher muss sie homogen/strukturarm sein, um die Fasern bei der visuellen Auswertung gut erkennen zu können. Dies betrifft vor allem weiße und farblose Fasern. Im besten Fall wäre der Filter transparent. Auch ein kleiner Filterdurchmesser erleichtert die mikroskopische Auswertung.

*Problem* 2: Die hohe Matrixbelastung des Trachealsekrets führt zu einer Verstopfung der Filterporen und/oder einer Ablagerung von Matrixbestandteilen auf dem Filter.

*Problem 3*: Besonders beim Auszählen kleiner Fasern finden sich *Partikel*, die nicht eindeutig als Fasern identifizierbar sind.

*Problem 4*: Grundsätzlich besteht die Gefahr einer erheblichen *Probenkontamination* durch Umgebungsfasern.

Lösungen für diese Probleme wurden mit verschiedenen Ansätzen und Änderungen der Versuchsabläufe erarbeitet und optimiert.

### Filtertyp

#### Glasfaserfilter, Versapormembran, PTCE-Membran

Der Glasfaserfilter und die Versapormembran wiesen die Probleme 1, 2, 3 und 4 auf. Obwohl nur die flüssige Phase der TP benutzt wurde, kam es bei der Filtration zum Verstopfen der Versapormembran (Problem 2). Ein die Verstopfung beeinflussender Faktor ist die geringe Porengröße (2,7µm Glasfaserfilter und 0,45µm Versapormembran).

Die PTCE-Membran wies die Probleme 1 und 2 (Filteroberfläche und Matrixbelastung) auf. Dabei stand bei Problem 2 die Ablagerung von Matrixbestandteilen im Vordergrund. Zu einer Verstopfung kam es nicht, da die Porengrößen 14µm und 20µm betrugen. Dies ist vermutlich auch der Grund, warum keine Partikel (Problem 3) auffielen. Das Erkennen der weißen Fasern erforderte viel Aufmerksamkeit, sodass die Wahrscheinlichkeit für Messfehler stieg. Zudem stellte sich die Frage, ob die gefundenen weißen Fasern tatsächlich die beigesetzten waren. Die Fasern könnten sich bereits in der TP befunden haben oder durch Kontamination eingebracht worden sein, denn weiße/farblose Fasern sind ubiquitär vorhanden und neben den beigesetzen Fasern wurden meist auch andere Verunreinigungen in Form von gefärbten Fasern festgestellt. Der Glasfaserfilter, die Versapormembran und die PTCE-Membran sind ungeeignet um Fasern visuell quantitativ auszuzählen, da sie die Anforderungen (homogene ruhige Oberfläche ohne eigene Faserstruktur) nicht erfüllen. Dies betrifft vor allem die Auswertung weißer/farbloser Fasern.

#### Supor-Membran

Bei der Supor-Membran lagen anfangs die Probleme 3 und 4 (Partikel und Probenkontamination) vor. Auch wenn es nicht zum Verstopfen (Problem 2) kam, sollte bedacht werden, dass nur die flüssigen Phasen verwendet wurden. Bei den Vorfiltrierungsversuchen zeigte sich dann allerdings auch ein Verstopfen der Supor-Membran, weswegen sie aufgrund mangelnder Verfügbarkeit größerer Porengrößen ausschied. Problem 1 war nicht vorhanden.

➔ Auch wenn die Supor-Membran sich visuell f
ür die Auswertung der Fasern eignet, stellt die Verstopfung ein zu gro
ßes Problem dar.

#### *Nylonnetzfilter (NNF)*

Der NNF wurde als am besten bewertet, da er im Vergleich zu den anderen Filtern eine homogene, ruhige Oberfläche mit gitterartiger symmetrischer Struktur aufwies. Selbst weiße/farblose Fasern können unter koaxialem Licht und Polarisationsfilter gut erkannt werden. Bei den NNF spielte Problem 3 (Partikel) keine Rolle, was vermutlich daran liegt, dass die Porengrößen erst ab 5µm begannen. Die NNF wurden direkt in die Vorfiltrierungstestreihen eingebunden, so kam es nie zur Verstopfung, da z.B. der 5µm-Filter nie alleinig mit TP bespült wurde. Ein weiterer Vorteil der NNF ist ihre Verfügbarkeit in verschiedenen Größen.

→ Probleme 1 und 3 wurden mit den NNF gelöst.

Die Umgebungskontamination (Problem 4) stellte unabhängig des Filtertyps ein grundlegendes Problem dar.

Auch Edelstahlfilter wurden in Betracht gezogen. Diese wurden aber wegen ihrer Herstellungsart als unbrauchbar befunden, weil die in Frage kommenden Edelstahlfilter durch Webe- oder Sinterungsverfahren hergestellt wurden. Hierdurch weisen sie keine plane und glatte Oberfläche auf, was sie für diese Zwecke ungeeignet macht. Des Weiteren war es nicht möglich, einen Probefilter zu bekommen. Der Ansatz wurde daher verworfen.

#### Matrixbelastung

Die bei der Filtration wiederholt auftretende Verstopfung hat ihren Ursprung in der hohen Matrixbelastung und der teilweise hohen Viskosität mancher Trachealproben. Auch wenn der Filter nicht verstopfte, konnten sich größere organische oder muköse Anteile der Probe auf dem Filter absetzen. Dies kann die Fasern maskieren und somit eine Faserdetektion unmöglich machen. Die wiederholte Verstopfung bestimmter Membranen lässt den Schluss zu, dass Porengrößen in dem entsprechenden Größenbereich (Supor-Membran 0,8µm, Versapor-Membran 0,45µm, Glasfaserfilter 2,7µm) unter der Filtration mit Trachealsekret zum Verstopfen neigen. Beim NNF-Filter mit 5µm trat in den Versuchen der Vorfiltrierung kein Verstopfen auf, allerdings ließ er sich bei manchen Proben erschwert filtrieren, dies lässt vermuten, dass die Grenze der Porengrößen, über die TP mit Vorfiltrierung ohne Verstopfen filtriert werden kann, in diesem Größenbereich liegt. In der Problembehandlung der Matrixbelastung musste eine Lösung für die Porenverstopfung und die großen Matrixablagerungen gefunden werden.

#### Chemische und mechanische Behandlung

Durch chemische oder mechanische Behandlung kann die Faserstruktur des Schleims aufgetrennt werden und dadurch die Viskosität reduziert werden (Ulmer et al., 1979). Die Ultraschallbehandlung führt zur mechanischen Verflüssigung des Schleims (Ulmer et al., 1979) und zeigte in Kombination mit der chemischen Behandlung gute Ergebnisse.

Ameisensäure konnte die Matrixbestandteile der Probe am besten auflösen und somit die Faserdetektion und Beurteilbarkeit verbessern. Nach Versuchsablauf (e) der Vorfiltrierungstestreihen konnte gefolgert werden, dass 150ml 5 mol/l AS das adäquate Mittel der chemischen Behandlung ist. Der Effekt der AS ist jedoch möglicherweise von der unterschiedlichen Zusammensetzung der jeweiligen Probe abhängig. Ein Zusetzen der Säure zur Probe vor der Filtration erfolgte nicht, da anzunehmen war, dass es durch die Zersetzung zu einer Zunahme von kleineren Matrixbestandteilen kommt, die wiederum die Filter mit kleineren Porengrößen verstopfen könnten.

Neben den Säuren und Methanol wurde auch ACC getestet, da dies bei Lebenden zu einer chemischen Verflüssigung des Schleims (Ulmer et al., 1979) führt. Diese Behandlung brachte jedoch keine signifikante Verbesserung der Beurteilbarkeit bzw. Detektion der Fasern.

Grundsätzlich sind verschiedene Reaktionen der Textilfasern bei Kontakt mit Chemikalien zu erwarten. Dazu gehören z.B. Auflösung, Verkürzung, Quellung oder verschiedene Reaktionen an der Oberfläche – etwa Bleichen oder Färben (Berger et al., 1993). In der Literatur wurden keine Angaben zur Behandlung mit niedrig konzentrierter AS gefunden. Auf Grund von Erfahrungen am Institut für organische Chemie Halle (Saale) wurde davon ausgegangen, das 5mol/l AS nicht zur Beschädigung von gängigen Textilfasern führt, was in der Validierung bestätigt wurde: Die violetten Fasern wiesen unter dem Mikroskop nach AS-Behandlung keine sichtbaren Veränderungen auf (s. Kap. 4.5). Trotzdem wurden die mit AS-behandelten Filter zur Sicherheit mit dest. Wasser gespült.

### Vorfiltrierungstestreihen

Zusätzlich wurden Vorfiltrierungstestreihen durchgeführt. Durch die Reihenschaltung von Filtern mit absteigender Porengröße konnten größere Matrixbestandteile vor Erreichen der kleineren Porengrößen abgetrennt werden. Dies stellte den entscheidenden Punkt in der Eliminierung der Matrixbelastung dar. Da sich die Poren der 0,8µm-Supor-Membran wiederholt zusetzten und es keine Supor-Membran mit den benötigten Porengrößen gibt, wurde die Membran ausgeschlossen und die Filtrierung mit den NNF durchgeführt. Hiernach konnte kein Zusetzen der Poren mehr registriert werden. Zusätzlich wurde überlegt, durch Eliminierung des 11µm- oder 41µm-Filter den Aufbau auf drei Filter zu reduzieren und somit die Handhabung zu erleichtern. Allerdings sind vier Filter sicherer um Verstopfungen zu vermeiden. Dies wurde im Laufe der Versuche bestätigt, z.B. bei NA3, bei dem der 11µm- und 5µm-NNF schwer zu filtrieren war und mit einer Filterreduktion vermutlich verstopft wäre. Allgemein ließ sich eine große Bandbreite an Matrixbelastungen beobachten. Die Reduzierung auf weniger Filter könnte Gegenstand weiterer Forschung sein. Ein Ansatz wäre, bei weniger belasteten Proben eine geringere Filteranzahl zu verwenden. Allerdings stellt sich bei diesem Vorgehen die Frage der Vergleichbarkeit.

Ein Vorteil mehrerer Filter ist die leichtere Auszählbarkeit der Fasern. Dies zeigt sich an Blindprobe SB1 (s. 4.4.1), in der die Angabe >100 erfolgte, da mehr als 100 Fasern auf einem Filter zu unübersichtlich waren, um diese auszuzählen. Sind diese Fasern allerdings auf mehrere Filter verteilt, stellt dies kein Problem dar (siehe z.B. NN3 aus 0 mit 137 Fasern/P).

Bei der Filtrierung mit der 20ml-Spritze konnte ein erhöhter Filterwiderstand beobachtet werden, z.B. in den Versuchsabläufen (d) und (f) der Vorfiltrierungstestreihen, in welchen der 5µm-Filter fast verstopft wäre. Um die Gefahr des Verstopfens zu vermeiden, wurde an der 10ml-Spritze festgehalten, trotz schnellerer Filtration mit der 20ml-Spritze. Beide Spritzen je nach Matrixbelastung zu verwenden wäre ein weiterer Arbeitsschritt, der jedoch die Gefahr der Kontamination birgt und auch die Vergleichbarkeit beeinflusst.

Mit dem 5µm-NNF als kleinste Porengröße konnten erfreulicherweise nur noch wenige, nicht eindeutig als Fasern zu identifizierbare Partikel gefunden werden. Ein Lösungsansatz für dieses Problem wäre die Etablierung einer Erfassungsgrenze der Faserlänge gewesen, ab welcher Fasern als solche gezählt werden. Dies wurde in der Literatur bereits beschrieben: Dris et al. (2016) setzten eine Erfassungsgrenze von 50µm ein, da Fasern unter dieser Länge unter dem Mikroskop schwer als solche zu identifizieren waren. Der von den Autoren beschriebene Faserdurchmesser von Mikrofasern, die sich aus der Umgebungsluft ablagerten, liegt hauptsächlich zwischen 7 und 15µm, sodass diese bei einer unteren Porengröße von 5µm nahezu unmöglich dem Filternetz entweichen können; möglich wäre es nur, wenn die Länge kürzer als der Durchmesser wäre.

In der Literatur werden Fasern beschrieben, die dem 5µm-NNF senkrecht entweichen könnten, wie sehr feine synthetische Mikrofasern, z.B. Lyocell-Mikrofasern mit einem Durchmesser von

 $1-4\mu m$  (Robertson et al., 2017), ebenso Stoffe wie Hanf, Flachs und Jute mit z.T. Durchmesser  $<5\mu m$  (Türk, 2014). Auch wenn letztere beim Ersticken unter weicher Bedeckung vermutlich seltener als Tatwerkezug verwendet werden, da sie nicht so häufig in der Textilproduktion und in der Bekleidungsindustrie vorkommen (s. Kap. 1), kann im Zuge weiterer Forschung der 5 $\mu$ m-NNF durch einen Filter mit kleinerer Porengröße ersetzt werden, wenn das Zusetzen der Poren dies zulässt. Alternativ könnte dem 5 $\mu$ m-NNF ein weiterer Filter nachgeschaltet werden.

Ein weiterer Lösungsansatz zur Vermeidung der Verstopfung wäre die Proben erst zu zentrifugieren, die oberen Phasen zu filtrieren und das Sediment auf Objektträgern auszustreichen. Dies stellt aber viele weitere Arbeitsschritte dar, die die Methode anfällig für Fehler und Kontamination machen würden. Auch würde es bei der visuellen Auswertung einen hohen Aufwand darstellen, da neben dem Filter mehrere Objektträger mit Sediment ausgewertet werden müssten.

### Fazit zur Lösung der Filtrierungsprobleme:

- 1. Der Nylonnetzfilter erfüllt die an einen Filter gestellten Kriterien.
- 2. Das Zusetzen der Filterporen kann durch die Reihenschaltung von vier NNF mit den Porengrößen 100µm, 41µm, 11µm, und 5µm sowie der Probenvorbehandlung mit Ultraschallbad und Vortex verhindert werden. Die Matrixbelastung konnte durch die Filtration mit 150ml 5mol/l Ameisensäure deutlich reduziert werden.
- Durch Ausschluss des 0,8µm-Filters konnte die Menge an kleinen, nicht eindeutig als Fasern zu identifizierenden Partikeln, deutlich minimiert werden. Die NNF zeigten keine nennenswerte Anzahl an nicht identifizierbaren Partikeln.
- 4. Die Lösungen für das Problem der Probenkontamination sind in 0 dargestellt.

#### 5.3 Faserdarstellung

Die Faserauswertung wird durch die heterogene Trachealflüssigkeit als organisches Material erschwert. In der Forensik werden Fasern meist von Oberflächen gewonnen, z.B. von der Haut oder Kleidung, und anschließend in Lösung gebracht. In dieser Studie sind die Fasern in einem inhomogenen Trachealsekret, das unterschiedlich zusammengesetzt und sehr matrixbelastet ist. Dies erschwert die Faserdarstellung. In der forensischen Faseruntersuchung werden Fasern auch quantitativ erfasst, jedoch v.a. qualitativ betrachtet und verglichen. Im Rahmen dieser Studie wird bes. der quantitative Aspekt fokussiert.

### 5.3.1 Einbettung

Die Einbettung ist ein wichtiger Schritt um die Fasern adäquat auswerten zu können und zusätzlich ein wichtiger Faktor in der Prävention von Kontaminationen mit Umgebungsfasern.

### Filter

Feuchte Filter ließen sich besser mikroskopieren als trockene. Das Trocknen der Filter würde zudem einen zusätzlichen Arbeitsschritt einführen, der eine weitere Fehler- und Kontaminationsquelle darstellen würde. Außerdem wurde beobachtet, dass die DP leichter von den trockenen Filtern abfallen, da keine Adhäsion durch Feuchtigkeit vorhanden ist.

Durch die Einbettung der Filter mit Glycerin konnte die durch Lichtreflexion und Kondenswasserbildung entstehende komplizierte visuelle Auswertung vereinfacht und optimiert werden.

In den Blindproben SB3 und SB4 wurden nach Herausfließen von Glycerin beigesetzte Fasern neben dem Filter gefunden. Dies bestätigt die Annahme, dass durch zu viel Glycerin die Fasern vom Filter runtergespült werden können. Deshalb sollte so viel Glycerin wie nötig verwendet werden, um den Filter frei von Luft einzubetten, aber so wenig wie möglich, um die Fasern nicht vom Filter herunter zu spülen. Dafür war ein großer Tropfen auf dem Objektträger, ein kleiner Tropfen an der Filterseite und ein großer Tropfen in der Filtermitte am besten geeignet (s. Punkt (d) unter 4.2).

Durch die Abdeckung des Filters durch das HG konnten die problematischen Übergänge von feucht zu trocken beseitigt sowie die Kontamination während des Mikroskopierens gesenkt werden. Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen war eine Kombination aus Objektträger und seitlichem Aufbringen eines HG am besten geeignet.

#### Filterhalterkomponenten

Die Wiederfindungsexperimente bestätigten die Annahme, dass Fasern verloren gehen und nicht durch die alleinige Auswertung des Filters erfasst werden können. So konnte nach Einbettung in Durchlauf 1 lediglich eine WDF von 50% vermerkt werden und in Durchlauf 2 ein Abfall der WDF von 75% (nach Filtrierung und vor Einbettung des Filters) auf 16,7% nach Einbettung (s. Punkt (d) unter 4.2). Zu beachten ist, dass die Fasern einem 5µm-Filter auflagen, somit hätten diese nicht durch die Poren des Filters verloren gehen können. Nach Optimierung der Glycerinmenge und Auswertung der Filterhalterkomponenten konnte in der gesamten Faserwiederfindung - und auch im Vergleich des Filters vor und nach Einbettung - die WDF auf 100% gesteigert werden (Durchlauf 3, 4, 5, 6). Durch die Steigerung der WDF von 16,7% auf 100% kann bewiesen werden, dass die richtige Einbettungsmethodik von Bedeutung und die alleinige Betrachtung des Filters nicht ausreichend ist.

Die untere Filterhalterhälfte und die untere Lochplatte konnten aus der visuellen Auswertung ausgeschlossen werden, da keine Faserablagerung auf ihnen beobachtet wurde. Da sich die Fasern auf den Filterhalterkomponenten schwerer als auf dem Filter detektieren ließen, wurden diese nach Möglichkeit eingebettet. Dies betraf die obere Lochplatte. Hierfür zeigte sich das Abklatschen beider Seiten auf zwei mit doppeltem KB präparierten Objektträgern als am besten geeignet. Der Dichtungsgummi wurde zwischen HG und Objektträger eingebettet. Die ergänzende Mikroskopie der Filterhalterkomponenten dient allein der Kontrolle.

### Druckluft

In Punkt (d-g) der Einbettungsexperimente (s. Kap. 4.2.1) zeigte sich, dass durch die Anwendung von Druckluft die Fasern von den Filterhalterkomponenten auf den Filter verlagert werden. Eine Faserumverteilung zugunsten der Filter im Vergleich zu den Filterhalterkomponenten ist als positiv zu bewerten, da sich der Filter mikroskopisch besser auswerten lässt. Auf Grund der Gefahr der Fremdfaserkontamination sollte statt Raumluft Druckluft verwenden werden. Daher wurden überall einsetzbare Druckluftsprays verwendet und deren geeignete Hubanzahl bestimmt. Bei der Druckluftbehandlung erbrachten 8 Hübe die besten Ergebnisse. Weniger Hübe führen zu mehr Fasern auf den Filterhalterkomponenten (z.B. 8 von 10 Fasern bei 3 Hüben), v.a. auf dem Dichtungsgummi. Mehr Hübe führten zu einer randorientierten Lage der Fasern auf dem Filter und damit zu einer möglichen Gefahr, diese herunter zu pusten oder anschließend herunter zu spülen.

### 5.3.2 Mikroskopie

#### Stereomikroskop und Polarisationsfilter

Das Stereomikroskop und Polarisationsmikroskop gehören zu der Grundausstattung der Faseruntersuchung. Durch das Polarisationsmikroskop können erste Aussagen über die Faser getroffen werden, etwa über die Farbe und Morphologie, für weiterführende qualitative und vergleichende Untersuchungen stehen Techniken wie die Fluoreszenzmikrokopie, Mikrospektrophotometrie, Infrarotmikrospektroskopie oder Raman-Spektroskopie zur Verfügung (Robertson et al., 2017). Durch die Polarisationsmikroskopie konnten selbst farblose und weiße Fasern auf dem NNF sichtbar gemacht werden. Ein Restrisiko, die weißen/farblosen Fasern nicht zu detektieren, kann dennoch gegeben sein. Daher wäre ein Ansatz, das mit der Methode vertraute Personal zu schulen und in die Faserbetrachtung einzuführen. Als Sicherheitskontrolle könnten die Proben von zwei Untersuchern ausgewertet werden, um Fehler in der Faserauszählung zu vermeiden. Dies empfahlen bereits Dris et al. (2016). Die ersten Versuche, darunter auch die Zentrifugation, wurden an dem Stereomikroskop der Rechtsmedizin ausgewertet. Dieses ist auf Grund fehlender Zusatzfunktionen, wie Panoramaaufnahmen, Koordinatenspeicherung und Darstellungsoptimierungen sowie durch eine erschwerte Handhabung im Vergleich zum Digitalmikroskop des Institutes für Chemie, weniger gut geeignet weiße/farblose Fasern sicher zu erkennen.

Auch Pauly et al. (1998) beschreiben, dass sich inhalierte Fasern im Lungengewebe mit der Polarisationsmikroskopie im Vergleich zu Weißlichtmikroskopie, Phasenkontrastmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie am besten detektieren ließen. Jun et al. (2021) benutzten ebenfalls die Polarisationsmikroskopie zur Untersuchung des Sputums und der Nasenspülflüssigkeit auf Mikroplastikfasern. Baeza-Martínez et al. (2022) untersuchten die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit unter einem trinokularen Zoom-Mikroskop. Anschließend isolierten sie die Fasern und analysierten sie auf ihre chemische Zusammensetzung.

Wie in Kap. 4.2.2 erläutert, erwies sich eine Kombination aus Auflicht- und Dunkelfeldmikroskopie, koaxialem Licht mit Polarisationsfilter sowie seitliches Licht und Ringlicht als am besten geeignet.

#### Beobachtungen und weitere Aspekte der Faserdetektion

Eine Schwierigkeit in der Mikroskopie stellen große Matrixzusammenlagerungen, wie in den Versuchen der Präzisionsphase, dar. Die Versuche zeigten jedoch auch, dass farbige Fasern trotzdem gut detektiert werden können. So wurden in P1, P4 und P6 insgesamt 63, 56 und 64 von 70 beigesetzten violetten Fasern gefunden. Weiße/farblose Fasern können hingegen in solchen Matrixanhäufungen nicht sicher detektiert und mit faserähnlichen Matrixstrukturen verwechselt werden. Obwohl die detektierten Fasern mittels Koordinaten im Navigationsbereich des Digitalmikroskops erfasst wurden, war eine strukturierte Auszählung bei >100 Fasern/Filter kaum möglich. Falls im weiteren Verlauf die Auswertung derart hoher Faserzahlen zu erwarten sind, könnte man z.B. die Verwendung von Rastern in Betracht ziehen. Weitere Hilfestellung könnten in Zukunft vielleicht automatisierte Faserzählungen bieten. Wetzer and Lohninger (2018) konnten mit Hilfe eines Computeralgorithmus Faserstrukturen durch Graustufenbilder vom Hintergrund abgrenzen und letztlich eine automatische Suche ermöglichen. Zudem entwickelten sie einen Ansatz für die Suche nach Fasern, die mit den farbbasierten Eigenschaften eines anderen Objektes übereinstimmen. Um Partikel, die nicht eindeutig als Fasern identifiziert werden können (Problem 3), abzugrenzen, könnte eine Größenuntergrenze, ab welcher Fasern als solche gezählt werden, festgelegt werden (s. Kap. 5.2.2 Matrixbelastung). Dies wurde bereits bei den Aktivproben (20µm) angewandt und ist auch in der Literatur beschrieben (Dris et al., 2016). Auch qualitative Merkmale, wie z.B. der typische Twist bei Baumwollfasern, könnten die Zuordnung unterstützen. Gelingt dann trotz qualitativer Betrachtung keine sichere Faserzuordnung, sollte der Partikel nicht als Faser gezählt werden. Eine weitere Option wäre in konkreten Fällen die Identifizierung und qualitative Erfassung des Materials mit Hilfe weiterführenden apparativen Untersuchungen.

#### 5.4 Faserkontamination

Die Kontamination stellte eine grundlegende Herausforderungen der Methodenentwicklung dar, der besondere Beachtung geschenkt werden muss, da sie zu falsch positiven Ergebnissen und damit zu falschen Verdächtigungen führen kann (Roux et al., 2001). Hervorzuheben ist, dass die ersten Versuche mit einem geringeren Antikontaminationsstandard durchgeführt wurden, weil die Antikontaminationsmaßnahmen im Laufe der Studie weiterentwickelt wurden. Dazu gehörte die Vermeidung von Faserverschleppung durch Optimierung des Spülprozesses, die Auswahl der geeigneten Reinigungsmaterialien sowie die Vermeidung von Fremdfaserkontamination durch Umgebungsfasern. Letzteres wurde durch allgemeine und spezielle Maßnahmen, z.B. Benutzung von Deckgläschen während des Mikroskopierens, Druckluftspray statt Umgebungsluft sowie Probenvorbereitung und Faserdarstellung am selben Ort, erreicht.

Die Kontamination zeigte sich z.B. mikroskopisch in der Faserart und Faseranzahl der Proben, durch das Vorhandensein von Fasern in den Blindproben (Umgebungskontamination) oder dem Fasertrend der ersten WDF-Stufe (Faserverschleppung). Dies zeigt auch der Bastfaserfund in BA5, welcher anhand der typischerweise querverlaufenden Risse (Humphries, 2009) identifiziert wurde. Bevor Faseraufbereitung und –darstellung in dasselbe Gebäude verlegt wurden, kam es im Rahmen des Probentransports zu Kontaminationen. So wurden z.B. bei Auswertung einer Probe, die abgedeckt in einer Ledertasche transportiert worden war, etliche Lederbestandteile gefunden.

Auch konnte bereits makroskopisch eine Umgebungskontamination in Form von sichtbaren Fasern, die sich auf den Materialien, wie den Filtern, absetzten, beobachtet werden.

Der Nutzen der Antikontaminationsmaßnahmen wurde anhand folgender Punkte evaluiert:

- Reduzierung der Faseranzahl in den Blindproben/Blanks (s. 5.4.1 und 5.5) und TP.
- Ablagerung von Fasern auf DP und HG konnten unter dem Mikroskop erkannt werden. Bei Unklarheiten wurde mit einer Pinzette geprüft, ob die Faser auf dem Glas beweglich und damit aufliegend ist. Die Tatsache, dass sich Fasern auf dem Glas absetzten, lässt vermuten, dass sich vor Einführung des DP-/HG-Gebrauchs die Fasern auf dem Filter oder den Filterhalterkomponenten absetzten und die Probe damit kontaminierten hatten.
- Ergebnisse der Aktiv- und Passivproben (s. 5.4.2)
- Eliminierung des Fasertrends nach endgültiger Spülprozessoptimierung.

Interessanterweise war auch eine Kontamination der Umgebung im Rahmen der Probenbearbeitung zu beobachten. So ist das Einbringen violetter Fasern in die Umgebung trotz aller Vorsichtsmaßnahmen am ehesten auf das Spiken der Proben im Rahmen der Validierung zurückzuführen. Dies zeigte der Fund violetter Fasern in den Blindproben und den Aktiv-/Passivproben. Moore et al. (1986) und Roux et al. (2001) beschrieben die Faserpersistenz und den Fasertransfer nach Faseruntersuchungen im Labor wie folgt: Der Zeitraum, in dem Fasern in der Luft verbleiben, ist abhängig von der Faserart. Fasern waren selbst Tage später noch im Labor zu finden, ihre Menge nahm mit zunehmender Distanz ab. Es gab keinen Fasertransfer aus dem Raum nach außen.

Eine Lösung für diese Art der Kontamination wären getrennte Räumlichkeiten für das Spiken und die Probenvorbereitung. Für die vorliegende Studie war jedoch nur ein geeignetes Mikroskop verfügbar, sodass diesem Vorgehen nicht entsprochen werden konnte.

Auch in dem reinen Matrixaliquot der Präzision und der WDF-Stufe 2 konnten 2 bzw. 3 violette Fasern gefunden werden, die ebenso Folge der durch das Spiken erfolgten Kontamination der

Umgebung sein können. Andere Möglichkeiten wären die Persistenz und Verschleppung im Material durch die vorherigen Versuche oder die Kontamination durch bereits in der Umgebung befindliche violette Fasern. In den acht während der WDF und Präzision angefertigten Blindproben wurde nur 1 violette Fasern gefunden. Auch in den Blanks und Negativproben wurde jeweils nur in einer Probe (NN3 und BN3) 1 violette Faser gefunden. Dies zeigt, dass keine systematische Kontamination oder Verschleppung violetter Fasern erfolgte.

#### Analyse von Kontaminationsquellen und Reduzierung des Kontaminationsrisikos

Zu den im Rahmen dieser Studie nicht beeinflussbaren, potenziellen Kontaminationsquellen gehörte z.B. die Benutzung der Labore durch verschiedene Personen für unterschiedliche Arbeitszwecke. Damit einher ging ein häufiges Öffnen der Labortüren und der Gebrauch von Laborkitteln aus weißer Baumwolle. Roux et al. (2001) identifizierten Laborkittel als potenzielle Kontaminationsquelle. Sie konnten zeigen, dass sich nach Faseruntersuchung auf einem Standardlaborkittel 2,6 Mal mehr Fasern befanden als auf einem Kittel aus Polypropylen. Auch das regelmäßige Öffnen der Türen, wie in unserer Studie gegeben, stellt aus ihrer Sicht ein Risiko dar, weil dadurch unkontrollierte Luftzüge entstehen, welche Umgebungsfasern ins Arbeitsumfeld einbringen. Ferner befanden sich Textilien, wie etwa Handtücher, als potenzielle Faserkontaminationsquelle in den genutzten Laborräumen. Der Abzug wurde zwischenzeitlich auch von anderen Mitarbeitern benutzt, sodass in den Abzug regelmäßig ohne Antikontaminationsmaßnahmen gegriffen wurde. Gelegentlich fanden auch Umbauarbeiten statt, wodurch vermutlich mehr Fasern in Umlauf gebracht wurden, doch wurde die Arbeitsflächen nach einem derartigen potenziellen Kontaminationsereignis stets grundgereinigt. Mögliche Kontaminationsquellen bei der Probengewinnung waren auch die Intubation oder bereits einliegende Systeme der Atemwegssicherung. Zur bestmöglichsten Eliminierung von Kontaminationsquellen empfahlen Roux et al. (2001) spezielle Untersuchungsräume zu benutzen und vor der Untersuchung den Arbeitsplatz und den Torso der bekittelten untersuchenden Person zu tapen, um die Hintergrundkontamination abzuschätzen. Auch Robertson et al. (2017) empfahlen den Gebrauch von speziellen Räumen sowie besondere Vorsicht und spezielle Qualitätsstandards zur Kontaminationsminimierung sowie ein Screening der Hintergrundfaserpopulationen. Pauly et al. (1998) identifizierten Glasobjekte, etwa Objektträger, Deckgläser und Probengefäße, als größte Quelle der Fremdfaserkontamination und erklärten es durch die negative Ladung des Glases, wodurch Fasern angezogen werden würden. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit einer gründlichen Spülprozedur. Sie arbeiteten unter einer Laminar-Flow-Box und schafften damit einen Reinraum, in welchem das Material getrocknet und die Proben bearbeiten wurden. Zudem trugen sie statt der üblichen Laborkittel aus Baumwolle Einwegkleidung aus nicht-gewebtem Kunststoff.

Zwar ist vor allem beim quantitativen Arbeiten mit Mikrofasern, die mit 5-10µm Breite definiert wurden (De Wael, 2008), ein Reinraum von Vorteil (Woodall et al., 2015), allerdings war ein

solcher in unserer Studie nicht verfügbar und würde die breite Anwendbarkeit der entwickelten Methodik einschränken.

Ein weiterer Schritt im Kontaminationsscreening wäre der Vergleich der Faserbelastung zwischen verschiedenen Laboren und Sektionssälen, wie bereits von Hidalgo-Ruz et al. (2012) empfohlen. Da ein Sekundärtransfer von Fasern aus dem Kopfhaar bei der Tracheallavage grundsätzlich zu befürchten ist, könnte der Einsatz eines Haarnetzes in Betracht gezogen werden. Die Faserpopulation in Kopfhaar und deren Transfer wurden von Palmer und Oliver (2004) und Palmer und Banks (2005) untersucht. Hierbei ist auch zu erwähnen, dass Schwendener et al. (2016) in den in Australien verwendeten Leichensäcken etwa 3.603 farbige Hintergrundfasern und 1.429 nicht identifizierte Partikel fanden, was ebenfalls zur Kontamination beitragen kann. Als weitere Kontaminationsquelle wäre die nackte Haut der verstorbenen Person denkbar.

Wurden in Faserpopulationsstudien auch farblose Fasern mit einbezogen, so waren diese die häufigsten Fasern (Grieve und Biermann, 1997a, Was-Gubala und Chochól, 2001, Cammarota et al., 2019). Ansonsten waren die häufigsten Faserfarben schwarz/grau und blau (Roux und Margot, 1997a, Palmer und Oliver, 2004, Watt et al., 2005, Burch, 2008). Insgesamt waren diese auch die am häufigsten beobachteten Faserfarben in der vorliegenden Studie (s. u.a. 5.4.2)

Natürliche Fasern dominierten in den Faserpopulationsstudien von Grieve und Biermann (1997a), Roux und Margot (1997a), Cantrell et al. (2001), Was-Gubala und Chochól (2001), Palmer und Oliver (2004), Watt et al. (2005), Burch (2008). Die häufigste Faserart war Baumwolle (Grieve und Biermann, 1997a, Roux und Margot, 1997b, Cantrell et al., 2001, Was-Gubala und Chochól, 2001, Palmer und Oliver (2004), Burch, 2008).

### 5.4.1 Spülprozess und Blindproben

Vor der ersten Spülprozessanpassung konnten in der Blindprobe nach Einbettungsoptimierung 72 Fasern/P festgestellt werden. Vor der zweiten Spülprozessoptimierung wurden Faseranzahlen von 23 bis 46 Fasern/P aus dem Sektionssaal und bis zu 79 Fasern aus dem Labor gefunden. Nach der finalen zweiten Spülprozessoptimierung konnten in den Blindproben aus dem Labor zwischen 6 und 19 Fasern/P und in den Blindproben aus dem Sektionssaal (Blanks) 13–23 Fasern/P gefunden werden. Die Abnahme an Faserzahlen verdeutlicht die Effizienz der Spülprozessoptimierung und die Relevanz der Antikontaminationsmaßnahmen.

#### SB: Blindproben aus dem Sektionssaal während der Einbettungsversuche

Das Ergebnis in SB1 mit >100 Fasern lässt schlussfolgern, dass eine Kontamination der Probe vorliegt. Daher wurde beschlossen, noch mind. zwei weitere Blindproben anzufertigen. In den darauffolgenden Blindproben konnten geringere Faseranzahlen mit 25-40 gezählt werden. Allerdings wurden in der Blindprobe mit der endgültigen Einbettungsmethodik 72 Fasern/P gezählt. Damit ist das "Grundrauschen" an Fasern viel zu hoch, daher wurde der Materialaufbereitungsprozess weiter optimiert, um Kontamination und Faserverschleppungen zu vermeiden.

#### LB: Blindproben aus dem Labor während Bestimmung der Wiederfindungsrate und Präzision

Die Blindprobe nach "WDF 1.1-1.4 alt" zeigte eine Faseranzahl von 79 Fasern/P. Dies kann als deutlich zu hoch betrachtet werden und überschreitet selbst die Werte der Negativproben, also realer Trachealproben, sodass das Ergebnis nicht akzeptiert werden konnte. Das Ergebnis wurde zusammen mit den Werten der ersten Wiederfindungsstufe, den Negativproben und Blanks als Trend bewertet. Dafür spricht auch der Faserfund von 8 violetten Fasern in der Blindprobe nach "WDF 1.1-1.4 alt". Hiernach wurde der Spülprozess ein zweites Mal optimiert (s. 4.3).

Die Blindproben, die mit der finalen Spültechnik während der WDF und Präzision angefertigt wurden, liegen mit durchschnittlich 12,9 Fasern/P in einem akzeptablen Bereich, betrachtet in Relation zu der Anzahl an nicht durch Kontamination eingebrachten Fasern. Die Negativproben (neu) liegen mit einem mittleren Wert von 92 Fasern/P deutlich darüber. Etwa 71,2% der gefundenen Fasern waren weiß oder farblos, was die Beurteilung weißer/farbloser Fasern anhand quantitativer Aspekte erschwert. Die Blindproben aus dem Labor liegen mit etwa 5 Fasern unter dem Mittelwert der Blanks aus dem Sektionssaal (17,7 Fasern/P), was die Annahme stützt, dass durch einen weiteren Arbeitsschritt/-ort mehr Kontamination entsteht. Zur Evaluierung könnten in Zukunft auch Blindproben in einem anderen Labor, mit einer anderen untersuchenden Person angefertigt werden.

Mit der hier entwickelten Methode ist Kontamination reduzierbar, kann aber nicht vollständig eliminiert werden. Daher sollten bei zukünftigen Versuchen weiterhin regelmäßig Blindproben angefertigt werden, um mehr Informationen über die durch die Methodik eingebrachten Fremdfasern zu erhalten, sowie um Kontaminationen schnell zu erkennen und eingreifen zu können. Auch Blanks sollten in größeren zeitlichen Abständen angefertigt werden.

### 5.4.2 Environmental Monitoring

#### Aktivproben

In den aktiven Luftproben wies Ch2 (Laborraum mit Mikroskop) die größte Faserbelastung auf, da dort die meisten Textilien, z.B. in Form von Teppichen, im Umfeld sind. Die häufigsten Faserfarben (weiß, schwarz, blau, grau) wiesen dieselbe Farbe auf, wie die Teppiche und Stuhlpolster (s. Abb. 67 und 68). Obwohl der Sektionssaal überwiegend aus wischbaren Flächen besteht und täglich feucht gereinigt wird, unterlag er einer größeren Faserbelastung als Ch1. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass im Rahmen der Sektionen regelmäßig Leichensäcke, Leichentücher sowie Kleidungsstücke der Verstorbenen im Raum vorhanden sind und es eine konstante Frischluftzufuhr von außen gibt. Zudem könnte die Belüftung in Ch1 stärker sein, da es sich hier um eine Schutzbelüftung gegen Chemikalien handelt, obwohl diese wiederum mit dem erhöhten Risiko einer Faserverschleppung einhergeht.

Die Größenbereiche der gefundenen Fasern (50µm-2,2mm) decken sich mit den von Klasmeier and Wissing (2016) beschriebenen Ergebnissen. In ihrer Luftprobe sichteten sie ca. 60 schwarze Fasern im Größenbereich 200µm-1,5mm. Dris et al. (2016) beschrieben in ihren Depositionsuntersuchungen ebenfalls überwiegend Größenbereiche von 200-600µm, größere Fasern beschrieben sie seltener. Im Bereich zwischen 50µm-200µm fanden sie auch einige Fasern und legten eine untere Erfassungsgrenze von 50µm fest, da kürzere Fasern nicht eindeutig als solche erkennbar waren. Auch in der vorliegenden Studie musste eine untere Erfassungsgrenze festgelegt werden, wobei Fasern bis zu einer Größe von 20µm eindeutig zu erkennen waren. In der Innenraumluft beschrieben Dris et al. (2017) eine maximale Faserlänge von 3250µm, jedoch hatten die meisten Fasern eine Länge zwischen 50 und 250µm.

Ein weiterer bemerkenswerter Aspekt war das Vorkommen violetter Fasern (Ch1: 3F, Ch2: 5F, S:1F). Es basiert vermutlich auf dem in 0 beschrieben Umstand, dass durch das Spiken Fasern in die Umgebung gelangten: Das violette Garn wurde in Ch1 aufbewahrt und das Hinzufügen der violetten Fasern unter dem Mikroskop erfolgte in Ch2. Dies würde auch erklären, warum in Ch2 die größte Menge an violetten Fasern in der Luft gefunden wurde. In Ch1 wurde das Garn in einer verschließbaren Plastiktüte in einer Plastikbox in einem Schrank aufbewahrt. Dass trotzdem Fasern in Ch1 gefunden werden konnten, zeigt, dass entweder trotzdem einzelne Fasern entweichen konnten, oder, dass Faserreste an den Materialien aus Ch2 kommend in die Luft gelangten. Die Faserkontamination eines Raumes durch Untersuchung von Textilien im Rahmen der Spurenuntersuchungen zeigten auch Moore et al. (1986) und Roux et al. (2001). Klasmeier und Wissing (2016) beschrieben mögliche Kontamination.

Das Vorhandensein vieler weißer/farbloser Fasern in den Luftproben stimmt mit der großen Menge an weißen/farblosen Fasern in den Blindproben/Blanks überein. Auch viele schwarze Fasern wurden gefunden, was sich mit den Ergebnissen von Klasmeier and Wissing (2016) deckt. Insgesamt entsprachen die Faserfarben den häufigsten Faserfarben verschiedener Faserpopulationsstudien (s. 5.4). Dris et al. (2017) maßen die Faserbelastung der Luft in Innen- und Außenräumen mit 1-60 Fasern/m<sup>3</sup> und 0,3-1,5 Fasern/m<sup>3</sup>; 67% der gefundenen Fasern waren natürlichen, v.a. cellulosischen Ursprungs. Sie postulierten, dass die Innenräume durch Luftaustausch der Ursprung für die Faserbelastung der Außenluft sind (Dris et al., 2016) und dass die gefundenen Fasern zu groß seien, um eingeatmet zu werden. Allerdings könnten noch kleinere, inhalierbare Fasern in der Luft vorhanden sein, die mit ihrer Methodik nicht erfasst werden konnten. Dem gegenüber stehen die Größen der im Respirationstrakt gefundenen Fasern (s. 5.7.1)

### Passivproben

In den passiven Abklatschproben der Oberflächen zeigte sich, dass die Oberflächen der Fenster und fensternahen Bereiche am stärksten faserbelastet sind (19-84 Fasern). Dies deckt sich mit Klasmeier and Wissing (2016), welche das Ergebnis damit erklären, dass Textilien einen großen Anteil des Hausstaubs ausmachen, etwa 80% nach Soentgen und Völzke (2006), und Staub sich



Abbildung 67: Stuhlpolster in Ch2

Abbildung 68: Teppichboden in Ch2

dort ablagert, wo wenig Luftbewegung herrscht, wie z.B. auf Fensterbrettern. Dris et al. (2017) maßen zur Staubentstehung eine Ablagerungsrate von 1.586-11.130 Fasern/Tag/m<sup>2</sup> in Innenräumen. In unserer Studie kommt hinzu, dass im Labor nur einmal im Jahr eine Grundreinigung erfolgt und nur einmal pro Jahr Fenster geputzt werden; beides fördert vermutlich die faserreiche Staubablagerung. Die Bereiche, die im Rahmen der Methode regelmäßig gewischt wurden, zeigten die geringste Faserbelastung (1-2 Fasern), das betrifft v.a. die Spülbeckenränder aus Ch1 und Ch2, den Abzug, den Mikroskopiertisch und den Sektionstisch und beweist die Effektivität und den Nutzen der Spülprozedur und Reinlichkeitsmaßnahmen. In Ch2 wurden vor allem weiße/farblose, schwarze und blaue Fasern gefunden. Diese Faserfarben entsprechen den Farben der dort befindlichen Textilien, etwa dem Teppich und dem Stuhlpolster in Grautönen (s. Abb. 76 und 68). Insgesamt wurde im Sektionssaal eine geringere Faserbelastung auf den Flächen festgestellt. Dies könnte damit erklärt werden, dass nach jeder Sektion der Sektionstisch, das Spülbecken und zum Teil auch der Boden gespült und gewischt werden. Der gesamte Boden wird einmal wöchentlich hochdruckgereingt. Zudem sind alle Flächen abwischbar und es gibt keine Textilien, die permanent im Raum gelagert werden - lediglich Zellstoff.

Der Fund violetter Fasern stimmt örtlich mit der Faserbeisetzung der Validierung überein. In Ch2 wurden einzelne violette Fasern auf Schreibtisch und Fensterbank gefunden. Diese befanden sich direkt neben dem Mikroskop, unter dem das violette Garn zurechtgeschnitten wurde. In Ch1 wurde 1 violette Faser auf der Arbeitsplatte gefunden, unter welcher sich der Schrank befand in welchem das violette Garn aufbewahrt wurde. Im Sektionssaal, der keine Berührungspunkte mit dem violetten Garn der Validierung hatte, wurde keine violette Faser gefunden. Insgesamt ähneln Farbe und Länge der gefundenen Fasern dem Ergebnis der Luftproben. Die Länge der Fasern (28-2700µm) deckt sich in etwa mit den Längen von Dris et al. (2016), Klasmeier and Wissing (2016) und anderen Faserpopulationsstudien (s. 5.4). Dris et al. (2017) beschrieben die im Hausstaub am häufigsten vorkommenden Faserlängen als im Größenbereich 50-250µm liegend und die längsten Fasern mit einer Größe im Bereich 4650-4850µm.

### 5.5 Validierung

Die Validierung der Methode erfolgte durch Spiken von Probenaliquoten mit violetten Fasern. Zur Beurteilung der Wahrscheinlichkeit, dass violette Fasern bereits in Trachealproben vorhanden sind, wurden Faserpopulationsstudien herangezogen; diese dokumentieren keinen Fund großer Mengen an violetten Fasern. Als Teil der Faserpopulation von nackter Haut machten violette Fasern nur 0,8% (Burch, 2008), auf Kopfhaaren 4,8% (Palmer und Oliver, 2004) und auf weißen T-Shirts 2,75% (Marnane et al., 2006) aus. Auf Kinositzen in Sydney wurden 2,1% violette Baumwollfasern gefunden (Cantrell et al., 2001). In Faserstudien zum Respirationstrakt wurden nur bei Baeza-Martínez et al. (2022) Angaben zu Faserfarben gefunden, die Autoren berichten nicht über den Fund violetter Fasern in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit. Auch Palmer und Burch (2009) benutzten für ihre Transfertests violette Stoffe, nur um die Fasern durch die auffällige Farbe besser identifizieren und zählen zu können.

Beim Spiken konnte beobachtet werden, dass die Fasern teilweise unterschiedliche Farbintensitäten aufwiesen. Deshalb wurde darauf geachtet, intensivgefärbte Fasern den Proben beizusetzen.

### Blanks

Die ersten drei Blankwerte (BA1-3) lagen mit 23, 24 und 29 Fasern/P in einem eng begrenzten Bereich, danach begannen die Werte mit 41 und 46 Fasern/P (BA4, 5) im Rahmen des Trends zu steigen. Bei Neuanfertigung nach Spülprozessoptimierung pendelten sich die Werte mit 13-23 Fasern/P (BN1-4) wieder ein. Der Mittelwert liegt bei 17,7 Fasern/P, er kann als Erwartungswert der Faserkontamination pro Trachealprobe interpretiert werden. Liegen die "natürlich" vorkommenden Faseranzahlen in Trachealproben bei 92 Fasern/P, bedeutet es, dass etwa 19% der gezählten Fasern Kontamination sind. Bei Dris et al. (2016) stellten die Fasern der Blanks bis zu 5% der eigentlichen Proben dar. Huang et al. (2022) fanden in ihrem Blank 8 Partikel/10ml. Im Vergleich dazu war der Median im Sputum 39,5 Partikel/10ml (18,75-91,75). Bei Vianello et al. (2019) wurden 7,7±3,8 synthetische Partikel pro Blank, 111±62 protein-basierte Partikel pro Blank und 32±23 cellulosisch-basierte Partikel pro Blank gefunden. Dies ergibt eine durchschnittliche Kontamination von 4,9±3,9% für Mikroplastik und 4,2±5,7% für nicht-synthetische Partikel im Vergleich zu ihren Luftexpositionsproben. Baeza-Martínez et al. (2022) konnten in ihren Blanks 1,45±0.67 Mikrofasern je 100ml feststellen. Solange eine Grundbelastung an Fremdfasen vorhanden ist, sollten Faserfunde mit wenig Fasern sehr vorsichtig interpretiert werden (Roux et al., 2001).

Um die Probengewinnung der Blanks künftig realitätsgetreuer zu gestalten, könnte die Tracheallavage im Sektionssaal mit einer Puppe simuliert werden, die in einem Bettlaken eingewickelt, ist, wie es häufig von Bestattern genutzt wird. Die Puppe sollte dabei Haare haben, da auch ein sekundärer Fasertransfer aus dem Kopfhaar erfolgen kann (Palmer und Banks, 2005).

### Negativproben

Nach Anfertigung der Negativproben (NP) kam erstmals die Vermutung auf, dass ein Trend in den Proben vorliegt. Die Faserzahlen pro Probe wurden - auch unter Betrachtung der nachfolgenden Blanks und Blindproben - immer größer (55, 78 und 95 Fasern/Probe in NA1-3). Der Verdacht bestätigte sich nach der ersten WDF-Stufe (s. 4.5.3), sodass nach Optimierung des Materialaufbereitungsprozesses neue Negativproben (NN) angefertigt werden mussten.

Die neu angefertigten NN lagen im Vergleich zu den anfangs angefertigten NP bei 45, 94 und 137 Fasern/P. Der Mittelwert der NN liegt damit nur um 16 Fasern höher als der Mittelwert der alten Negativproben (92 Fasern/P im Vergleich zu 76 Fasern/P). Es scheint daher akzeptabel, die Konzentration an beigesetzen Fasern pro WDF-Stufe bei 50, 70 und 90 Fasern/P zu belassen. Weiße Fasern machten mit durchschnittlich 84 (91,3%) Fasern den größten Anteil der in den Tracheallavageproben gefundenen Fasern aus. Im Vergleich dazu wurden 7,67 "andere" Fasern (8,34%) gefunden. In den Bronchoalveolären Lavagen (aus dem Mittellappen oder der Lingula) von Baeza-Martínez et al. (2022) wurden 9,18±2,45 Mikrofasern/100ml Bronchoalveolärlavage gefunden. Es kann vermutet werden, dass in die Trachea leichter bzw. schneller Fasern gelangen, welche durch die mukoziliäre Clearance nicht in die distalen Abschnitte avancieren. Zudem müssten die Fasern kleiner als in den proximalen Lungenabschnitten sein, um bis nach distal inhaliert werden zu können. Jun et al. (2021) konnten in Sputum und Nasenspülflüssigkeit durchschnittlich 105,4 bzw. 0,8/g Mikroplastikfasern nachweisen.

### Wiederfindung

"Liegt der gemessene Wert um mehr als der vierfache Variationskoeffizient vom Wert 100 entfernt, so gilt die Wiederfindungsrate als ausreichend" (Kromidas und Ermer, 2000). In dieser Betrachtung wird die RSD benutzt, da der Variationskoeffizient der RSD entspricht.

WDF-	RSD	4-fach RSD	Differenz zwischen 100%	Vergleich
Stufe	(%)	(%)	und der WDF-Rate in %	
1	9,472	37,888	14,667	37,888>14,667
2	7,987	31,948	8	31,948>8
3	2,907	11,628	9	11,62>9

Tabelle 15: Bewertung der WDF

Die WDF kann in allen drei Stufen mit einem insgesamt durchschnittlichen Wert von 89,44% (85,33%, 92% und 91%) als zufriedenstellend betrachtet werden, da in allen drei Stufen die vierfache RSD größer ist als die Differenz zwischen der WDF und dem Wert 100 (s. Tab. 15). Andere auf Filtration basierende Studien erzielten folgende WDF: 80-100% für die Extraktion von Mikroplastik (Raspeln) aus Sediment (Fries et al., 2013), 68,8-97,5% (Claessens et al., 2011) und 6-97% Mikroplastik in Sputum (Huang et al., 2022). Eine andere, nicht auf Filtration basierende Studie wies eine WDF von 95,5% für die Extraktion von kleinen (<1mm) Mikroplastikpartikeln aus Sedimentproben auf (Imhof et al., 2012). Als Inhalt weiterer Forschung könnte die Wiederfindung auch für extrem hohe oder niedrige Faserkonzentrationen bestimmt werden.

### Präzision

Die Fasern in den Proben können als Nebenkomponente bezeichnet werden, da sie den kleineren Anteil der Probe im Vergleich zur Matrix darstellen. Kromidas und Ermer (2000) erklärt, dass für die Methodenpräzision je nach Kontext und abhängig von der Methodenkomplexität, der Matrix und der Konzentration, z.B. Variationskoeffizienten von 1 bis 2% (Pharma-Qualitätskontrolle) oder 10 bis 15% (Umweltanalytik) akzeptabel sein können. Dabei sei der Variationskoeffizient mit der relativen Standardabweichung vergleichbar. Die vorliegende Methodik besitzt eine relative Standardabweichung von 8,03% und liegt damit zwischen beiden Angaben.

### Weitere Interpretationen

#### Fehleranalyse

Fehler in der Validierung können in dieser Studie in Form von Informationsbias (Hammer et al., 2009, Herkner und Müllner, 2011, Kleist, 2010) aufgetreten sein. Hierbei kann es allein durch das Wissen um die vorhandenen violetten Fasern und deren Anzahl zu einer genaueren Auswertung und dem gezielten Suchen der violetten Fasern gekommen sein. Um diese Art der Verzerrung zu vermeiden, könnten in Zukunft Spiken und Auswertung durch zwei unterschiedliche Personen erfolgen. Zudem könnte die untersuchende Person verblindet werden, wodurch sie nicht zwischen gespikter Probe, Blindprobe oder Trachealprobe unterschieden könnte.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle stellt das Spiken dar. Durch das Aufstocken mit Fasern könnte es, trotz mikroskopischer Kontrolle der einzuspülenden Fläche, zu Kontaminationen des Probenaliquots gekommen sein. Zudem könnte bereits die Aliquotierung der Probe zu Kontaminationen geführt haben, da jeder Schritt ein weiteres Kontaminationsrisiko darstellt. Dies könnte in der WDF und Präzision vermutet werden, da sich hier die Zahlen an nicht-beigesetzen Fasern zwischen 30 und 141 sowie 17 und 113 Fasern/Probenaliquot bewegen, obwohl diese als Aliquote theoretisch ungefähr dieselbe Faseranzahl besitzen sollten. Anderseits könnte jedoch auch die Zusammensetzung der Trachealprobe dazu geführt haben. Schleimige Bestandteile könnten sich schlechter teilen lassen und darin befindliche Fasern sich ungleich verteilen.

Durch die Bewegung des mit einzubringenden Fasern beladenen Glases über die Probe kann es zum "Abfallen" von Fasern durch z.B. Luftbewegung gekommen sein. Dadurch wären weniger Fasern als gedacht eingebracht worden.

#### Bewertung der Faseranzahlen

Mit dem Ausreißertest konnten abweichende Werte der gespikten violetten Fasern ausgeschlossen werden. Bei Betrachtung der weißen und farblosen Fasern fällt, wie bereits erwähnt, auf, dass die Werte einer großen Streuung unterliegen. Die WDF-Stufe 2 weist z.B. in den gespikten Probenaliquoten 22-46 nicht-beigesetzte weiße/farblose Fasern und in dem nicht-gespikten Kontrollprobenaliquot 132 weiße/farblose Fasern auf, die WDF-Stufe 3 14-33 nicht-beigesetzte weiße/farblose Fasern in den gespikten Probenaliquoten und 60 weiße/farblose Fasern in dem nicht-gespikten Kontrollprobenaliquot. Ebenso wurden in der Präzision bis zu 111 nicht-beigesetzte weiße/ farblose Fasern in den Probenaliquoten gefunden. Dies lässt schlussfolgern, dass die weißen/farblosen Fasern sich trotz Probenaliquot nicht in einem begrenzten Bereich bewegen und großen Schwankungen ausgesetzt sind. Dadurch, dass die weißen/farblosen Fasern mehrheitlich in Kontaminationen enthalten sind – und auch in den Blanks die vorherrschende Faserfarbe sind – ergibt sich das Risiko, dass die schwankenden Faserzahlen auch durch Kontamination beeinflusst werden. Somit lassen sich weiße/farblose Fasern durch die WDF und Präzision nicht beurteilen, wodurch die Methodik nicht für weiße/farblose Fasern validiert werden kann. Jedoch sollten die weißen/farblosen Fasern auch in sich anschließenden Untersuchungen nicht außer Acht gelassen und parallel zu den gefärbten Fasern mituntersucht werden, um zu prüfen, ob sich über die Anzahl von weißen/farblosen Fasern Rückschlüsse ergeben. In der Umwelt gibt es viele weiße/farblose Fasern, sodass erprobt werden sollte, ob sich diese auch in der Trachea wiederfinden.

Weiter wurde beobachtet, dass die weißen/farblosen Fasern sich bisher in einem auszählbaren Bereich bewegten. Für einen signifikanten Unterschied zu den Fasern beim Ersticken unter weicher Bedeckung müssten sich diese in einem solchen Fall in einem Größenbereich bewegen, in welchem sie nicht mehr auszählbar wären. Im Vergleich dazu bewegten sich die "anderen" Fasern in den Negativproben zwischen 4-10 Fasern/Probe und in der Validierung bei 1-17 Fasern/Probenaliquot, sodass sich diese beim Ersticken mit signifikantem Unterschied in einem auszählbaren Bereich bewegen würden.

Die "anderen" Faseranzahlen befinden sich mit Ausnahme eines Wertes (17 F/PA in WDF-Stufe 2) im Größenbereich bis 10 Fasern. In der Wiederfindung lagen die Werte mehrheitlich zwischen 2 und 8 Fasern/Probenaliquot und in der Präzision bei 1 bis 6 Fasern/Probenaliquot. Somit liegen die Werte der Kategorie "andere" insgesamt in einem begrenzten Bereich. Bei den Blindproben und Blanks wurden durchschnittlich 3,38 und 3,5 "andere" Fasern/Probe gefunden. Bei den Negativproben wurden durchschnittlich 7,67 "andere" Fasern gefunden. Demnach sind im Trachealsekret mehr andere Fasern zu finden. Die Faseranzahlen der "anderen" Fasern aus den Probenaliquoten von WDF und Präzision liegen durchschnittlich bei 3 "anderen" Fasern/PA (WDF-Stufe1), 9,5 "anderen" Fasern/PA (WDF-Stufe2), 4,25 "anderen" Fasern/PA (WDF-Stufe3) und 3,29 "anderen" Fasern, aus WDF-Stufe 2 38 "andere" Fasern, aus WDF-Stufe 3 17 "andere" Fasern und in der Probe aus der Präzision 23 "andere" Fasern. Diese Werte liegen über dem durchschnittlichen Wert der Negativproben. Allerdings muss beachtet werden, dass z.B. bei der Präzision die Probe in sieben Teile geteilt und aufbereitet wurde, sodass in jedem der sieben Teile
Kontamination eingebracht werden konnte. Überlegungen in Hinblick auf die Größe der Kontamination wären rein theoretischer Natur, da die Kontamination nicht vollends abschätzbar ist. Diese vorhandenen Daten bieten nur einen ersten Anhaltspunkt.

Zur praktischen Umsetzung der in dieser Studie entwickelten Methodik ist zu sagen, dass für das Handling und v.a. die Antikontaminationsmaßnahmen Übung von Vorteil ist, sodass eine Einführung in die Methode durch damit vertrautes Personal hilfreich wäre. Eine ausführliche Schrittfür-Schritt-Anleitung ist im Anhang zur Verfügung gestellt.

### 5.6 Weiße Fasern

Im folgenden Kapitel werden unter weißen Fasern auch farblose Fasern zusammengefasst. Die Hauptprobleme der weißen Fasern sind ihre erschwerte Erkennbarkeit auf anderen Oberflächen, etwa auf dem Filter oder in Matrixanhäufungen, sowie ihr ubiquitäres Vorkommen in der Umwelt und ihr dadurch großer Anteil an Kontaminationen (wie z.B. in den Blanks).

Durch die Verwendung von koaxialem Licht und Polarisationsfilter konnte die Detektierbarkeit der weißen Fasern zwar deutlich verbessert werden, in Einzelfällen könnten weiße Fasern trotzdem übersehen werden. Dieses Risiko ist bei schleimigen Matrixanhäufungen erhöht, da in den mukösen Anteilen bevorzugt Fasern haften bleiben und diese durch die Dichte und die faserähnliche Struktur des Schleims sowie den geringeren Farbkontrast zum Hintergrund übersehen werden können. Hinzu kommt, dass manche Fasern so schwach gefärbt sein können, dass sie farblos erscheinen (Robertson et al., 2017) und fälschlicherweise als farblos gezählt werden.

Es gab im Rahmen dieser Studie weitere Überlegungen weiße Fasern sichtbarer zu machen. Dazu gehörte eine Färbung der Fasern, z.B. mit Tusche. Allerdings sind verschiedene Faserarten - auch abhängig von der Vorbehandlung in der Produktion - verschiedenartig färbbar. Zudem müsste die Farbe vom Filter oder anderen Matrixbestandteilen wieder abwaschbar sein - oder sie dürften sich gar nicht erst anfärben - während die Fasern angefärbt bleiben müssten. Außerdem wäre durch die Färbung das Qualitätsmerkmal "Farbe" für weitergehende Untersuchungen nicht mehr verfügbar. Aus diesen Gründen wurde der Ansatz verworfen. Es wurden nicht viele Faserpopulationsstudien gefunden, die weiße Fasern mit einbeziehen. In den Studien, in denen sie erfasst wurden, gehörten sie zu der am häufigsten gefundenen Fasergruppe (s. 0). Auch im Rahmen dieser Studie machten sie den Hauptanteil an Faserkontaminationen der Proben aus (s. 5.4.1 und 5.5). *Aussagekraft weißer Fasern* 

Wie bereits in der Validierung (5.5) erläutert, konnte durch die hohen Schwankungen an weißen Fasern in den Probenaliquoten keine Aussage über die Wiederfindung von weißen Fasern getroffen werden. Somit kann die Methodik nicht für weiße Fasern validiert werden. Auch Robertson et al. (2017) kamen zu dem Schluss, dass farblose Baumwolle fast keine Beweiskraft hat, da sie ubiquitär vorhanden ist. Normalerweise werden in der Forensik "Zielfasern" in potenziellen Quellen gesucht, geborgen und miteinander verglichen. In den meisten Fällen erfolgt die Suche auf

Grund der Farbe, alternativ jedoch anhand von morphologischen Merkmalen (Robertson et al., 2017). Die Autoren präsentieren Fälle, in denen sich die "Zielfasern" nicht als solche eignen. Dazu gehören z.B. sehr häufig vorkommende Fasern, etwa farblose Baumwolle und blaue "Jeans" Baumwolle. Sie postulieren, dass farblose Fasern meist nicht geeignet sind, um auf einen Faser-transfer zu schließen. Ausnahmen könnten Fälle sein, in denen solche Fasern an Orten zu finden sind, an denen sie normalerweise nicht zu erwarten wären (Grieve und Biermann, 1997b). Anderseits würde es auch Fasern geben, die normalerweise eine hohe Aussagekraft hätten, durch ortsspezifische Gegebenheiten, etwa Arbeitskleidung, ihre Aussagekraft aber verlieren (Robertson et al., 2017). Dies wäre auf unsere Studie anwendbar, da das gesamte nicht an der Studie beteiligte Laborpersonal weiße Laborkittel aus Baumwolle trugen und zudem in den Proben viele weiße Baumwollfasern gesichtet wurden. Somit kommen zu den ohnehin häufig vorkommenden farblosen Fasern noch ortspezifische Gegebenheiten hinzu, welche deren Häufigkeit weiter erhöhen und ihren Wert weiter senken könnten. In nachfolgenden Studien bleibt zu prüfen, wie viel weiße Fasern in der Trachea zu finden sind. Bei Baeza-Martínez et al. (2022) waren 51% der in der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage detektierten Fasern weiß.

Als nicht geeignete Zielfasern postulieren Robertson et al. (2017) auch schwachgefärbte Fasern, da diese mikroskopisch farblos erscheinen. Hinzu kommen glatte, glänzende Stoffe, die auf Grund ihrer Beschaffenheit wenige Fasern abgeben, also eine geringe "Sheddability" haben. Als letzte ungeeignete Gruppe benennen sie Fasern aus Reißwolle. Reißwolle wird durch Recycling aus Textilresten hergestellt und sei dadurch so variabel, dass sich die Textilfasern nicht als "Zielfasern" eignen. Allgemein finden die Autoren, dass eine Faser umso besser analysierbar sei, je intensiver gefärbt und größer sie ist. Die Analyse von farblosen Fasern sei anspruchsvoll, da herkömmliche mikroskopische Untersuchungen sowie chemische Analysen auf Grund der ähnlichen Morphologie problematisch sind (Robertson et al., 2017).

### 5.7 Forensische Aspekte

Die Interpretation von Faserbefunden ist komplex. Roux und Robertson (2013) beschreiben, dass die Befunde über die grundliegenden Faktoren – Spurenrelevanz, Transfer und Persistenz sowie allgemeine Häufigkeit – hinaus betrachtet werden müssen. Hierbei sei allgemein bekannt, dass die Beweiskraft von Faserfunden von vielen, komplex interagierenden Faktoren abhänge. Diese seien in bekannte und unbekannte Faktoren einzuteilen. Zu den bekannten Faktoren gehören z.B. die Fallumstände, die Zeitspanne zwischen Tat und Faserfund, die Eignung der Fasertypen für die Spurensammlung und den Faservergleich, die Anzahl an übereinstimmenden Fasern, die Lokalisation der gesammelten Fasern sowie die Methoden der Faseruntersuchung. Zu den unbekannten Faktoren zähle z.B. das Ausmaß und die Kraft des Kontakts, das Sheddingpotenzial des Spendermaterials sowie die Häufigkeit des Faservorkommens übereinstimmender Fasern. Hierbei können bei Informationsmangel Simulationsexperimente notwendig sein (Roux and Robertson, 2013). Für die Beurteilung von Faserfunden stellen die Betrachtung von Fasertransfer, -persistenz, -häufigkeit, die Wahrscheinlichkeit für zufällige Übereinstimmungen und die statistische Interpretation wichtige Aspekte dar.

## 5.7.1 Faserhäufigkeit

#### Allgemein

Zur Abschätzung, wie wahrscheinlich eine bestimmte Faser unter bestimmten Fallumständen gefunden werden kann und wie wahrscheinlich eine bestimmte Faser ohne den fraglichen Kontakt gefunden werden kann, können Referenzsammlungen von Fasern, Datenerhebungen zur Faserhäufigkeit, Faserpopulationsstudien, Zielfaserstudien, Datensammlungen und Handelsanfragen betrachtet werden (Roux und Robertson, 2013, Robertson et al., 2017).

Faserpopulationsstudien untersuchen die normale Faserpopulation auf einer bestimmten Oberfläche (Roux und Robertson, 2013), dabei werden diese in Faserfarbe und –typ eingeteilt. Faserpopulationsstudien wurden z.B. von Grieve und Biermann (1997a), Roux und Margot (1997b), Massonnet et al. (1998), Cantrell et al. (1999, 2001), Was-Gubala und Chochól (2001), Palmer und Oliver (2004), Was-Gubala (2004), Watt et al. (2005), Marnane et al. (2006), Palmer und Burch (2009) erstellt. Roux und Robertson (2013) äußern, dass generell weitverbreitete Fasern selbstverständlich weniger signifikant seien, als seltene Fasern (s. auch 5.6)

Zielfaserstudien betrachten Zielfasern in der Faserpopulation einer Fläche und beantworten die Frage, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, eine bestimmte Faser auf einer zufälligen Oberfläche zu finden. Damit wird der Seltenheitswert einer Faser sowie ihre Übertragungs- und Persistenztendenz abgeschätzt (Roux und Robertson, 2013). Beispiele für Zielfaserstudien sind Cook und Wilson (1986), Jackson und Cook (1986), Cook et al. (1993), Palmer und Chinherende (1996), Brüschweiler und Grieve (1997), Cook et al. (1997), Kelly und Griffin (1998), Wiggins et al. (2004), Jones und Coyle (2011), Coyle et al. (2013), Palmer et al. (2015). Roux und Robertson (2013) geben an, dass die bisherigen Zielfaserstudien davon ausgehen, dass es auch auf häufig vorkommenden Materialien selten ist, eine bestimmte Faser zu finden. Das zufällige Vorhandensein zweier übereinstimmender Fasertypen sei extrem selten (Robertson et al., 2017). Auch Palmer et al. (2015) schätzen das Risiko, eine signifikante Anzahl an Fasern einer bestimmten Kombination aus Fasertyp und Faserfarbe zufällig auf einer Oberfläche zu finden, als sehr gering ein. Hier müsse kurz zuvor Kontakt zwischen Material und Faserspender gewesen sein (Roux und Robertson, 2013). Ausnahmen bilden eine geringe Anzahl übereinstimmender Fasern (<5) oder sehr häufig vorkommende Fasern (Robertson et al., 2017).

### Respirationstrakt

Auf Faserstudien, welche den Respirationstrakt betreffen, wurde an entsprechender Stelle bereits hingewiesen. Die im Lungengewebe gefundenen inhalierten Fasern wurden von Pauly et al. (1998) als sehr heterogen beschrieben, z.B. in Bezug auf Länge, Breite, Morphologie und Farbe. Es wurden Fasern mit >250µm Länge und sehr breite Fasern mit etwa 50µm gesichtet. Auch wurden beschädigte Fasern, die ausgefranst und entfärbt waren, gefunden. Die Fasern waren cellulosischer und chemischer Natur. Die in Baeza-Martínez et al. (2022) bronchoalveolärer Lavage detektierten Fasern waren 40,48% Rayon/Viskose, 19,05% Polyester, 16,67% Zellulose und 14,29% Baumwolle. Die durchschnittliche Größe der Fasern war 1,73±0,15mm. 38,61% waren <1mm groß, 51% der Fasern waren weiß, 23,96% blau, 7,29% rot, 6,25% schwarz und 6,25% braun.

In der Studie von Amato-Lourenço et al. (2021) konnten in 20 auf Mikroplastik untersuchten Lungenproben aus Autopsien insgesamt 4 Fasern mit einer Länge zwischen 8,12µm und 16,8µm gefunden werden. Häufiger fanden sie Partikel (n=33). Ebenso konnten Jenner et al. (2022) in insgesamt 13 Lungenproben 19 Chemiefasern mit einer Länge von 14-2475µm und einer Breite von 5-29µm und auch Partikel finden. Jun et al. (2021) konnten 105,4 bzw. 0,8/g Mikroplastik-fasern in Sputum und Nasenspülflüssigkeit nachweisen. Die Länge reichte von 20,5µm bis 2476,8µm im Sputum und 50,8-6200µm in der Nasenspülflüssigkeit. Die Breite der Fasern war <1,0-61,9µm im Sputum und 5-46,4µm in der Nasenspülflüssigkeit. Huang et al. (2022) untersuchten Sputumproben. Das Verhältnis von Plastikfasern zu Nicht-Plastikfasern war 32 zu 68% und das meiste Mikroplastik war <500µm lang. Die von Chen et al. (2022) gemessenen Mikrofasern in Lungengewebe waren hauptsächlich zwischen 1000 und 5000µm lang, die häufigsten Faserarten waren Baumwolle, Rayon, Polyester und Denim.

#### 5.7.2 Fasertransfer und Faserpersistenz

Die Frage nach der Wahrscheinlichkeit, mit der die Anzahl an Fasern und Fasertypen durch den vermuteten Kontakt verursacht wurden, kann durch das Wissen von Fasertransfer und Faserpersistenz unterstützt werden (Roux und Robertson, 2013). Dazu gehören auch die Sheddingeigenschaften des Materials. Die Anzahl der Fasern hängt von der Kontaktfläche, der Art des Kontakts (Kontaktanzahl, Druck, Reibung, Zeit, etc.), der Struktur von Spender- und Empfängermaterial, den Fasertypen (Gattung, Dichte, Durchmesser, etc.), der Faserlänge und den Bewegungen des Empfängers nach der Übertragung ab. Kleine Fasern an der äußeren Materialoberfläche übertragen sich leichter und persistieren länger (Roux und Robertson, 2013). Die Anzahl an übertragenen Fasern könne dabei von einzelnen bis zu mehreren Hundert Fasern reichen. Eine geringe Anzahl übereinstimmender Fasern könne eher für einen Sekundärtransfer oder weiteren Folgetransfer, als für einen Primärtransfer sprechen. Marnane et al. (2006) untersuchten die Anzahl farbiger Fasern auf sechs weißen T-Shirts, nachdem sie einen Tag lang getragen wurden. Es wurden 9.108 bis 13.925 Fasern gefunden. Solche Fasern könnten im Sinne eines Sekundärtransfers aspiriert werden und die Faseranzahl beeinflussen, ohne dass sie qualitativ dem T-Shirt als Tatwerkzeug zuzuordnen sind. Insgesamt ist die Interpretation von geringen Faseranzahlen vorsichtig zu gestalten: Je größer die Faseranzahl ist, desto geringer sei die Wahrscheinlichkeit diese durch Zufall detektiert zu haben (Roux and Robertson, 2013).

### Beeinflussende Faktoren der Faseraspiration

Es ist anzunehmen, dass die Faseraspiration u.a. durch das Spendermaterial, die auslösende Aktivität und die Aspiration selbst beeinflusst wird.

Die Spendermaterialien, z.B. Kissen, können verschieden viele Textilfasern abgeben. Die Beurteilung der Tendenz eines Materials, Fasern abzugeben, Sheddability oder Sheddingkapazität genannt, ist sehr wichtig in der quantitativen Betrachtung und der Interpretation von Faserfunden (De Wael et al., 2010, Schnegg et al., 2017, Koch and Nehse, 2020). Roux und Robertson (2013) vermuten, dass die Kontaktsimulation mit dem entsprechenden Material die zuverlässigste Methode sei, die Faseranzahl einzuschätzen. Da das Shedding einen so großen Einfluss auf die Faseranzahl hat, könne ohne seine Berücksichtigung und nur über die quantitative Betrachtung eines Faserfunds nicht auf die zugrundeliegende Tat geschlossen werden (Roux und Robertson, 2013, Schnegg et al., 2017). Zu den das Shedding beeinflussenden Faktoren gehört auch die auslösende Aktivität, da davon Druck und Reibung abhängen. Schnegg et al. (2017) beschreiben den Einfluss auf die Anzahl übertragener Fasern als eine Kombination aus Aktivität und Shedding-kapazität des Tatwerkzeugs. Sie stellen zudem die These auf, dass der Fasertransfer auch von dem Gesundheitszustand des Opfers und damit von der Gegenwehr des Opfers abhänge.

Hinsichtlich der Faseraspiration vermuten Pauly et al. (1998), dass vor allem bei Rauchern oder anderen Personen, deren Clearance-Mechanismen beeinträchtigt sind, Fasern in der Lunge verbleiben. Huang et al. (2022) stellten in ihren Sputumuntersuchungen fest, dass Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern mehr Mikroplastik (dies impliziert auch synthetische Fasern) eingeatmet hatten. Dabei könne davon ausgegangen werden, dass Mikroplastik aus Staub teilweise eingeatmet werde und in der Luftröhre und der Lunge verbleibe. Sie setzen außerdem die Mikroplastikinhalation in Verbindung mit invasiven Trachealuntersuchungen und postulieren, dass dies zu einer erhöhten Inhalation von Mikroplastik führen kann.

Chen et al. (2022) maßen im Lungengewebe höhere Faseranzahlen mit zunehmendem Alter. Zudem nehmen sie an, dass in großen Städten häufiger lange Fasern vorkommen, als in kleinen Städten oder abgelegenen Orten zu finden seien. Baeza-Martínez et al. (2022) konnten in ihrer Studie bei Frauen (27,3% der Teilnehmer) eine signifikant höhere Faseranzahl als bei Männern feststellen. Auch bei den Rauchern gab es signifikant höhere Faseranzahlen im Vergleich zu Nicht-Rauchern oder ehemaligen Rauchern. Genauso wiesen Berufe mit höherem Expositionsrisiko für Mikroplastik eine höhere Faseranzahl auf. Weiter wäre es interessant den Einfluss von Lungenerkrankungen, wie etwa der COPD, auf den Fasertransfer und die Faserpersistenz im Respirationstrakt zu betrachten. Informationen wie Beruf oder Nikotinkonsum sollten in zukünftigen Untersuchungen berücksichtigt werden.

Es stellt sich schließlich die Frage, ob es einen "normalen" Größenbereich an Fasern in der Lunge gibt. Sicher ist, dass eine Beurteilung der Faseranzahl ohne den Einfluss des Sheddings des Spendermaterials schwierig ist. Die Frage, ob mittels eines Grenzwertes auf ein Ersticken unter weicher Bedeckung geschlossen werden kann, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

### Ersticken unter weicher Bedeckung und Bayesianischer Ansatz

Bei hoher Anzahl an Fasern muss untersucht werden, ob dies durch einen Erstickungsvorgang oder durch alternative Wege - wie einer hohen Exposition - zu erklären ist. Diese Abwägung von Wahrscheinlichkeiten eruierten Schnegg et al. (2017). Hierfür verglichen sie die gemessene Faseranzahl auf dem Gesicht nach simuliertem Erstickungsvorgängen mit Kissen und nach auf den Kissen geschlafenen Nächten. Sie kamen zu dem Schluss, dass es bei einer geringen Anzahl an Zielfasern schwierig sei, eine Aussage über die den Fasertransfer auslösende Tätigkeit zu treffen. Sie beurteilten die Frage anhand des Bayesianisichen Ansatzes, der ein Abwägen von Wahrscheinlichkeiten durch Berechnung von Likelihood Ratios ist (Robertson et al., 2017), d.h. von Maßzahlen, die angeben, um welchen Faktor ein Ergebnis unter Betroffenen – hier den Erstickten unter weicher Bedeckung – häufiger vorkommt, als unter Nicht-Betroffenen – hier den nur auf Kissen Schafenden. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass der Bayesianische Ansatz die Hypothese des Erstickens unter weicher Bedeckung durch Faserfund eher unterstütze, als dass es den Faserfund durch Schlaf auf dem entsprechenden Textil erkläre.

Um die Wahrscheinlichkeiten adäquat berechnen zu können empfehlen Schnegg et al. (2017) die Fallsimulation. Für die Simulationen – die ggf. mit dem vermuteten Tatwerkzeug durchgeführt werden kann – benutzten sie zwei Kissen, von denen eines eine niedrige und eines eine mittlere Sheddability hatte. Beim Erstickungsszenario bewegte sich die Anzahl an übertragenen Fasern für beide Kissen im selben Bereich, wie die Anzahl an übertragener Fasern von dem Kissen mit der mittleren Sheddability beim Schlafszenario. Sie schlussfolgerten daraus, dass die Sheddingkapazität möglicherweise einen größeren Einfluss auf die Faserübertragung hat, als der Tathergang. Ferner wurden bei Betrachtung desselben Kissens während des Schlafens weniger Fasern übertragen als während der Erstickungssimulation. Dies unterstütze die These, dass beim Schlafen durch die geringere Reibung und Kontaktintensität weniger Fasern übertragen werden. War der Tathergang mit geringer Intensität durchgeführt worden, konnte beinahe dieselbe Faseranzahl wie beim Schlafen festgestellt werden. Sie geben zu bedenken, dass dies bei Personen, die sich nicht wehren können, der Fall sein könnte. Daher sollen geringe Fasermengen mit Vorsicht interpretiert werden (Schnegg et al., 2017).

### Schlussfolgerungen und Ausblick

Es wurde eine Methode entwickelt, um farbige Fasern quantitativ zu erfassen. Es ist fraglich, ob die alleinige Betrachtung des quantitativen Aspekts bei der Detektion von Ersticken unter weicher Bedeckung ausreichend ist. Der Grund ist, dass die Faseranzahl nicht alleinig durch den Tathergang beeinflusst wird und Fasern ubiquitär vorhanden sind - selbst in Sputum, Nasenspülflüssigkeit und Lunge. Die Methode könnte vielmehr bei bestehendem Verdacht zur Faserdetektion dienen und bei hohen Faseranzahlen Anlass für weitere Untersuchungen geben. Zudem könnte routinemäßig Trachealsekret gewonnen und asserviert werden. Bei Ausschluss anderer Todesursachen könnte diese dann als Option mit ausgewertet werden. Vermutlich werden Shedding und Zielfaservergleiche weiter eine Rolle spielen. Hierfür können die mit der Methode detektierten Fasern mit dem vermuteten Tatwerkzeug verglichen und weitergehend untersucht werden. Die Kombination aus quantitativer und qualitativer Betrachtung wird vermutlich zielführend sein.

Zudem könnten in Zukunft Erstickungssimulationen mit Stoffen verschiedener Sheddabilty durchgeführt werden. Als zusätzlicher Schritt könnte untersucht werden, wie viele von diesen eingeatmeten Fasern tatsächlich durch die Tracheallavage erfasst werden. Schließlich könnte noch überprüft werden, ob sich die Fasern bevorzugt in der Trachea, der Mundhöhle oder der Lunge ansammeln. Letztere wären nicht für die Tracheallavage zugänglich, jedoch könnten auch diese mit der Filtrationsmethodik detektiert werden.

### 6 Zusammenfassung

Das Ersticken unter weicher Bedeckung ist ein spurenarmes Tötungsdelikt. Da es sich bei den verwendeten Tatwerkzeugen meist um textile Materialien handelt, werden Fasern beim Tathergang aspiriert und in Trachealflüssigkeit gefunden. Ziel dieser Studie ist die Entwicklung einer Methode zur quantitativen Bestimmung von Textilfasern in der Trachealflüssigkeit. Aufbauend darauf sollten zukünftig u.a. die Faserpopulationen der Trachealflüssigkeiten nicht-erstickter Verstorbener bestimmt und darauf basierend Faseranzahlen abgegrenzt werden, die quantitativ für ein Ersticken unter weicher Bedeckung sprechen.

Die Methodik ist in Abbildung 69 zusammengefasst. Eine ausführliche, Schritt-für-Schritt-Anleitung zur praktischen Anwendung ist dem Anhang beigefügt. Die Validierung der Methode zeigt, dass sie mit einer Gesamtwiederfindungsrate von 89,4%, für die Konzentrationen von 50, 70 und 90 Fasern/Probe geeignet ist, um gefärbte Fasern zu detektieren. Dabei liegt das 95%-Konfidenzintervall der Präzision zwischen 61,06 und 67,83 Fasern bei einem Soll-Wert von 70 Fasern und somit zwischen 87,2% und 96,9%. Für weiße Fasern kann die Methodik nicht validiert werden, da die Werte hohen Schwankungen unterlagen und diese nicht von Fremdfaserkontaminationen unterscheidbar sowie ubiquitär vorhanden waren.

Die hohe Faserbelastung der Umgebung konnte aufgezeigt und die Effizienz der Antikontaminationsmaßnahmen inkl. Spül- und Reinigungsvorgänge bewiesen werden. Dies spiegelt sich in diversen Beobachtungen während der Methodenentwicklung, Trendergebnissen während der Validierung und den Ergebnissen der Aktiv- und Passivproben wider. Der Nutzen der Spülmaßnahmen wurde auch durch Reduktion der Fremdfaserbelastung in den Blindproben gezeigt. Die Fremdfaserkontamination wurde durch Blindproben aus dem Sektionssaal, sog. Blanks, mit 17,75 Fasern/Probe bestimmt. In den Blindproben aus dem Labor betrug die Fremdfaserkontamination 12,88 Fasern/Probe. Die Untersuchung von Tracheallavageproben als sog. Negativproben ergab durchschnittlich 92 Fasern/Probe.

Die Methodik erfüllt den Zweck der quantitativen Faserbestimmung farbiger Fasern. Allerdings sind noch weitere Untersuchungen zum besseren Verständnis des Fasertransfers beim Ersticken unter weicher Bedeckung notwendig. Ob sich das Ersticken unter weicher Bedeckung allein quantitativ bestimmen lässt, oder ob eine Kombination aus quantitativen und qualitativen Untersuchungen zielführend ist, muss im Rahmen künftiger Forschung untersucht werden.

75



Abbildung 69: Zusammenfassung der Methodik

## 7 Literaturverzeichnis

- AMATO-LOURENÇO, L. F., CARVALHO-OLIVEIRA, R., JÚNIOR, G. R., DOS SANTOS GALVÃO, L., ANDO, R. A. & MAUAD, T. 2021. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *Journal of Hazardous Materials*, 416, 126124.
- BAEZA-MARTÍNEZ, C., OLMOS, S., GONZÁLEZ-PLEITER, M., LÓPEZ-CASTELLANOS, J., GARCÍA-PACHÓN, E., MASIÁ, M., HERNÁNDEZ-BLASCO, L. & BAYO, J. 2022. First evidence of microplastics isolated in European citizens' lower airway. J Hazard Mate,. 15;438:129439.
- BANASCHAK, S., SCHMIDT, P. & MADEA, B. 2003. Smothering of children older than 1 year of age-diagnostic significance of morphological findings. *Forensic Science International*, 134, 163-168.
- BARKER, K. G., PIOTROWSKI, M. & BARKER, K. 2013. Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger, Springer Spektrum.
- BERGER, W., FAULSTICH, H., FISCHER, P., HEGER, A., JACOBASCH, H.-J., MALLY, A., MIKUT, I. & BOBETH, W. 1993. *Textile Faserstoffe : Beschaffenheit und Eigenschaften*, Springer Berlin Heidelberg, 369.
- BODE, A., HARDT, P., PÖHLING, M., RAUCH, W., SCHRÖDER, V., TAUSCH, M., TIEDEMANN, W., UPPENKAMP, M. & VIELFORT, A. 2007. *Textilchemie* [Online]. Fonds der Chemischen Industrie im Verband der Chemischen Industrie e. V. Available: https://www.vci.de/fonds/schulpartnerschaft/unterrichtsmaterialien/textilchemie.jsp [Accessed 31.03.2022].
- BOHNERT, M., GROßE PERDEKAMP, M. & POLLAK, S. 2005. Three subsequent infanticides covered up as SIDS. *International Journal of Legal Medicine*, 119, 31.
- BRINKMANN, B., FECHNER, G. & PÜSCHEL, K. 1984. Identification of mechanical asphyxiation in cases of attempted masking of the homicide. *Forensic Science International*, 26, 235-245.
- BRÜSCHWEILER, W. & GRIEVE, M. C. 1997. A study on the random distribution of a red acrylic target fibre. *Science & Justice*, 37, 85-89.
- BURCH, H. J. 2008. The Transfer and Persistence of Fibres on Bare Skin. *Doctoral dissertation, MSc Thesis. University of Strathclyde: Centre for Forensic Science.*
- CAMMAROTA, V., SCHNEGG, M. & MASSONNET, G. 2019. A study of background population of fibres on knife blades. *Forensic Science International*, 296, 132-143.
- CANTRELL, S., ROUX, C., MAYNARD, P. & ROBERTSON, J. 2001. A textile fibre survey as an aid to the interpretation of fibre evidence in the Sydney region. *Forensic Science International*, 123, 48-53.
- CANTRELL, S., ROUX, C. & ROBERTSON, J. 1999. The population of textile fibres on cinema seats in the Sydney region. *Proceedings 7th Meeting of the European Fibres Group*, 86-90.
- CHEN, Q., GAO, J., YU, H., SU, H., YANG, Y., CAO, Y., ZHANG, Q., REN, Y., HOLLERT, H., SHI, H., CHEN, C. & LIU, H. 2022. An emerging role of microplastics in the etiology of lung ground glass nodules. *Environmental Sciences Europe*, 34(1), 25.

- CLAESSENS, M., MEESTER, S. D., LANDUYT, L. V., CLERCK, K. D. & JANSSEN, C. R. 2011. Occurrence and distribution of microplastics in marine sediments along the Belgian coast. *Marine Pollution Bulletin*, 62, 2199-2204.
- COOK, R., SALTER, M. & O'CONNOR, A. M. 1993. The significance of finding extraneous fibres on clothing. *IAFS, Dusseldorf.*
- COOK, R., WEBB-SALTER, M. T. & MARSHALL, L. 1997. The significance of fibres found in head hair. *Forensic Science International*, 87, 155-160.
- COOK, R. & WILSON, C. 1986. The significance of finding extraneous fibres in contact cases. *Forensic Science International*, 32, 267-273.
- CORDINER, S. J., STRINGER, P. & WILSON, P. D. 1985. Fibre Diameter and the Transfer of Wool Fibres. *Journal of the Forensic Science Society*, 25, 425-426.
- COXON, A., GRIEVE, M. & DUNLOP, J. 1992. A method of assessing the fibre shedding potential of fabrics. *Journal of the Forensic Science Society*, 32, 151-158.
- COYLE, T., SHAW, C. & STEVENS, L. 2013. The evidential value of fibres used in 'Hi-Vis' work wear. *Journal of American Society of Trace Evidence Examiners*, 4, 2-16.
- DE WAEL, K., GASON, F. 2008. Microfibre transfer experiments. *Global Forensic Science Today 4*, 31-37.
- DE WAEL, K., LEPOT, L., LUNSTROOT, K. & GASON, F. 2010. Evaluation of the shedding potential of textile materials. *Science & Justice*, 50, 192-194.
- DETTMEYER, R. 2011. Forensic histopathology : fundamentals and perspectives, Heidelberg [u.a.] Springer, 2011, 274-275.
- DETTMEYER, R., SCHÜTZ, H. & VERHOFF, M. A. 2014. *Rechtsmedizin*, Berlin Heidelberg Springer, 2014. 2., aktualisierte Auflage, 86, 89.
- DRIS, R., GASPERI, J., MIRANDE, C., MANDIN, C., GUERROUACHE, M., LANGLOIS, V. & TASSIN, B. 2017. A first overview of textile fibers, including microplastics, in indoor and outdoor environments. *Environmental Pollution*, 221, 453-458.
- DRIS, R., GASPERI, J., SAAD, M., MIRANDE, C. & TASSIN, B. 2016. Synthetic fibers in atmospheric fallout: A source of microplastics in the environment? *Marine Pollution Bulletin*, 104, 290-293.
- EMERY, J. L. & EMERY, J. L. 1985. Infanticide, filicide, and cot death. Archives of Disease in Childhood, 60, 505.
- FICKER, J. H. 2008. Physiologie und Pathophysiologie der bronchialen Sekretion. *Pneumologie*, 62, 11-13.
- FISCHER, J. 1968. Die kriminalpolizeiliche Todesermittlung, Bundeskriminalamt.
- FRIES, E., DEKIFF, J. H., WILLMEYER, J., NUELLE, M.-T., EBERT, M. & REMY, D. 2013. Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environmental Science: Processes* & Impacts, 15, 1949-1956.

- GASPERI, J., WRIGHT, S. L., DRIS, R., COLLARD, F., MANDIN, C., GUERROUACHE, M., LANGLOIS, V., KELLY, F. J. & TASSIN, B. 2018. Microplastics in air: Are we breathing it in? *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 1, 1-5.
- GILLISSEN, A. 2020. Über die Spülflüssigkeit der Lunge der Erkrankung auf die Spur kommen. *Pneumo News*, 12, 44-50.
- GRIEVE, M. C. 2000. Back to the future–40 years of fibre examinations in forensic science. *Science & Justice*, 40, 93-99.
- GRIEVE, M. C. & BIERMANN, T. 1997a. The population of coloured textile fibres on outdoor surfaces. *Science & Justice*, 37, 231-239.
- GRIEVE, M. C. & BIERMANN, T. W. 1997b. Wool fibres-transfer to vinyl and leather vehicle seats and some observations on their secondary transfer. *Science & Justice*, 37, 31-38.
- GRIEVE, M. C., DUNLOP, J. & HADDOCK, P. S. 1989. Transfer experiments with acrylic fibres. *Forensic Science International*, 40, 267-277.
- HAMMER, G. P., DU PREL, J.-B. & BLETTNER, M. 2009. Vermeidung verzerrter Ergebnisse in Beobachtungsstudien. *Deutsches Ärzteblatt*, 106, 664-668.
- HERKNER, H. & MÜLLNER, M. 2011. Verblindung und Bias. In: HERKNER, H. & MÜLLNER, M. (eds.) Erfolgreich wissenschaftlich arbeiten in der Klinik: Grundlagen, Interpretation und Umsetzung: Evidence Based Medicine. Vienna: Springer Vienna, 61-67
- HEROLD, G. 2019. Innere Medizin 2019, De Gruyter, 349, 361.
- HERRMANN, B., DETTMEYER, R., BANASCHAK, S. & THYEN, U. 2016. Kindesmisshandlung : Medizinische Diagnostik, Intervention und rechtliche Grundlagen / von Bernd Herrmann, Reinhard Dettmeyer, Sibylle Banaschak, Ute Thyen, Berlin, Heidelberg s.l. Springer Berlin Heidelberg, 2016, 117.
- HICKS, L. J., SCANLON, M. J., BOSTWICK, T. C. & BATTEN, P. J. 1990. Death by smothering and its investigation. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 11(4), 291-293.
- HIDALGO-RUZ, V., GUTOW, L., THOMPSON, R. C. & THIEL, M. 2012. Microplastics in the Marine Environment: A Review of the Methods Used for Identification and Quantification. *Environmental Science & Technology*, 46, 3060-3075.
- HONG, S., HAN, A., KIM, S., SON, D. & MIN, H. 2014. Transfer of fibres on the hands of living subjects and their persistence during hand washing. *Science & Justice*, 54, 451-458.
- HUANG, S., HUANG, X., BI, R., GUO, Q., YU, X., ZENG, Q., HUANG, Z., LIU, T., WU, H., CHEN, Y., XU, J., WU, Y. & GUO, P. 2022. Detection and Analysis of Microplastics in Human Sputum. *Environmental Science & Technology*, 56, 2476-2486.

HUMPHRIES, M. 2009. Fabric Reference, Pearson Prentice Hall, 14-26, 91-102.

HÜTER-BECKER, A. & BACHA, S. 2005. Behandeln in der Physiotherapie, Thieme.

- IMHOF, H. K., SCHMID, J., NIESSNER, R., IVLEVA, N. P. & LAFORSCH, C. 2012. A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnology and oceanography: methods*, 10, 524-537.
- JACKSON, G. & COOK, R. 1986. The significance of fibres found on car seats. *Forensic Science International*, 32, 275-281.
- JANG, S. J., PARK, J. H., KIM, Y. J., HAM, S. H., JO, N. Y. & HA, H. 2013. Death by homicidal smothering using hot steam towel: a case report. *Korean Journal of Legal Medicine*, 37, 90-92.
- JENNER, L. C., ROTCHELL, J. M., BENNETT, R. T., COWEN, M., TENTZERIS, V. & SADOFSKY, L. R. 2022. Detection of microplastics in human lung tissue using μFTIR spectroscopy. *Science of The Total Environment*, 831, 154907.
- JONES, J. & COYLE, T. 2011. Synthetic flock fibres: A population and target fibre study. *Science & Justice*, 51, 68-71.
- JUN, -. N., YI-HANG, -. G., YING, -. J., RUIXUE, -. M., ZHONGBO, -. C., YUTAO, -. Z., JINCHI, -. H., LI, -. L., WEI, -. S., GUOWEI, -. P., LINGJUN, -. Y. & ZUOSEN, -. Y. 2021. - Microplastics detected in sputum and nasal lavage fluid of couriers: a pilot study. - Chinese Journal of Public Health, 37(3), 451-454.
- KEIL, W. & BERZLANOVICH, A. 2010. Ersticken durch weiche Bedeckung. *Rechtsmedizin*, 20, 519-528.
- KELLY, E. & GRIFFIN, R. M. E. 1998. A target fibre study on seats in public houses. *Science & Justice*, 38, 39-44.
- KIDD, C. B. M. & ROBERTSON, J. 1982. The Transfer of Textile Fibres During Simulated Contacts. *Journal of the Forensic Science Society*, 22, 301-308.
- KLASMEIER, J. & WISSING, M. 2016. Waschmaschinenablauf als mögliche Eintragsquelle von Textilfasern (Mikroplastik) in Gewässer. *Institut für Umweltsystemforschung, Universität Osnabrück, Studie erstellt im Auftrag des NLWKN, Januar 2017.*
- KLEIST, P. Bias in Beobachtungsstudien. 2010. Swiss Medical Forum, 10, 35, 580-583.
- KOCH, S. & NEHSE, K. 2020. Fibers. Handbook of Trace Evidence Analysis, 322-376.
- KROMIDAS, S. & ERMER, J. 2000. *Handbuch Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH, 11, 31, 47, 69, 72, 77, 187.
- MADEA, B. 2014. Handbook of Forensic Medicine, Hoboken Wiley, 404-406.
- MARNANE, R. N., ELLIOT, D. A. & COULSON, S. A. 2006. A Pilot Study to Determine the Background Population of Foreign Fibre Groups on a cotton/polyester T-shirt. *Science & Justice*, 46, 215-220.
- MASSONNET, G., SCHIESSER, M. & CHAMPOD, C. 1998. Population of textile fibres on white T-shirts. *Proceedings of the 6th European Fibres Group Meeting, Dundee*, 76-80.

MATTHYS, H. & SEEGER, W. 2008. Klinische Pneumologie, Springer, 39-40.

- MOORE, J. E., JACKSON, G. & FIRTH, M. 1986. Movement of Fibres between Working Areas as a Result of Routine Examination of Garments. *Journal of the Forensic Science Society*, 26, 433-440.
- NUELLE, M.-T., DEKIFF, J. H., REMY, D. & FRIES, E. 2014. A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental Pollution*, 184, 161-169.
- OPPERSKALSKI, S., SIEW, S., TAN, E. & TRUSCOTT, L. 2020. Preferred Fiber & Materials Market Report 2020 [Online]. *Textile Exchange*. Available: https://store.textileexchange.org/product-category/corporate-fiber-materials-reports/ [Accessed 31.03.2022].
- PALMER, R. & BANKS, M. 2005. The secondary transfer of fibres from head hair. *Science & Justice*, 45, 123-128.
- PALMER, R. & BURCH, H. J. 2009. The population, transfer and persistence of fibres on the skin of living subjects. *Science & Justice*, 49, 259-264.
- PALMER, R., BURNETT, E., LUFF, N., WAGNER, C., STINGA, G., CARNEY, C. & SHERIDAN, K. 2015. The prevalence of two 'commonly' encountered synthetic target fibres within a large urban environment. *Science & Justice*, 55, 103-106.
- PALMER, R. & CHINHERENDE, V. 1996. A target fiber study using cinema and car seats as recipient items. *Journal of Forensic Science*, 41, 802-803.
- PALMER, R. & OLIVER, S. 2004. The population of coloured fibres in human head hair. *Science & Justice*, 44, 83-88.
- PALMER, R. & POLWARTH, G. 2011. The persistence of fibres on skin in an outdoor deposition crime scene scenario. *Science & Justice*, 51, 187-189.
- PARYBYK, A. E. & LOKAN, R. J. 1986. A Study of the Numerical Distribution of Fibres Transferred From Blended Fabrics. *Journal of the Forensic Science Society*, 26, 61-68.
- PAULY, J. L., STEGMEIER, S. J., ALLAART, H. A., CHENEY, R. T., ZHANG, P. J., MAYER, A. G. & STRECK, R. J. 1998. Inhaled cellulosic and plastic fibers found in human lung tissue. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, 7(5), 419-428.
- POUNDS, C. A. & SMALLDON, K. W. 1975a. The Transfer of Fibres Between Clothing Materials During Simulated Contacts and their Persistence During Wear: Part I—Fibre Transference. *Journal of the Forensic Science Society*, 15, 17-27.
- POUNDS, C. A. & SMALLDON, K. W. 1975b. The Transfer of Fibres between Clothing Materials During Simulated Contacts and their Persistence During Wear: Part II—Fibre Persistence. *Journal of the Forensic Science Society*, 15, 29-37.
- POUNDS, C. A. & SMALLDON, K. W. 1975c. The Transfer of Fibres Between Clothing Materials During Simulated Contacts and Their Persistence During Wear: Part III — A Preliminary Investigation of the Mechanisms Involved. *Journal of the Forensic Science Society*, 15, 197-207.
- PRATA, J. C. 2018. Airborne microplastics: Consequences to human health? *Environmental Pollution*, 234, 115-126.

PROKOP, O. G. 1960. Lehrbuch der gerichtlichen Medizin, Verlag Volk und Gesundheit.

- ROBERTSON, J., KIDD, C. B. M. & PARKINSON, H. M. P. 1982. The persistence of textile fibres transferred during simulated contacts. *Journal of the Forensic Science Society*, 22, 353-360.
- ROBERTSON, J., ROUX, C. & WIGGINS, K. G. 2017. *Forensic examination of fibres*, CRC press, 25, 46-48, 61-64, 109, 122-123, 146-148, 206, 319, 381, 391, 422.
- ROBSON, R. & COYLE, T. 2001. Anti Contamination Procedures for Textile Fibre Examination–a Discussion Document. *Problems of Forensic Sciences*, 46, 236-238.
- ROUX, C., CHABLE, J. & MARGOT, P. 1996. Fibre transfer experiments onto car seats. *Science & Justice*, 36, 143-151.
- ROUX, C., HUTTUNEN, J., RAMPLING, K. & ROBERTSON, J. 2001. Factors affecting the potential for fibre contamination in purpose-designed forensic search rooms. *Science & Justice*, 41, 135-144.
- ROUX, C. & MARGOT, P. 1997a. An attempt to assess the relevance of textile fibres recovered from car seats. *Science & Justice*, 37, 225-230.
- ROUX, C. & MARGOT, P. 1997b. The population of textile fibres on car seats. *Science & Justice*, 37, 25-30.
- ROUX, C. & ROBERTSON, J. 2013. Interpretation of fiber evidence. *Encyclopedia of Forensic Sciences: Second Edition.* Elsevier Inc., 155-160
- SALTER, M. T., COOK, R. & JACKSON, A. R. 1987. Differential shedding from blended fabrics. *Forensic Science International*, 33, 155-164.
- SCHMELING, A., FRACASSO, T., PRAGST, F., TSOKOS, M. & WIRTH, I. 2009. Unassisted smothering in a pillow. *International journal of legal medicine*, 123, 517-9.
- SCHNEGG, M., TURCHANY, M., DEVITERNE, M., GUEISSAZ, L., HESS, S. & MASSONNET, G. 2017. A preliminary investigation of textile fibers in smothering scenarios and alternative legitimate activities. *Forensic Science International*, 279, 165-176.
- SCHWENDENER, G., MORET, S., CAVANAGH-STEER, K. & ROUX, C. 2016. Can contamination occur in body bags? The example of background fibres in body bags used in Australia. *Forensic Science International*, 266, 517-526.
- SCHYMA, C. & MADEA, B. 2011. Comments on unassisted smothering in a pillow. International journal of legal medicine, 125, 155-156.
- SHERIDAN, K. J., SALTUPYTE, E., PALMER, R. & GALLIDABINO, M. D. 2020. A study on contactless airborne transfer of textile fibres between different garments in small compact semi-enclosed spaces. *Forensic Science International*, 315, 110432.
- SKOKAN, L., TREMBLAY, A. & MUEHLETHALER, C. 2020. Differential shedding: A study of the fiber transfer mechanisms of blended cotton and polyester textiles. *Forensic Science International*, 308, 110181.

- SOENTGEN, J. & VÖLZKE, K. 2006. *Staub Spiegel der Umwelt*. Oekom Verlag Germany, Europe.
- TÜRK, O. 2014. Stoffliche Nutzung nachwachsender Rohstoffe: Grundlagen Werkstoffe Anwendungen, Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden.
- ULMER, W. T., KAMMLER, E., HILPERT, P., STENDER, H. S., RASCHE, B., HARTUNG, W., FABEL, H., BACHOFEN, H., FUCHS, E. & FERLINZ, R. 1979. *Bronchitis Asthma Emphysem*, Springer., 205-206, 219.
- UMWELTBUNDESAMT. 2019. *Textilindustrie* [Online]. Available: https://www.umweltbundesamt.de/themen/wirtschaftkonsum/industriebranchen/textilindustrie#die-textilindustrie-in-deutschland [Accessed 31.03.2022].
- VIANELLO, A., JENSEN, R. L., LIU, L. & VOLLERTSEN, J. 2019. Simulating human exposure to indoor airborne microplastics using a Breathing Thermal Manikin. *Scientific Reports*, 9, 8670.
- WAS-GUBALA, J. 2004. Comparative population studies of fibres secured in Poland, Czech Republic and Germany. *Problems of Forensic Sciences*, 60, 58-77.
- WAS-GUBALA, J. & CHOCHÓL, A. 2001. A population study of fibres found on bus seats in Cracow. *Problems of Forensic Sciences*, 46, 249-254.
- WATT, R., ROUX, C. & ROBERTSON, J. 2005. The population of coloured textile fibres in domestic washing machines. *Science & Justice*, 45, 75-83.
- WETZER, E. & LOHNINGER, H. 2018. Image Processing using Color Space Models for Forensic Fiber Detection. *IFAC-PapersOnLine*, 51, 445-450.
- WIGGINS, K., DRUMMOND, P. & HICKS CHAMPOD, T. 2004. A study in relation to the random distribution of four fibre types on clothing (incorporating a review of previous target fibre studies). *Science & Justice*, 44, 141-148.
- WIRTH, I., STRAUCH, H. & SCHMELING, A. 2007. Latency problems with smothering using soft cover. *Archiv für Kriminologie*, 219 (5-6), 169-179.
- WOODALL, L. C., GWINNETT, C., PACKER, M., THOMPSON, R. C., ROBINSON, L. F. & PATERSON, G. L. J. 2015. Using a forensic science approach to minimize environmental contamination and to identify microfibres in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 95, 40-46.

## 8. Thesen

1. Das Ersticken unter weicher Bedeckung als ein spurenarmes Tötungsdelikt bedarf der Entwicklung weiterer Nachweisverfahren und -prozedere. Eine solcher Ansatz könnte bei der Grundannahme einer Faseraspiration im Sinne eines quantitativen Fasernachweises entwickelt werden.

 Die in der Literatur beschriebene Zentrifugation ist nicht geeignet, um Fasern in der Trachealflüssigkeit quantitativ darzustellen. Der Grund ist, dass Fasern sich nicht zuverlässig im Sediment absetzen.

3. Durch Filtration können die Trachealflüssigkeit und die Fasern voneinander getrennt werden.

4. Bei Vergleich der verwendeten Filter und Membranen konnten auf Nylonnetzfilter die Fasern am besten dargestellt werden.

5. Organische Bestandteile können die Fasermikroskopie erschweren. Dies kann mittels Vorfiltrierung sowie chemischer und physikalischer Behandlung minimiert werden.

6. Die Einbettung von Filtern, Dichtungsgummi und oberer Lochplatte bildet zusammen mit der Druckluftbehandlung und der mikroskopischen Auswertung der oberen Filterhalterhälfte wichtige Aspekte der Faserdarstellung.

7. Die Kontaminationen der Proben durch Umgebungsfasern stellte ein großes Problem dar. Mittels Antikontaminationsmaßnahmen und Spülprozesse konnte die Kontamination mit durchschnittlich 17,75 Fasern pro Probe relativ geringgehalten werden.

8. Eine große Herausforderung war die Darstellung weißer und farbloser Fasern. Deren Darstellung wurde durch die Benutzung eines Polarisationsfilters während der mikroskopischen Auswertung deutlich verbessert.

9. Die Methodik, bestehend aus Probenvorbereitung und Faserdarstellung, konnte für bunte Faserkonzentrationen von 50, 70 und 90 Fasern pro Probe mit einer Wiederfindungsrate von 89,44% und mit einer Präzision zwischen 87,23% und 96,89% validiert werden.

10. Für weiße/farblose Fasern konnte die Methodik nicht validiert werden. Zudem besitzen weiße/farblose Fasern einen fraglichen Beweiswert.

# Anhang

# Anhangsverzeichnis:

Anhang 1: Erfassungsbögen der Probengewinnung und Faseranzahl Anhang 2: Schritt-für-Schritt-Anleitungen

# Anhang 1: Erfassungsbögen der Probengewinnung und Faseranzahl

Tabelle 16: Erfassungbogen Probengewinnung

Code	
Datum der Probengewinnung	
Alter	
Geschlecht	
Auffindeort	
Todeszeitpunkt	
Befund Mundhöhle/Trachea/Lunge	
Lungenödem	
Aspiration	
Vorerkrankungen	
Sektionsdiagnose A-C	
Lokalisation (Trachea/Larynx/Rachen)	
Einsicht	
Bereits intubiert	
Verwendung des Laryngoskops	
Makroskopie und Volumen der Probe	
Datum der Aufbereitung	
Faseranzahl pro ml und Filter	
u.U. Fasergröße	
u.U. Faserfarbe und – merkmale	
Ausschluss (ja/nein)	
Anmerkungen	

Tabelle 17: Erfassungbogen Faseranzahl

Porengröße Filterhalter in µm		100	41	11	5
Faseranzahl	Halter	Х	Х	Х	Х
	Filter	Х	Х	Х	Х
	Gummi	Х	Х	Х	Х
	KB I	Х	Х	Х	Х
	KB II	Х	Х	Х	Х
	Gesamt	Х	Х	Х	Х
		Faseranzahl/xx ml			
Gesamt		X			

## Anhang 2: Schritt-für-Schritt-Anleitungen

Gliederung:

Grundsätze

Arbeitsanleitung Probengewinnung/Tracheallavage

- a) Benötigte Materialien
- b) Durchführung

Arbeitsanleitung Probenvorbereitung und Darstellung

- a) Benötigte Materialien
- b) Arbeitsanleitung Probenvorbereitung
  - -Herstellung einer verdünnten Ameisensäurelösung
    - Durchführung der Probenvorbereitung
- c) Arbeitsanleitung Faserdarstellung
  - Einbettung -
  - -Mikroskopie
- d) Arbeitsanleitung Materialreinigung

# Grundsätze

Arbeitskleidung:

- Sektionskittel (siehe Abbildung 17)
- o Nitril-Einweghandschuhe, welche über das Handgelenk reichen
- o Haarnetz
- o Mundschutz
- Laborgeeignete Hose und festes Schuhwerk
- Schutzbrille
- Der mögliche Eintrag von Fremdfasern, im Sinne einer Kontamination, durch die Luft oder andere Materialien ist zu minimieren. Dies impliziert die Abdeckung aller Gefäße zwischen jedem Arbeitsschritt sowie die gründliche Spülung der Materialien vor jedem Arbeitsschritt. Auch der Kontakt mit Arbeitsflächen sollte so gering wie möglich gehalten werden.
- Der Abzug ist immer geschlossen zu halten.
- Alle Materialen werden vor Gebrauch gründlich gespült. Dies beinhaltet eine Reinigung unter fließendem Wasser mit entsprechendem Wasserdruck sowie eine anschließende kurze Spülung mit Aqua dest..
- Alle Arbeitsflächen müssen vor Gebrauch gewischt werden. Hierfür eignet sich ein im Haushalt übliches fusselarmes Schwammtuch.
- Alle Deckel und Petrischalen werden mit dem Boden in Richtung Arbeitsfläche abgelegt, sodass die Öffnung nach oben zeigt.
- Die Spritze wird über einem Becherglas von dem Filterhalter abgeschraubt, da ansonsten Flüssigkeit daneben tropft und für die Auswertung verloren geht.
- Der Verbindungsschlauch für das Absauggerät kann mehrfach verwendet werden, solange er nicht mit Sekreten kontaminiert wird.
- Auch die Katheterspritze kann ggf. wiederverwendet werden.

# Arbeitsanleitung Probengewinnung/Tracheallavage

- a. Benötigte Materialien
- Kunststoffbehälter mit Deckel (z.B. Versandgefäß aus PP mit Schraubverschluss, 50ml, Diagonal GmbH, Münster, Deutschland)
- Katheterspritze ohne Nadel 50ml (z.B. TERUMO SYRINGE without needle, steril, Catheter Tip 50ml, REF SS+50C1, Terumo Europe, Leuven, Belgien)
- Endotrachealtubus 6,5mm (z.B. Trachealtubus, oral/nasal, mit Cuff, 6,5mm, Super Safety Clear, REF 112482, RÜSCH, Fellbach, Deutschland)

- Laryngoskop (z.B. Laryngoskop SET, Erwachsene mit: 1 Griff, 3 Spatel, REF 03.51020.011, KaWe, Asperg, Deutschland)
- Verbindungsschlauch/Fingertip (z.B. Verbindungsschlauch/Fingertip steril, REF 16024182, Unomedical, ConvaTec, Flintshire, Vereinigtes Königreich)
- Absaugkatheter (z.B. Absaugkatheter gebogen Typ "Ideal", REF 43031411 MEDINORM, Braun, Sempach, Schweiz)
- Tracheal Saugset (z.B. Tracheal Saugset steril, REF 94780000, SMS medipool GmbH, Gauting-Buchendorf, Deutschland)
- Absauggerät (z.B. Type 03612 Medela, Baar, Schweiz)
- Aqua dest. 20ml
- b. Durchführung
- i. Zwei Kunststoffbehälter inkl. der Deckel unter fließendem Wasser gründlich spülen. Diese im Anschluss unverzüglich schließen. (Beide Schritte sind sehr wichtig zur Vermeidung einer Faserverunreinigung durch die Umgebungsluft.)
- ii. In einen der beiden Behälter etwa 20 ml Aqua dest. füllen. (Auch hierbei auf ein schnelles Verschließen des Behälters und der Flasche mit Aqua dest. achten!)
- iii. Mit der Katheterspritze 10 ml des Aqua dest. aus dem Behälter aufziehen. (Anschließend den Behälter und die Spritze mit der dazugehörigen Kappe unverzüglich verschließen.)



Abbildung 70: 10ml Aqua dest. aufziehen.

iv.



Abbildung 71: Laryngoskop Abbildung 72: Endotrachealtubus Abbildung 73: Absaugkatheter Den Leichnam endotracheal intubieren und den Absaugkatheter einführen.

v. Die Spritze an den Katheter anschließen und mit Aqua dest. durchspülen. Anschließend die Spritze wieder verschließen.



Abbildung 74: Mit Aqua dest. durchspülen.

vi. Das Absauggerät über den Verbindungsschlauch und das Tracheal-Saugset an den Katheter anschließen und möglichst viel Flüssigkeit aus der Trachea absaugen.



Abbildung 75:Abbildung 76: Verbindungs-Absauggerätschlauch/Fingertip

- Abbildung 77: Tracheal-Saugset



Abbildung 78: Flüssigkeit absaugen.

 vii. Die Flüssigkeit in den zweiten Kunststoffbehälter umfüllen. Dabei ist ein auf ein schnelles Verschließen zu achten! Dieser Schritt ist bei viel Flüssigkeit zu wiederholen. Das Gerät währenddessen ausschalten, um Verunreinigungen durch den Luftstrom zu vermeiden.



Abbildung 79: Flüssigkeit in den Kunststoffbehälter umfüllen.

viii. Mit der Spritze 6ml Aqua dest. aus dem Behälter aufziehen und den Rest der Flüssigkeit aus dem Behälter verwerfen.



Abbildung 80: 6ml Aqua dest. aufziehen.

 ix. Die 6ml Aqua dest. zurück in den Behälter füllen und mit dem Absaugkatheter zur Spülung des Katheters aufsaugen. Diese Spülflüssigkeit verbleibt in der Falle.



Abbildung 81: 6ml Aqua dest. aufsaugen.

- Pro Leichnam wird somit mindestens ein Kunststoffbehälter und eine Falle mit Probenmaterial gewonnen.
- Die Proben werden im Kühlschrank aufbewahrt, bei längerer Lagerung ist es ratsam die Proben einzufrieren.

• Das aus dem Rachen ragende Ende des Tubus wird mittels Schere oder Messer in der Mundhöhle abgeschnitten. Der Rest des Tubus wird belassen, um bei der anschließenden Obduktion eine Fehlintubation ausschließen zu können.

## Arbeitsanleitung Probenvorbereitung und Darstellung

- a. Benötigte Materialen
- Filterhalter Ø25mm, wiederverwendbar (z.B. Filterhalter für Spritzen, Polysulfon, Ø 30mm x H 34mm, für Filter Ø 25mm, FP 025/1, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe Deutschland)
- Nylon-Filter der Größen 100µm, 41µm, 11µm, 5µm mit Ø25mm (White Plain, Ø 25mm, Maschengröße 100µm, Katalognr. NY1H02500; Maschengröße 41µm, Katalognr. NY4102500; Maschengröße 30µm, Katalognr. NY3002500; Maschengröße 11µm, Katalognr. NY1102500; Maschengröße 5µm, Katalognr. NY0502500; Merck Chemicals GmbH Darmstadt, Deutschland)
- 2 Luer-Lock-Spritzen 10ml (z.B. Syringe Luer-Lok Tip, REF 300912, BD, Temse, Belgien)
- Bechergläser 200ml
- Petrischalen Ø~80-100mm
- 16 Objektträger (Mattrand weiß, 45° Ecken, geschliffene Kanten, Süsse Labortechnik, Gudensberg, Deutschland)
- 8 Hämatozytengläser (z.B. Deckgläser für Hämatozytometer, 30x30mm, Thickness 0,4mm, REF 40412710, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim vor der Rhön, Deutschland)
- 8 Deckplättchen (z.B. Cover Glass, Thickness 1, 25x25mm, Cat No. 2845-25, Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland)
- Doppelseitiges Klebeband (z.B. Doppelseitiges Klebeband universal, Tesa, Offenburg/Hamburg, Deutschland)
- Glycerin mit Pasteur-Pipette (z.B. Pasteurpipetten ohne Wattestopfen, Gesamtlänge 150 mm, Carl Roth GmbH)
- 1 stumpfe und 1 Präzisionspinzette (z.B. Typ 5, Spitzenstärke 0,01mm, Titan, Dumont, Montignez, Schweiz)
- Reinigungsstäbchen (z.B. Critical Swab, Modell 149-0264, VWR, Darmstadt, Deutschland)
- 150ml 5mol/l Ameisensäure (z.B. Ameisensäure Rotipuran ≥98%, p.a., ACS, CAS: 64-18-6, Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Ethanol ≥70% (MEK vergällt, Biomel GmbH, Dessau, Deutschland)
- Aqua dest.
- Ultraschallbad (z.B. RK 102 H, Bandelin, Berlin, Deutschland)

- Vortexer (z.B. Vortex-Genie 2 PULSE. Model No.SI P266, Scientific Industries INC, Bohemia, New York, USA)
- im Haushalt übliches Schwammtuch (z.B. 18x20cm Gut&Günstig, Hamburg, Deutschland)
- Waschmittel (z.B. Ultra-Fix Spülmittel, Reinex GmbH & CO KG, Castrop-Rauxel, Deutschland)
- Alufolie (z.B. Gut&Günstig, Hamburg, Deutschland)
- Flächendesinfektionsmittel
- Druckluftspray (z.B. nicht brennbar, Dust Off 67, 33163-DE, Kontakt Chemie, Zele, Belgien, Aufsatz für Luer-Lock-Spritze wurde eigens dafür in der Werkstatt für Chemie angefertigt)
- Speziell für die Erstellung einer 5mol/l Ameisensäure:
  - 1 Maßkolben (11)
  - 2 Messzylinder (200ml)
  - Ameisensäure ≥ 97% (z.B. Rotipuran ≥ 98%, p.a., ACS, CAS: 64-18-6, Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
  - Eppendorf-Pipette mit Pipettenspitzen (z.B. 100-1000µl, Eppendorf Reference, Hamburg, Deutschland)

## b. Arbeitsanleitung Probenvorbereitung

- Herstellung einer verdünnten Ameisensäurelösung (5mol/l)

Abzug wischen. Schutzbrille aufziehen (auch Brillenträger!).

- i. 2 Messzylinder sowie einen Maßkolben spülen, Maßkolben sofort mit Stopfen verschließen.
- ii. 189ml Ameisensäure  $(AS) \ge 97\%$  in einen der beiden Messzylinder geben.
- iii. Den zweiten Messzylinder mit Aqua dest. füllen (etwa 200ml).
- iv. Aqua dest. in den Maßkolben füllen. Etwa ein Viertel der AS in den Maßkolben füllen.



Abbildung 82: Maßkolben mit AS- und Aqua dest.-Gemisch.

Maßkolben verschließen und leicht schwenken. Auf Wärmebildung achten.

v. Messzylinder wieder mit Aqua dest. füllen und nun abwechselnd Aqua dest. und AS in den



Abbildung 83 und 84: Abwechselnd Aqua dest. und AS in den Maßkolben füllen.

Maßkolben füllen. Zwischendurch immer Maßkolben schwenken und auf Wärmebildung achten.

- vi. Nachdem die gesamte AS sich in dem Maßkolben befindet, mit Aqua dest. bis zur 11-Markeriung auffüllen.
- vii. Mit Stopfen verschließen und den Maßkolben 10 Mal um 180 Grad drehen, bis sich die Luftblase vom Gefäßgrund bis zum Gefäßhals und zurückbewegt. Dies sichert eine ausreichende Homogenisierung des Wasser-Säure-Gemischs.



Abbildung 85 und 86: 180 Grad-Drehung des Maßkolbens.

viii. Maßkolben beschriften, Materialen spülen (mind. 5 Mal nach Kontakt mit Säure) und Abzug wischen. Säure ordnungsgemäß lagern. - Durchführung der Probenvorbereitung

# Reinigung

Vor jeder Aufbereitung müssen alle Arbeitsflächen gewischt werden (siehe Grundsätze). Zu den zu reinigenden Arbeitsflächen zählen auch die Flächen rund um das Spülbecken, da diese ein zentraler Punkt in der Vorbereitung und in dem sich am Ende anschließenden Reinigungsprozess darstellen. Falls der Abzug längere Zeit nicht gewischt wurde, empfiehlt es sich nicht nur die Arbeitsfläche zu reinigen, sondern den gesamten Abzug (inkl. Seitenwände und Decke).



Abbildung 87: Wischen im Abzug.



Abbildung 88: Materialien im Abzug zum Wischen anheben.

Materialien gründlich spülen (siehe Grundsätze) Anschließend die Gefäße mit Petrischalen abdecken und zurück in den gereinigten Abzug stellen (siehe Grundsätze).





Abbildung 89 und 90: Abwechselnd Becherglas und Petrischale ausspülen und hinterher sofort miteinander abdecken.

## Vorbereitung



Es empfiehlt sich zur besseren Übersicht folgende Anordnung im Abzug:

Abbildung 91: Anordnung im Abzug

Wichtig: Die Bechergläser müssen zu jedem Zeitpunkt mit Petrischalen abgedeckt sein! Genauso müssen alle Flaschen und Maßkolben schnellstmöglich verschlossen werden, um Kontaminationen mit Umgebungsfasern zu vermeiden!

i. Ein Becherglas mit 150ml Aqua dest. und eines mit 150ml 5mol/l Ameisensäure füllen.



Abbildung 92: Aus dem Maßkolben 150ml AS in das Becherglas füllen

**ii.** Trachealprobe (TP) 1 min. bei etwa 1500 rpm vortexen.



Abbildung 93: TP vortexen.

iii. TP bei Raumtemperatur 5 min. Ultraschallbad behandeln, dabei den Deckel leicht aufschrauben damit evtl. entstehende Gase entweichen können. Ab und an die Probe schwenken.



Abbildung 94: TP im Ultraschallbad.

- iv. TP erneut 1 min. bei etwa 1500 rpm vortexen.
- v. Probengefäß mit TP kurz unter fließendem Wasser abspülen, anschließend in den Abzug stellen.

Wichtig: Nichts wird ungewaschen in den Abzug gestellt!

## Filtration der Trachealprobe

1. Trachealprobe

Handschuhe wechseln.

Deckel der Falle aufschrauben, mit dem Boden nach unten auf die Arbeitsfläche legen (genauso auch bei dem Deckel des Kunststoffbechers verfahren, siehe Grundsätze).

Die TP aus der Falle in den Kunststoffbecher füllen. Falle anschließend mit etwas Aqua dest. spülen und Spülflüssigkeit in den Kunststoffbecher überführen.

Dabei alle Gefäße zwischenzeitlich geschlossen halten.

 Luer-Lock-Spritze auspacken und die Flüssigkeit aus dem Kunststoffbecher aufziehen. An den Filterhalter mit dem 100µm-Filter schrauben und Flüssigkeit in das sich rechts befindliche Becherglas filtrieren.

Diesen Schritt so oft wiederholen, bis die gesamte TP gefiltert wurde. Zwischendurch die Petrischalen immer wieder auf die Becher legen um Fremdfaserkontamination zu vermeiden. Die Petrischale ebenfalls mit dem Boden zur Arbeitsfläche zeigend legen. Die Spritze sollte über einem Becherglas von dem Filterhalter abgeschraubt werden (siehe Grundsätze). Zum Schluss den Kunststoffbecher mit etwas Aqua dest. spülen (Probengefäß bei geschlossenem Deckel schwenken) und Spülflüssigkeit ebenfalls filtrieren.

Den Filterhalter inkl. 100 $\mu$ m-Filter auf die oben rechts befindliche Petrischale legen.





Abbildung 95: Flüssigkeit aufziehen.

Abbildung 96: Aufgezogene Luer-Lock-Spritze an Filterhalter.

ii. Von der unteren Petrischale den Filterhalter mit dem 41µm-Filter nehmen.
Anschließend das oben in Punkt i beschriebene Vorgehen mit einem 41µm-Filter wiederholen. Die Probe und die Spülflüssigkeit dabei in das links befindliche Becherglas filtrieren.

Den Filterhalter inkl. 41µm-Filter auf die oben rechts befindliche Petrischale legen, unter den 100µm-Filter stecken.



Abbildung 97: Filtrierung der Flüssigkeit aus dem rechten Becherglas über den 41µm-Filter in das links befindliche Becherglas

iii. Das in i und ii beschriebene Vorgehen mit dem 11µm (Filtration in das rechts befindliche Becherglas) und 5µm-Filter (Filtration in das links befindliche Becherglas) wiederholen. Die Filterhalter mit den 11 bzw. 5µm-Filtern ebenfalls auf die oben rechts befindliche Petrischale an die anderen Filter stecken.



Abbildung 98: Mit der Spritze die Flüssigkeit aus dem linken Becherglas aufziehen.



Abbildung 99: Flüssigkeit über den 11µm-Filter in das rechts befindliche Becherglas filtrieren.



Abbildung 100: Filtrierung der Flüssigkeit aus dem rechten Becherglas über den 5µm-Filter in das links befindliche Becherglas.



Abbildung 101: Die TP wurde über alle vier Filter filtriert, sodass diese ineinander gesteckt auf der oberen Petrischale liegen. Reihenfolge von oben (hier links) abwärts: 100-41-11-5µm.

2. Behandlung der Filter mit Ameisensäure (AS, 150 ml, 5 mol/l)



Abbildung 102: Das Becherglas mit TP steht links am Rand, stattdessen steht das Becherglas mit AS an der linken Position im Zentrum.

Nun das linke mit TP befüllte Becherglas beiseitestellen und an dessen Position das Becherglas mit Ameisensäure positionieren.

i. Die gesamte Flüssigkeit (AS), wie bei der Filtrierung der TP, über den 100µm-Filter in das rechte Becherglas filtrieren. Auch hier bedenken, die Petrischalen zwischendurch auf die Bechergläser zu legen sowie die Spritze über einem Becherglas von dem Filterhalter abzuschrauben um Kontamination zu vermeiden (siehe Grundsätze). Am Ende etwas Aqua dest. in das linke Becherglas geben, kurz schwenken und ebenfalls über den 100µm-Filter in das rechte Becherglas filtrieren. Dies verhindert, dass die Säure zu lange auf den Filterhalter und den Filter einwirkt und dadurch angreift.



Abbildung 103: AS aufziehen.

 Die Spritze auf einer Petrischale ablegen und den Filterhalter an die Flasche mit Druckluft anschließen. Die Petrischale des linken Becherglases anheben, das Druckluftspray mit dem Filter in das Becherglas halten, etwas neigen (etwa 60°) und 8 kraftvolle Stöße abgeben.



Abbildung 104: Mit dem Druckluftspray 8 kraftvolle Stöße abgeben.

Den 100µm-Filter auf die unten rechts befindliche Petrischale legen.

iii. Von der oberen Petrischale den Filterhalter mit dem 41µm-Filter nehmen.



Abbildung 105: Der  $41\mu$ m-Filter wurde bereits entnommen. Der 100 $\mu$ m-Filter wurde nach der Filtrierung mit der AS wieder auf die untere Petrischale gelegt.

Anschließend das oben in Punkt i und ii beschriebene Vorgehen mit einem 41µm-Filter wiederholen. Die Probe, Ameisensäure und Spülflüssigkeit dabei in das links befindliche Becherglas filtrieren bzw. geben, während die Druckluftbehandlung über dem rechten Becherglas erfolgt.





Abbildung 106: Einen Schluck Aqua dest. in das rechte Becherglas geben.

Abbildung 107: Becherglas mit Auqa dest. schwenken.



Abbildung 108: Mit dem Druckluftspray 8 kraftvolle Stöße abgeben.

Den Filterhalter inkl. 41µm-Filter auf die unten rechts befindliche Petrischale legen, unter den 100µm-Filter stecken.



Abbildung 109: Obere (hier linke) Petrischale: 11/5µm-Filter; untere (hier rechte) Petrischale: 100/41µm-Filter.

iv. Von der oberen Petrischale den Filterhalter mit dem 11µm-Filter nehmen.

Mit der Spritze die AS aus dem linken Becherglas aufziehen und über den 11µm-Filter in das rechts befindliche Becherglas filtrieren. Diesen Schritt wiederholen bis die Flüssigkeit sich komplett in dem rechten Becherglas befindet. Am Ende etwas Aqua dest. in das linke Becherglas geben, kurz schwenken und ebenfalls in das rechte Glas filtrieren.

- v. Den Filterhalter inkl. 11µm-Filter auf die unten rechts befindliche Petrischale legen, nicht an die anderen Filterhalter stecken!
- vi. Von der oberen Petrischale den Filterhalter mit dem 5µm-Filter nehmen.



Abbildung 110: Der 11µm-Filter neben den bereits filtrierten Filtern.

- vii. Mit der Spritze die AS aufziehen und über den 5µm-Filter in das links befindliche Becherglas filtrieren. Diesen Schritt wiederholen bis die Flüssigkeit sich komplett in dem linken Becherglas befindet.
- viii. Die Spritze mit dem 5µm-Filter beinhaltendem Filterhalter auf einer Petrischale ablegen.


Abbildung 111: 5µm-Filter inkl. Spritze kurz ablegen.

ix. Den Filterhalter mit dem 11µm-Filter an die Flasche mit Druckluft anschließen. Die Petrischale des rechten Becherglases anheben, das Druckluftspray mit dem Filter in das Becherglas halten, etwas neigen (etwa 60°) und 8 kraftvolle Stöße abgeben.

Den Filterhalter inkl. 11µm-Filter auf die unten rechts befindliche Petrischale legen, unter den 41µm-Filter stecken.

 Etwas Aqua dest. in das rechte Becherglas geben, kurz schwenken und ebenfalls in das linke Glas über den 5µm-Filter filtrieren.



Abbildung 112: Das rechte Becherglas mit Aqua dest. schwenken.

xi. Die Spritze kurz weglegen und den Filterhalter mit dem 5µm-Filter an die Flasche mit Druckluft anschließen. Die Petrischale des rechten Becherglases anheben, das Druckluftspray mit dem Filter in das Becherglas halten, etwas neigen (etwa 60°) und 8 kraftvolle Stöße abgeben.

Den Filterhalter inkl. 5 $\mu$ m-Filter auf die unten rechts befindliche Petrischale legen, unter den 11 $\mu$ m-Filter stecken.

#### c. Arbeitsanleitung Faserdarstellung

### - Einbettung

- Auch in der Umgebung des Mikroskops müssen alle zu benutzenden Arbeitsflächen gei. wischt werden, ebenso der Objekttisch des Mikroskops und der Spülbeckenrand.
- ii. Die Filterhalter inkl. der jeweiligen Filter in ein Becherglas stellen, abdecken und auf die gereinigte Fläche neben das Mikroskop stellen.
- iii. 2 Petrischalen, 16 Objektträger, 8 Hämatozytengläser und 8 Deckgläser an die Seite des gereinigten Spülbeckens stellen.
- iv. 8 Objektträger zunächst mit Leitungswasser und dann mit Aqua dest. waschen, sowie anschließend mit doppelseitigem Klebeband bekleben (Achtung: Schutzfolie auf oberen Seite des Klebebands belassen) und auf der Arbeitsfläche neben dem Mikroskop positionieren.





Abbildung 113: Objektträger unter fließendem Abbildung 114: Objektträger mit Aqua dest. Wasser reinigen.

spülen.



Abbildung 115: Gereinigte Objektträger mit Klebeband bekleben und neben dem Mikroskop anordnen.

Glycerin inkl. Pipette neben dem Mikroskop bereitstellen, ebenso eine Präzisionspinzette v. und eine gröbere Pinzette (vorher mit Wasser und Aqua dest. abspülen).

vi. Die 2 Petrischalen mit Wasser und Aqua dest. spülen, neben das Spülbecken stellen. 2 Objektträger spülen und auf die Kante einer Petrischale legen. 2 Deckgläser und 2 Hämatozytengläser spülen und in dieselbe Petrischale legen. Mit den beiden Petrischalen zum Mikroskop gehen.





Abbildung 116: gereinigte Petrischalen am Spülbeckenrand mit 2 Objektträgern, 2 Deckgläsern und 2 Hämatozyten-gläsern (siehe Abb. 118).

Abbildung 117: Petrischalen mit dem gereinigten Material wie auf Abb. 116 und 118 neben dem Mikroskop.



Abbildung 118: Praktische Anordnung zur Einbettung.

 vii. Einen großzügigen Tropfen Glycerin in der Mitte eines Objektträges verteilen. Filterhalter des 100µm-Filters aufschrauben.



Abbildung 119: Filterhalter aufgeschrabt, Glycerintropfen auf unterem Objektträger.

viii. Den 100µm-Filter mit der Präzisionspinzette entnehmen und vorsichtig auf den Glycerintropfen legen. Dabei beachten, dass die im Filterhalten obenliegende Filterseite auch auf dem Objektträger oben liegen muss.



Abbildung 120: Filter entnehmen.

Abbildung 121: Filter auf den Glycerintropfen betten.

ix. Nun vorsichtig(!) zwei Tropfen Glycerin auf den Filter geben. Einen mittelgroßen Tropfen in die Mitte des Filters und einen kleineren an den Rand.



Abbildung 122: Abbildung 40: Mittelgroßer Glycerintropfen auf die Mitte des Filters.



Abbildung 123: Kleinerer Glycerintropfen an den Filterrand.

Ein Hämatozytenglas nehmen und von der Seite, an welcher der Glycerintropfen ist, langx. sam andrücken und absinken lassen. Dabei leichten Druck auf das Glas geben, sodass sich das Glycerin verteilt, ohne dass Luft dazwischen verbleibt.



Abbildung 124: Filter mit Hämatozytenglas abdecken.

Nun den Dichtungsgummi mit der Präzisionspinzette aus dem Filterhalter auf den zweiten xi. Objektträger legen. Hier ebenfalls beachten, dass die obenliegende Seite auch auf dem Objektträger nach oben zeigen muss.





Abbildung 125: Dichtungsgummi entnehmen. Abbildung 126: Dichtungsgummi auf den zweiten

Objektträger legen.

Mit dem zweiten Hämatozytenglas abdecken.



Abbildung 127: Dichtungsgummi mit Hämatozytenglas abdecken.

xii. Den unteren Teil des Filterhalters inkl. Lochplatte weglegen.

Die Folie eines mit Klebeband präparierten Objektträgers abziehen.



Abbildung 128: Klebebandfolie eines Objektträgers abziehen.

 xiii. Den oberen Teil des Filterhalters inkl. Lochplatte mit der Lochplatte nach unten auf das Klebeband auflegen.



Abbildung 129: Oberer Teil des Filterhalters inkl. Lochplatte auf dem mit Klebeband präpariertem Objektträger.

Mit der stumpfen Pinzette die Lochplatte durch die Öffnung leicht auf das Klebeband drücken.



Abbildung 130: Lochplatte mit der stumpfen Pinzette andrücken.

xiv. Von einem weiteren Objektträger die Folie abziehen. Den Filterhalter abnehmen und auf die leere Petrischale mit der kleinen Öffnung nach unten legen. Mit der stumpfen Pinzette die Lochplatte abnehmen und andersherum auf den zweiten präparierten Objektträger legen.



Abbildung 131: Lochplatte auf den zweiten Objektträger legen; der obere Teil des Filterhalters liegt auf der rechten Petrischale.

Abbildung 132: Die Lochplatte auf dem zweiten Objektträger. Auf dem unteren Objektträger sieht man auf dem Klebeband die Umrisse der davor dort befindlichen Lochplatte.

xv. Den ersten Objektträger mit einem Deckglas abdecken. Die Lochplatte von dem zweiten Objektträger mit einem Deckglas abdecken. Die Lochplatte von dem zweiten Objektträger abnehmen und beiseitelegen. Diesen Objektträger ebenso mit einem Deckglas abdecken.





Abbildung 133: Deckglas auf dem ersten Objektträger.

Abbildung 134: Deckglas auf dem zweiten Objektträger.

# - Mikroskopie

Grundeinstellung: Auflicht mit schwarzem Untergrund.

i. Den oberen Filterhalter als erstes mikroskopieren: Ringlicht mit einem 20x Objektiv.



Abbildung 135 und 136: Mikroskopieren des Filterhalters.

 Als zweites den Filter statt des Filterhalters auf die Petrischale legen und mikroskopieren: polarisiertes Licht und koaxiale Lichteinstellung.

Am linken Rand mit einem 50x Objektiv beginnen und im Uhrzeigersinn den Randbereich mikroskopieren.

Bei einem vermuteten Faserfund kann ein Objektiv mit einer größeren Vergrößerung gewählt werden, um auszuschließen, dass die Faser sich auf der Oberfläche des Hämatozytenglas befindet und nicht zwischen Glas und Objektträger. Es empfiehlt sich auch der Wechsel zum Ringlicht, um die Faserfarbe besser beurteilen zu können. Gefundene Fasern können im Navigationsbereich mittels Koordinaten erfasst werden. So kann die Position der bereits erfassten Fasern dokumentiert werden. Dies ist vor allem bei einer hohen Anzahl an Fasern hilfreich.

Nach dem Rand wird systematisch das Filterzentrum mikroskopiert.



Abbildung 137 und 138: Mikroskopie des Filters.

iii. Als drittes den Dichtungsgummi mit einem 100x Objektiv und koaxialer Lichteinstellung sowie polarisiertem Licht mikroskopieren.



Abbildung 139: Mikroskopie des Dichtungsgummis.

iv. Als viertes den ersten Objektträger mit Klebeband mit einem 30x Objektiv und Teilbeleuchtung mikroskopieren. Auch hier empfiehlt es sich am Rand des Deckglases anzufangen und systematisch den Rand zu mikroskopieren. Anschließend kann das Zentrum betrachtet werden.

Nun genauso auch mit dem zweiten Objektträger mit Klebeband verfahren.

v. Nun die Schritte von I.vi bis II.iv mit den verbleibenden Filtern/Filterhaltern wiederholen.

Zur Erfassung der Faseranzahl empfiehlt sich folgende Tabelle:

Tabelle 18:	Erfassung	Faseranzahl
-------------	-----------	-------------

Porengröße Filterhalter in µm		100	41	11	5
Faseranzahl	Halter				
	Filter				
	Gummi				
	KB I				
	KB II				
	Gesamt				
			Faseranzahl		
Gesamt					

Die Tabelle kann je nach spezifischer Fragestellung beliebig erweitert werden, zum Beispiel um die Aufteilung in Faserfarben.

# d. Arbeitsanleitung Materialreinigung

- i. Der Objekttisch und die Arbeitsfläche werden gewischt, die Objektträger mit den Klebebändern werden entsorgt, ebenso die Filter. Für die Reinigung der Arbeitsflächen kommen Spülmittel und Flächendesinfektionsmittel zum Einsatz.
- Die Hämatozytengläser und die Objektträger werden in eine Petrischale gelegt. Die unteren Teile des Filterhalters und dessen Lochplatten werden in ein Becherglas gegeben



Abbildung 140: Becherglas mit Filterhaltern und Lochplatten, Petrischale zur Ethanolreinigung mit den oberen Filterhaltern und Lochplatten, Petrischale mit Objektträgern und Hämatozytengläsern.



Abbildung 141: Lösen der Lochplatten aus den Filterhaltern.

- Falls sich noch Lochplatten in den Haltern befinden, sollten diese f
  ür die nachfolgenden Reinigungsschritte rausgelöst werden.
- iv. Die oberen Filterhalter und die Lochplatten, die dem Klebeband auflagen, werden in einer Petrischale unter Einsatz der Reinigungsstäbchen gründlich mit Ethanol gereinigt und anschließend in das Becherglas mit den restlichen Filterhalterkomponenten gegeben.



Abbildung 142 und 143: Reinigung der Filterhalter und Lochplatten mit Ethanol und den Reinigungsstäbchen.

v. Die Filterkomponenten werden nun mit einer verdünnten Ameisensäurelösung (1/3 Ameisensäure und 2/3 Aqua dest.) für 15 min unter gelegentlichem Umrühren im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss alle Materialien unter Einsatz von Spülmittel mehrfach spülen.



Abbildung 144: Filterhalterkomponenten mit AS übergießen.



Abbildung 145: Filterhalterkomponenten in ASund Aqua dest.-Gemisch unter gelegentlichem Umrühren im Ultraschallbad reinigen.



Abbildung 146 und 147: Filterhalter mit Seife spülen.

vi. Anschließend die Materialien mit Desinfektionsmittel behandeln und mit Leitungswasser und dest. Wasser spülen (Bechergläser zwischenzeitlich immer mit Petrischalen abdecken). Die Filterhalterteile dabei nacheinander unter fließendem Wasser reinigen und ineinander bauen. Der korrekte Aufbau ist folgender: unterer Filterhalter, Lochplatte mit der glatten Seite nach oben zeigend, Dichtungsgummi, Lochplatte mit der glatten Seite nach unten zeigend, oberer Filterhalter. Die wieder zusammengesetzten Filterhalter in ein zuvor gereinigtes Becherglas legen.





Abbildung 149: Lochplatte in den unteren Fi-

lterhalterteil stecken.

Abbildung 148: Bereits gewaschener unterer Filterhalterteil in der linken Hand, zu waschende Lochplatte in der rechten.



Abbildung 150: Oberer Filterhalterteil in der rechten Hand.



Abbildung 151: Gewaschener oberer Filterhalterteil in der linken Hand, zu waschende Lochplatte in der rechten.



Abbildung 152: Lochplatte in den oberen Teil des Filterhalters einsetzen.



Abbildung 154: Dichtungsgummi auf Lochplatte platzieren.



Abbildung 153: Zu waschender Dichtungsgummi in der rechten Hand waschen.



Abbildung 155: Beide Filterhalterteile ineinander schrauben.

vii. Filterhalter unter Verwendung einer Luer-Lock-Spritze 20 Mal mit Aqua dest. vor- und zurück spülen. Wasser verwerfen und erneut Aqua dest. mit der Spritze über den Filterhalter drücken. Dieses "Vorwärtsspülen" 5 Mal wiederholen und Filterhalter anschließend in ein zuvor gereinigtes Becherglas legen. Diesen Schritt so oft wiederholen bis alle Filterhalter gespült sind.



Abbildung 156 und 157: Vor- und Rückwärtsspülen.



Abbildung 158: Aufziehen.

 viii. Nun die Filterhalter aufschrauben, die Lochplatten wieder aus den Halterungen lösen und alle Filterhalterkomponenten in Auqa dest. unter gelegentlichem Rühren 5 min im Ultraschallbad behandeln. Im Anschluss Wasser abgießen und die Filterkomponenten noch 3 Mal mit Aqua dest. spülen.



Abbildung 159: "Vorwärtsspülen".



Abbildung 160: Filterhalter in Aqua dest. im Ultraschallbad.

**ix.** Schritt v bis vi wiederholen. Wichtig: Diesmal beim Zusammensetzen des Filterhalters darauf achten, dass die Lochplatten mit der glatten Seite nach innen - zueinander - zeigen!



Abbildung 161: "Gerillte" Seite

Abbildung 162: Glatte Seite

- x. Sollte beim "Vorwärtsspülen" auffallen, dass der Filterhalter nicht dicht ist und Wasser an den Halterseiten entweichen kann, muss der Halter erneut aufgedreht werden und auf einer gereinigten Petrischale die Lochplatten aus den Halterungen gelöst und erneut zusammengesetzt werden. Dies muss so oft wiederholt werden, bis kein Wasser mehr an den Seiten auslaufen kann.
- xi. Vor dem Einsetzen der Filter die Filterverpackungen abwischen sowie die Präzisionspinzette mit Wasser und Aqua dest. spülen. Die zuvor gereinigten Filterhalter auf eine Petrischale geben.

Einen Filterhalter aufdrehen, einen 100µm-Filter mittels Präzisionspinzette auf eine Hälfte des Filterhalters legen und den Filterhalter wieder verschließen.

Diesen Schritt mit allen Filtergrößen (41 $\mu$ m, 11 $\mu$ m, 5 $\mu$ m) wiederholen und die mit Filtern bestückten Filterhalter ineinanderstecken (Reihenfolge: 100 $\mu$ m – 41 $\mu$ m – 11 $\mu$ m – 5 $\mu$ m).



Abbildung 163: Filterhalter mit Filter von oben (links) nach unten (rechts): 100μm, 41μm, 11μm, 5μm.



Abbildung 164: Filter entnehmen.



Abbildung 166: Filter auf der Lochplatte platzieren.



Abbildung 165: Filter auf der Lochplatte platzieren.



Abbildung 167: Filterhalter mit Filter zuschrauben.

**xii.** Die ineinander gesteckten Filterhalter in ein gespültes Becherglas geben und mit Petrischale sowie Alufolie abdecken.



Abbildung 168: Filterhalter in gespültem Becherglas und mit Alufolie abgedeckt.

xiii. Hämatozytengläser und Objektträger mit Wasser, Spülmittel und Aqua dest. reinigen. Hier bietet es sich an, die Materialien direkt nach der Reinigung in einer verschließbaren Box zu lagern.



Abbildung 169: Alle gespülten Materialien im Abzug.

## Erklärung über frühere Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Freiburg im Breisgau, 01.07.2025

#### Danksagung

Sehr gerne möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Marko Weber und meiner Betreuerin Dr. med. Carolin Richter für diese aufregende Idee, das Vertrauen und den Freiraum das Projekt nach meinen eigenen Vorstellungen umsetzen und gestalten zu können, sowie für die Förderung, Ermutigung und die Momente des Brainstormens sowie ausführlicher Korrekturen bedanken. Im Weiteren gilt mein Dank dem gesamten Team des Instituts für Rechtsmedizin für ihre tatkräftige Hilfe und Unterstützung!

Einen großen Dank möchte ich an das Institut für organische Chemie richten, vielen Dank Herr Prof. Dr. R. Csuk! Und vor allem vielen vielen Dank an Dr. Annemarie Elisabeth Kramell für die lange und wertvolle Unterstützung bei der Umsetzung dieses Vorhabens. Du hast mir so sehr mit deinem Wissen, Ideen, Hinweisen, Ratschlägen und Deiner Geduld geholfen - ich kann mir nicht vorstellen, wie es ohne Dich geklappt hätte!

Von Herzen danke ich Prof. Dr. Thusnelda Tivig für Ihre großartigen und kritisch detaillierten Korrekturen sowie Guido und Anna, die mich in unterschiedlichen Phasen meiner Verschriftlichung begleitet, motiviert und beraten haben!