

Übertragung von Viren durch RLT-Anlagen und Inaktivierung durch UVC-Strahlung

Transmission of airborne virus particles by conditioning systems and inactivation by ultraviolet irradiation

Dr. rer. nat. **A. Bermpohl**, Dipl.-Biol. **I. Weißhaar**, biotec GmbH, Gütersloh, Dipl. Biol. **T. Walenda**, Prof. Dr. med. **K. Kleesiek**, Dr. rer. nat. **J. Dreier**, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Bad Oeynhausen

Kurzfassung

Die vorliegende Studie zeigt, dass Viren, die über Vernebelungsexperimente in eine Versuchs-RLT-Anlage eingebracht werden, bis zu vier Stunden später noch in infektiöser Form im Zuluftstrom nachweisbar sind. Selbst komplex gebaute Viren sind über diesen Zeitraum in infektiöser Form detektierbar. Über Real-Time PCR besteht die Möglichkeit mit hoher Sensitivität virale Nukleinsäuren in Luftströmen quantitativ zu erfassen. Die nach VDI6022 in RLT-Anlagen zu verwendenden F7-Filterelemente sind nicht in der Lage, Viren in ausreichendem Maß zurückzuhalten. Durch Integration von UVC-Modulen in den Luftstrom lassen sich Viren zum Teil bis unter die diagnostische Nachweisgrenze reduzieren.

Abstract

This study demonstrates, that virus particles nebulized in the airstream of an air-conditioning system are infectious even four hours later in the delivery air. In addition, the stability of complex structured viruses in the airstream was demonstrated. Real-Time PCR offers the possibility to quantify viral nucleic acids in air-streams. The demanded F7 filter elements (VDI6022 guideline) in conditioning systems are not able to hold back virus particles. However, integrated UVC-modules are capable to reduce air born viruses under the diagnostic detection limit.

Einleitung

Mit der VDI Richtlinie 6022 (überarbeitete Fassung 2. Auflage / April2006) liegt ein Regelwerk vor, das den Stand der Technik im Bereich der Lufthygiene von Raumlufttechnischen Anlagen (RLT-Anlagen) definiert. Als Kernaussage der VDI6022 kann hierbei gelten, dass die Zuluft in keiner Kategorie (organische, anorganische, biologische Inhaltsstoffe) schlechter sein darf als die Vergleichsluft (in der Regel die Außenluft) [1].

Im Focus der Richtlinie stehen hierbei bei den mikrobiellen Erregertypen Bakterien und Pilze, währenddessen Viren eher unbeachtet bleiben. Welchen wesentlichen Anteil jedoch Viren an Atemwegsinfektionen haben, wird deutlich bei der Beobachtung, dass bei den meisten Erkrankungen des Atemtraktes in den Wintermonaten stets eine initiale Virusinfektion zu beobachten ist. Das Erregerspektrum umfasst hierbei Adenoviren, Coronaviren, RS-Viren, Rhinoviren, Influenza A und B Viren sowie Parainfluenzaviren und Enteroviren [2, 3].

Allein die Tatsache, dass die Allgemeine Ortskrankenkasse (AOK) in Deutschland bei ihren Versicherten pro Jahr mit ca. 2,5 Millionen Erkrankungen der Atemwege und daraus folgend mit 25 Millionen Tagen Arbeitsunfähigkeit rechnet [4], lässt die berechnete Frage nach einem möglichen Transfer viraler Erreger durch RLT-Anlagen zu.

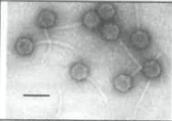
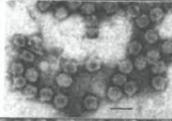
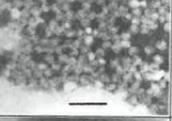
Derzeit ist wenig über die Infektiosität von Viren nach längerer Luftexposition bekannt, was aber nicht zwangsläufig bedeutet, dass man die Infektionsroute über RLT-Anlagen *a priori* verneinen kann. So ist beispielsweise für das Norovirus, einem wichtigen Erreger der Gastroenteritis bekannt, dass er äußerst umweltstabil und infektiös ist. Die Infektionsdosis liegt hierbei bei 10-100 Partikeln [5]. Ein Transfer von Viren über RLT-Anlagen wäre denkbar, insbesondere bei Anlagen mit Umluftanteil.

Es stellt sich also die Frage, ob die derzeit in RLT-Anlagen für Büro- Versammlungs- und Produktionsräumen verwendeten Filterelemente (F7/F5) in der Lage sind, Virusaeosole zurückzuhalten. Außerdem soll diese Arbeit eine Aussage darüber liefern, in wie weit Viren verschiedener morphologischer Struktur in Luftströmen stabil und infektiös verbleiben. Im Vergleich zu Filterelementen werden weiterhin physikalische Desinfektionsmaßnahmen (UVC-Strahlung) zur Inaktivierung luftgetragener Viren in RLT-Anlagen vorgestellt. Die Integration von UVC-Entkeimungssystemen in RLT-Anlagen hat in einer Studie von Menzies et al. [6] zu einer Reduktion von arbeitsplatzbezogenen Krankheitssymptomen insbesondere hinsichtlich Atemwegs- und Schleimhaut bezogenen Symptomen geführt.

Material und Methode

Für die Studien zur Virustransmission wurden aus sicherheitstechnischen Gründen eine Auswahl morphologisch differenter Bakteriophagen als Modellsystem herangezogen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich Größe, Virusgenom und Hüllstruktur (Tab. 1). Die Phagenauswahl repräsentiert in Analogie zu den tier- und humanpathogenen Viren ein vergleichbares morphologisches Spektrum, wobei ähnliche biophysikalische Eigenschaften (Stabilität, Wirkung von UVC, mechanisches Rückhaltevermögen durch Filter, Dehydratationseigenschaften) zu erwarten sind.

Tab. 1: Bakteriophagenauswahl und humanpathogenes Analogon

Virus (Wirt)	Virusgenom		Hüll- struktur	Größe	Morphologie ¹⁾	Modellvirus für
	Nuklein- säure	Struktur				
Lambda (<i>Escherichia coli</i>)	ds-DNA	Linear	Kopf- Schwanz- Typ, nackt	250 nm (Kopf 64 nm)		Herpesviridae z.B. Epstein Barr Virus
φ X174 (<i>Escherichia coli</i>)	ss-DNA (-Strang)	ringförmig	Ikosaeder , nackt	25 nm		Adenoviridae z.B. Adenovirus
MS2 (<i>Escherichia coli</i>)	ss-RNA (+Strang)	Linear	Ikosaeder , nackt	26 nm		Caliciviridae z.B. Norovirus
φ 6 (<i>Pseudomonas syringae phaseolicola</i>)	ds-RNA	Linear	Spherisch , umhüllt	86 nm		Orthomyxo- viridae z.B. Influenzavirus

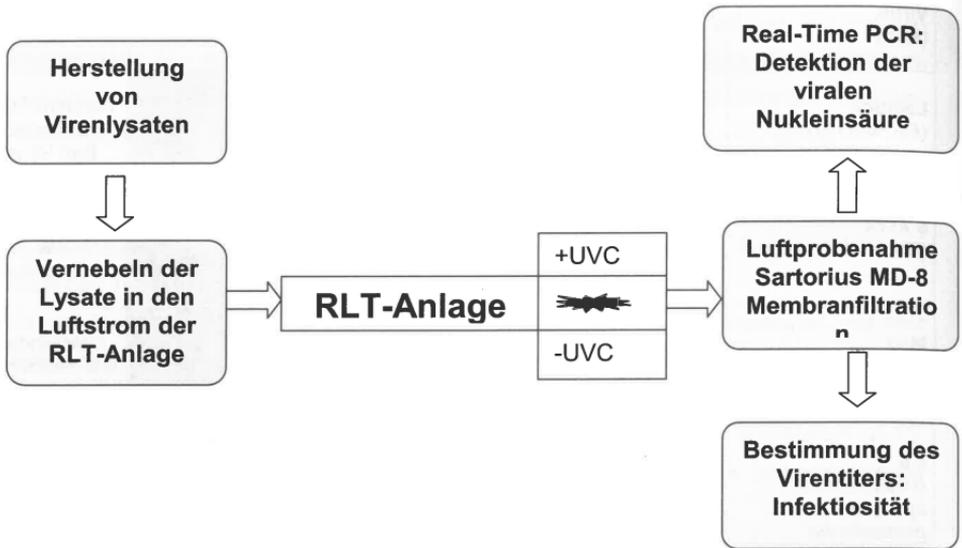
¹⁾ Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus ICTVdB (The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses); Maßstab 100 nm

Die Bestimmung der Infektiosität der Phagen erfolgte über standardisierte Weichagar-Plattierungsmethoden mit definierten Bakterien-Indikatorstämmen, wobei eine Quantifizierung über die Bestimmung der PFU (Plaque Forming Units) erfolgte.

Neben der Bestimmung der Infektiosität wurde die virale Nukleinsäure mittels Real-Time PCR nach Luftprobenahme im Filtrationsansatz bestimmt. Hierzu wurde eine Aufreinigungsmethode erarbeitet, die Phagen-Nukleinsäure in ausreichender Reinheit für die nachfolgende PCR liefert. Für die Real-Time PCR wurde ein Rotorgene 3000 (Corbett Research, Sydney) Thermocycler verwendet. Durch Einsatz verschiedener Primerkombinationen konnten virenspezifische Amplifikate unterschiedlicher Länge gewonnen werden.

Zur Überprüfung des Rückhaltevermögens von F5 und F7 Filtern wurde eine standardisierte RLT-Anlage mit einem Kanalquerschnitt 400mm x 700mm aufgebaut, die mit kommerziell erhältlichen Taschenfilterelementen ausgerüstet wurde. Die beaufschlagten Luftvolumina wurden entsprechend der Filterherstellereangaben über eine variable Ventilatorsteuerung eingestellt. Die Differenzdruckkontrolle erfolgte über ein Differenzdruckmanometer. Der generelle Versuchsaufbau ist in Abb.1 wiedergegeben.

Abb. 1: Versuchsaufbau

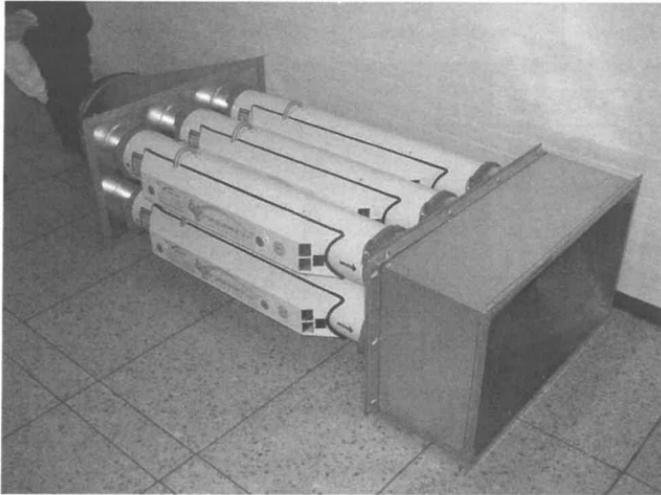


In die oben beschriebene Versuchs-RLT-Anlage [7] wurden über einen Pari-Aerosolgenerator (Pari-LC Plus) definierte Virenmengen eingebracht.

Sowohl für die Bestimmung der Infektiosität als auch für die PCR erfolgte die Luftprobenahme am Luftauslass mittels Sartorius Membranfiltration. Hierzu wurde eine isokinetische Luftprobenahme (Luftprobenahmegerät Sartorius MD8) mit standardisierten Gelatinefiltern durchgeführt, wobei jeweils 1 m^3 Luft über 10 min bei einer Saugleistung von $6 \text{ m}^3/\text{h}$ abfiltriert wurde. Die Filter wurden anschließend für die jeweilige Nachweismethodik aufbereitet [7].

Die Inaktivierungsexperimente wurden mit Steritube UVC-Modulen (TUV,UVC 2 x 95W, Philipps) der Firma Virobuster Technology, Niederlande durchgeführt, wobei die UVC-Strahler separat zuschaltbar waren. Jedes Modul hat eine Durchflusskapazität von $400 \text{ m}^3/\text{h}$ pro Stunde und lässt sich in beliebiger Anzahl über einfache Steckverbindungen mit Adapteranschlüssen in RLT Anlagen integrieren (Abb.2). Die Bestrahlungsdosis betrug $77 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. Die Luftprobenahmen erfolgten im Auslassbereich eines Modules.

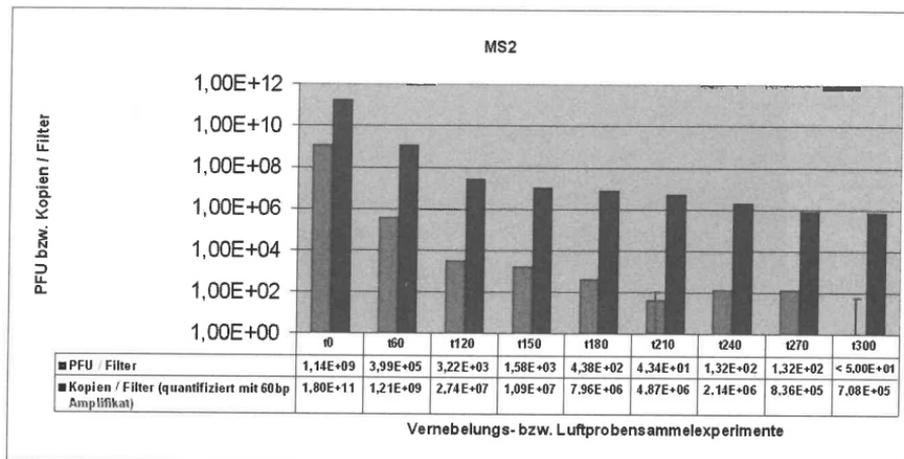
Abb. 2: Steritube UVC-Modultechnologie der Firma Virobuster zum Einbau in RLT-Anlagen



Ergebnisse

Exemplarisch werden hier Ergebnisse für einzelne Bakteriophagen wiedergegeben. Die Gesamtergebnisse sind unter [7] publiziert.

Die Abbildung 3 stellt die Verweilzeit des Bakteriophagen MS2 dar. MS2 kann als Modellsystem für Noroviren betrachtet werden. Nach Vernebelung von $4,68 \times 10^{10}$ Viren in den Luftstrom des RLT-Modules (kein Filterelement integriert) lassen sich selbst nach vier Stunden noch >100 infektiöse Partikel pro Kubikmeter Zuluft nachweisen (heller Balken). Die Abreicherung der Viren wird über Real-Time PCR bestätigt (dunkler Balken).

Abb. 3: Verweilzeit von MS2 nach Vernebelung in eine RLT-Anlage

Deutlich wird hierbei ebenfalls die Sensitivität des spezifischen Nukleinsäurenachweises mittels Real-Time PCR. Nach 300 min nach Vernebelung (t_{300}) sind keine infektiösen Virenpartikel mehr nachweisbar, währenddessen die PCR einen deutlichen Nachweis über amplifizierbare Genomanteile liefert.

Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls für die anderen in Tab.1 verwendeten Viren erhalten. Selbst komplexe Viren wie der Bakteriophage Lambda scheinen eine entsprechend hohe Stabilität in Luftströmen zu haben [7].

Bei Integration eines F5 oder F7 Filterelementes wird deutlich, dass weder Aerosole des Virus MS2 noch Nukleinsäure-Moleküle in ausreichender Form durch diese Filterelemente zurückgehalten werden (siehe Tab. 2 und Tab. 3).

Tab. 2: Rückhaltevermögen von F5/F7 Filterelementen: Viren

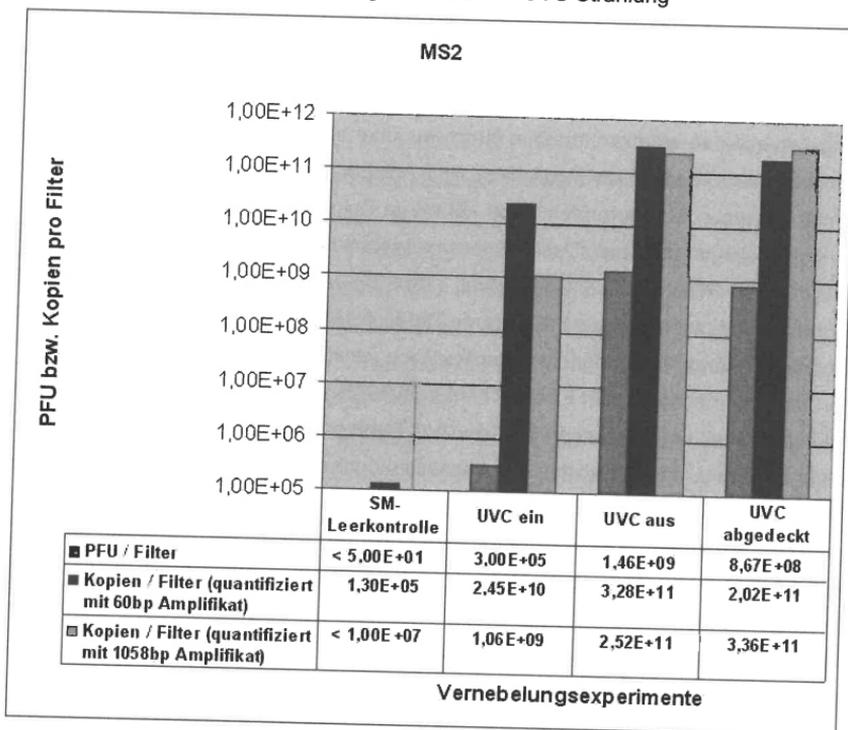
Filterelement	Vernebelte Virenmenge	Infektiöse Viren (PFU*) im Zuluftstrom pro m ³
ohne	$1,5 \times 10^5$	$1,23 \times 10^5$
F5	$1,5 \times 10^5$	$9,67 \times 10^4$
F7	$1,0 \times 10^{11}$	$7,57 \times 10^5$

* PFU= Plaque Forming Units

Tab. 3: Rückhaltevermögen von F5/F7 Filterelementen: Nukleinsäuremoleküle

Filterelement	Vernebelte Nukleinsäure-Kopien	Nukleinsäurekopien im Zuluftstrom (60bp-Amplifikat) t_{60}	Nukleinsäurekopien im Zuluftstrom (60bp- Amplifikat) t_{240}
ohne	$4,49 \times 10^{11}$	$7,9 \times 10^7$	$1,29 \times 10^7$
F5	$2,56 \times 10^{12}$	$1,5 \times 10^8$	$3,34 \times 10^5$
F7	$1,15 \times 10^{13}$	$2,54 \times 10^5$	$5,74 \times 10^5$

Wird dagegen in den Luftstrom ein UVC-Modul integriert, lassen sich wie aus Abb. 4 zu erkennen ist für den Virus MS2 Reduktionen der infektiösen Partikel um fast vier log-Stufen erreichen. Die amplifizierbare Nukleinsäuremenge wird in Abhängigkeit von der zur Analyse eingesetzten Amplifikat-Länge durch UVC-Bestrahlung reduziert.

Abb. 4: Reduktion des Bakteriophagen MS2 durch UVC Strahlung

Der komplex gebaute Bakteriophage Lambda lässt sich sogar bei einmaliger Passage des Steritube-UVC Modules von $1,64 \times 10^6$ infektiösen Virenpartikeln unter die Nachweisgrenze von 1×10^2 reduzieren [7].

Diskussion

Die vorliegenden Daten zeigen (Tab. 2), dass die derzeit in der VDI6022 vorgeschlagenen Filterelemente keine ausreichende Reduktion von infektiösen Virenpartikeln bieten. Die bei einer Norovirusinfektion einer Einzelperson freigesetzten Viruspartikel (einmalig/Vomitus) können bei über 3×10^7 liegen [5]. Die experimentell ermittelten Daten mit dem morphologisch eng verwandten MS2-Virus demonstrieren, dass man durchaus einen Transfer von Bioaerosolen über RLT-Anlagen vermuten kann, zumal Infektionsdosen bei diesem extrem umweltstabilen Virus von 10-100 Viruspartikeln ausreichen. Selbst komplex gebaute Viren sind in Luftströmen von RLT-Anlagen mehrere Stunden stabil.

Die molekularbiologischen Analysen mittels Real-Time PCR demonstrieren, dass eine schnelle und sensitive Analytik viraler Nukleinsäuren im Luftstrom von RLT-Anlagen auf Basis der Sartorius Probenahme-Technik möglich ist. Die PCR-Analytik kann nicht die eigentlichen Plattierungsexperimente ersetzen, die den Nachweis über infektiöse Viren liefern. Allerdings besteht mit der Real-Time PCR die Möglichkeit, RLT-Anlagen schnell und sensitiv auf mögliche virale Kontaminationen zu überprüfen. Dies könnte in Zukunft eine Möglichkeit bieten, die Effizienz von Reinigungs- bzw. Desinfektionsmaßnahmen zu validieren. Die geringere Kopienanzahl nach PCR mit UVC-Bestrahlung (1058 bp-Amplifikat, Abb. 4) ist durch eine höhere Mutationswahrscheinlichkeit bei längeren Ziel-Molekülen zu begründen. UVC induzierte Mutationen stellen Hemmstellen für die in der Reaktion verwendete DNA-Polymerase dar [8]. Eine Alternative zu mechanischen Filterelementen bietet hinsichtlich der Inaktivierung viraler Erreger die UVC-Strahlung. Die Integration von UVC-Strahlern in RLT-Anlagen zeigt eine hohe Inaktivierungseffizienz im Vergleich zum Rückhaltevermögen der hier getesteten Filterelemente. Die Entwicklungsarbeit in der Strahlertechnologie in den letzten 15 Jahren hat zu leistungsfähigen, ozonfreien Strahlertypen geführt, die bei Einbau in eine RLT-Anlage eine echte Alternative zur Reduktion luftgetragener Mikroorganismen insbesondere von Viren bieten. Die Modularität des hier verwendeten Steritubes (Fa. Virobuster, Niederlande) bietet die Möglichkeit eines einfachen Einbaues der Module auch in bereits bestehende Anlagen.

Zukünftige Feldstudien sollen zeigen, inwieweit eine Integration von UVC-Modulen in RLT-Anlagen zur Reduktion von Gesundheitsbeschwerden bei Mitarbeitern führen kann. Geplant ist weiterhin zu überprüfen, ob die an Bakteriophagen gewonnenen Daten tatsächlich auch auf human- bzw. tierpathogene Viren übertragbar sind. Hierzu wird derzeit für das Feline Calicivirus

(Modell für Norovirus) ein Zellkultursystem entwickelt, das experimentell genutzt werden kann, um die Infektiosität dieser Viren nachzuweisen. Weiterhin sollen im Rahmen von Feldstudien zukünftig bei Hygieneinspektionen gewonnene Luftproben mittels Real-Time PCR auch auf Viren untersucht werden.

Literatur

- [1] VDI6022 Blatt1 Hygiene-Anforderungen an Raumluftechnische Anlagen und Geräte, 2. Auflage, April 2006.
- [2] Gwaltney J.M., Jr. (1995). Acute Bronchitis. In Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Hrsg.). Principles and Practice of Infectious Diseases. Fourth edition, Churchill Livingstone. New York, Edinburgh, London, pp. 606-612.
- [3] Müller, T.R. (1996). Infektionen des mittleren und unteren Respirationstraktes. In Vogel, F. (Hrsg.). Respiratorische Infektionen, 2. Auflage. Kohlhammer Serie Pneumologie. W. Kohlhammer, Stuttgart, Berlin, Köln, pp. 23-32.
- [4] Lode, H. (1990). Infektionen der Atemwege – wann besteht eine Indikation zur Antibiotikatherapie? *Pneumologie* 44: 763-766.
- [5] Marks, P.J., Vipond, I.P., Carlisle, D., Deakin, D., Fey, R.E., Caul, E.O. (2000). Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol. Infect* 124:481-487.
- [6] Menzies, D., Popa, J., Hanley, J., Rand, T., Milton, D. (2003). Effect of ultraviolet germicidal lights installed in office ventilation systems on workers health and wellbeing: double-blind multiple crossover trial. *Lancet* 362:1785-91.
- [7] Walenda, T. (2007). Transmission von Viren über Raumluftechnische Anlagen Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- [8] Schulz, J., Bempohl, A., Dreiseikelmann, B. (2003). Inaktivierung luftgetragener DNA-Aerosole mit Hilfe einer UVC-Arbeitskabine (Biotec). *GIT Laborfachzeitschrift* 47: 52-54.

Diese Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Industriestiftung (Projekt S770 [U36-05]).

Reinraumtechnik: Innovative Verfahren zum Schutz von Produkten und Personen



VDI-Berichte 1973