

Transmission von Viren durch Raumluftechnische Anlagen und Inaktivierung durch UVC-Strahlung

Dreier J.¹, Bermpohl A.², Jeschin P.³, Becker B.³, Kleesiek K.¹

¹ Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen

² Biotec GmbH, Gütersloh

³ Life Science Technologies, Labor Mikrobiologie, Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Lemgo.

Einleitung: Viren, die über Vernebelungsexperimente in eine Raumluftechnische (RLT)-Anlage eingebracht werden, sind bis zu vier Stunden später noch in infektiöser Form im Zuluftstrom nachweisbar. Dabei sind in RLT-Anlagen zu verwendende F5/F7-Filterelemente 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.

Methode: Für die Studien zur Virustransmission wurde eine Auswahl morphologisch differenter Bakteriophagen als Modellsystem herangezogen. Die Bestimmung der Infektiosität der Phagen erfolgte über standardisierte Weichagar-Plattierungsmethoden, die Quantifizierung über die Bestimmung der PFU (Plaque Forming Units). Virale Nukleinsäuren wurden mittels Real-Time PCR nach Luftprobenahme im Filtrationsansatz bestimmt. Zur Überprüfung des Rückhaltevermögens von F5- und F7-Filtern wurde eine standardisierte RLT-Anlage mit kommerziellen Ta schenfilterelementen aufgebaut. Die Inaktivierungsexperimente wurden mit VIROBUSTER® Steritube Modulen durchgeführt.

Ergebnisse: Nach Vernebelung von $4,68 \cdot 10^{10}$ Viren in den Luftstrom des RLT-Moduls lassen sich nach vier Stunden noch mehr als 100 infektiöse Partikel des Bakteriophagen MS2 pro Kubikmeter Zuluft nachweisen. Erst 300 Minuten nach der Vernebelung sind keine infektiösen Virenpartikeln mehr nachweisbar. Bei Integration eines F5- oder F7-Filterelements werden MS2-Aerosole nicht in ausreichender Form durch diese Filterelemente zurückgehalten werden. Ein Großteil der eingebrachten Viren verbleibt in der RLT-Anlage. Es kommt im Vergleich zur Kontrolle ohne Filter zu einer mechanischen Abreicherung der Viren um eine log-Stufe (F7) bzw. 0,2 log-Stufen (F5). Bei Integration eines UVC-Moduls in den Luftstrom werden für das MS2-Virus Reduktionen der infektiösen Partikeln um fast vier log-Stufen erreicht.

Schlussfolgerungen: Die derzeit in der Richtlinie VDI 6022 vorgeschlagenen Filterelemente bieten nur eine begrenzte Reduktion von infektiösen Virenpartikeln in Zuluft- bzw. Umluftströmen. Hier bietet UVC-Strahlung eine Alternative zur Inaktivierung viraler Erreger. Die Integration von UVC-Strahlern in RLT-Anlagen zeigt eine hohe Inaktivierungseffizienz im Vergleich zum Rückhaltevermögen der getesteten Filterelemente.

Transmission von Viren durch Raumluftechnische Anlagen und Inaktivierung durch UVC-Strahlung

J. Dreier, A. BERPPOHL, P. JESCHIN, B. BECKER, K. KLEESIEK

Zusammenfassung Viren, die über Vernebelungsexperimente in eine Raumluftechnische (RLT)-Anlage eingebracht werden, sind bis zu vier Stunden später noch in infektiöser Form im Zuluftstrom nachweisbar. 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 VDI 6022 in RLT-Anlagen zu verwendenden F5/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.

Virus transmission via HVAC systems and inactivation using UVC irradiation

Abstract The present study demonstrates that viruses that have been introduced into an experimental heating, ventilation, and air conditioning (HVAC) system in nebulization experiments will be detectable in the supply air stream up to four hours later. Even complex viruses remain detectable within this timeframe in an infectious form. Real-time polymerase chain-reaction (PCR) provides quantitative and highly sensitive detection of viral nucleic acids in air streams. The F5/F7 filter units required for HVAC systems by the VDI 6022 guideline are not capable of removing viruses to a sufficient degree. Viruses can be reduced, partly to below the detection limit, by integrating UVC modules into the air stream.

1 Einleitung

Um Infektionsrisiken durch Raumluftechnische Anlagen (RLT-Anlagen) zu minimieren, wurde im Juli 1998 die Richtlinie VDI 6022 entworfen und im April 2006 neu verfasst. Diese Richtlinie definiert den Stand der Technik hinsichtlich hygienischer Anforderungen an RLT-Anlagen [1]. Neben der hygienegerechten Auswahl und Anordnung der RLT-Komponenten sind auch regelmäßige Wartungsarbeiten entscheidend für die Verhinderung der Übertragung von Krankheitserregern über den Luftstrom. Im Fokus der Richtlinie stehen bei den mikrobiellen Erregertypen Bakterien und Pilze, während Viren eher unbeachtet bleiben. Welchen wesentlichen Anteil jedoch Viren an Atemwegsinfektionen

haben, wird dadurch deutlich, dass bei den meisten Erkrankungen des Atemtraktes in den Wintermonaten stets eine initiale Virusinfektion zu beobachten ist. Das Erregerspektrum umfasst Adenoviren, Coronaviren, RS-Viren, Rhinoviren, Influenza-A- und -B-Viren sowie Parainfluenzaviren und Enteroviren [2; 3]. Dabei kann auch ein Transfer viraler Erreger durch RLT-Anlagen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Derzeit ist wenig über die Infektiosität von Viren nach längerer Luftexposition bekannt, was aber nicht zwangsläufig bedeutet, dass man die Infektionsroute über RLT-Anlagen ausschließen kann. So ist beispielsweise für Noroviren, einen wichtigen Erreger der Gastroenteritis bekannt, dass er äußerst umweltstabil und infektiös ist. Die Infektionsdosis liegt bei 10 bis 100 Partikeln [4]. Ein Transfer von Viren über RLT-Anlagen wäre denkbar, insbesondere bei Anlagen mit Umluftanteil.

Also stellt sich die Frage, ob die derzeit in RLT-Anlagen für Büro-, Versammlungs- und Produktionsräumen verwendeten Filterelemente für Außenluftanteile (F7 Zuluft/F5 Umluft) in der Lage sind, Virusaerosole 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-Systemen in RLT-Anlagen führte zu einer Reduktion von arbeitsplatzbezogenen Krankheitssymptomen, insbesondere der Atemwege und der Schleimhaut [5].

2 Material und Methoden

Für die Studien zur Virustransmission wurde aus sicherheitstechnischen Gründen eine Auswahl morphologisch differenter Bakteriophagen bzw. eines tierpathogenen Virus als Modellsystem herangezogen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich Größe, Virusgenom und Hüllstruktur (**Bild 1**). Die Virenauswahl repräsentiert ein breites morphologisches Spektrum. Die Bestimmung der Infektiosität der Phagen erfolgte über standardisierte Weichagar-Plattierungsmethoden mit definierten Bakterien-Indikatorstämmen, die Quantifizierung über die Bestimmung der PFU (Plaque Forming Units). Die Quantifizierung feline Caliciviren erfolgte mittels CRFK (Crandel Feline Kidney)-Zellen [6]. Neben der Infektiosität wurde die virale Nukleinsäure mittels Real-Time PCR¹⁾ nach Luftprobenahme im Filtrationsansatz bestimmt. Hierzu wurde eine Aufreinigungsmethode erarbeitet, die Virus-Nukleinsäure in ausreichender Reinheit für die nachfolgende PCR liefert. Für die Real-Time PCR wurde ein Thermocycler Rotorgene 3000 (Corbett Research, Sydney) verwendet. Durch Einsatz verschiedener Primerkombinationen

Dr. rer. nat. Jens Dreier, Prof. Dr. med. Knut Kleesiek,

Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, Bad Oeynhausen.

Dr. rer. nat. Andreas BERPPOHL,

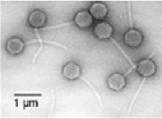
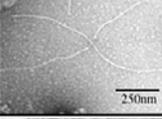
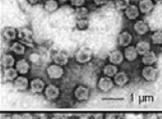
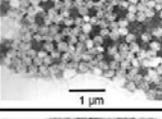
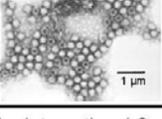
Biotech GmbH, Gütersloh.

Dipl.-Ing. Petra Jeschin,

Prof. Dr. rer. nat. Barbara Becker,

Life Science Technologies, Labor Mikrobiologie, Hochschule Ostwestfalen-Lippe, Lemgo.

¹⁾ PCR: Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

Virus (Wirt)	Virusgenom		Hüllstruktur	Größe	Morphologie ¹⁾	Modellvirus für humanpathogenes Analogon
	Nukleinsäure	Struktur				
Lambda (<i>Escherichia coli</i>)	ds-DNA	linear	Kopf-Schwanz-Typ, nackt	250 nm (Kopf 64 nm)		Herpesviridae z. B. Epstein-Barr-Virus
M13 (<i>Escherichia coli</i>)	ss-DNA (+Strang)	ringförmig	Filament, nackt	760 bis 1950 nm (Durchmesser 7 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
Felines Calicivirus (FCV) (Katze)	ss-RNA (+Strang)	linear	Ikosaeder, nackt	33 nm		Caliciviridae z. B. Norovirus

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

Bild 1. Virenauswahl und humanpathogenes Analogon.

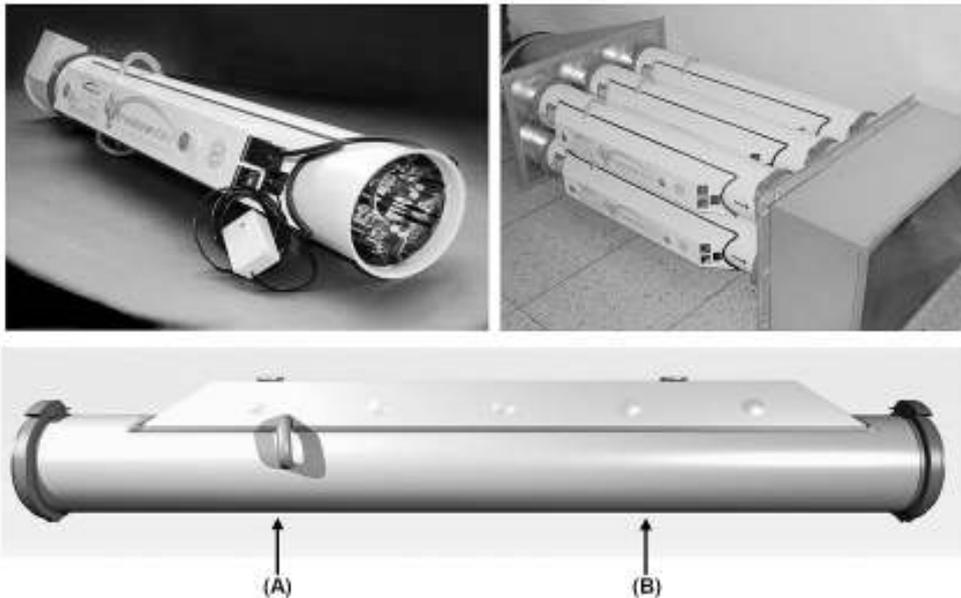


Bild 2. Steritube UVC-Modultechnologie (Fa. Virobuster) zum Einbau in RLT-Anlagen.
oben: Ansicht eines Steritube-Moduls und mehrerer in paralleler Schaltung
unten: Links befindet sich der Lufteinlass, rechts der Luftauslass; (A): Der Pfeil weist auf die Position des Ventilators im Inneren des Steritubes; (B): Der Pfeil weist auf die Position des UVC-Bestrahlungsbereichs im Inneren des Steritubes (2 x 95 W UVC-Röhren, Philips)

nen konnten virenspezifische Amplifikate unterschiedlicher Länge erzeugt und mit spezifischen fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonden detektiert werden [7]. Zur Überprüfung des Rückhaltevermögens von F5- und F7-Filtern wurde eine standardisierte RLT-Anlage über eine Länge von 6 m mit einem Kanalquerschnitt von 400 mm x 700 mm aufgebaut, die mit kommerziell erhältlichen Taschenfilterelementen ausgerüstet wurde. Neben den beiden Filterstufen waren ein Kühlerelement sowie die Ventilator-kammer und ein UVC-Modul mit Lichtfallen integriert. Die beaufschlagten Luftvolumina wurden entsprechend der Filterherstellerangaben über eine variable Ventilatorsteuerung eingestellt (2 000 m³/h). Die Differenzdruckkontrolle

erfolgte über ein Differenzdruckmanometer. In die Versuchs-RLT-Anlage wurden über einen Pari-Aerosolgenerator (Pari-LC Plus) definierte Virenmengen eingebracht. Der mediane Durchmesser der erzeugten Aerosolpartikeln lag bei 3,8 µm. Sowohl für die Bestimmung der Infektiosität als auch für die PCR erfolgte die Luftprobenahme am Luftauslass mithilfe der Membranfiltration. Hierzu wurde eine isokinetische Luftprobenahme (Luftprobenahmegerät Sartorius MD8) mit standardisierten Gelatinefiltern durchgeführt, wobei jeweils 1 m³ Luft über 10 min bei einer Saugleistung von 6 m³/h abfiltriert wurde. Die Filter wurden anschließend für die jeweilige Nachweismethodik aufbereitet.

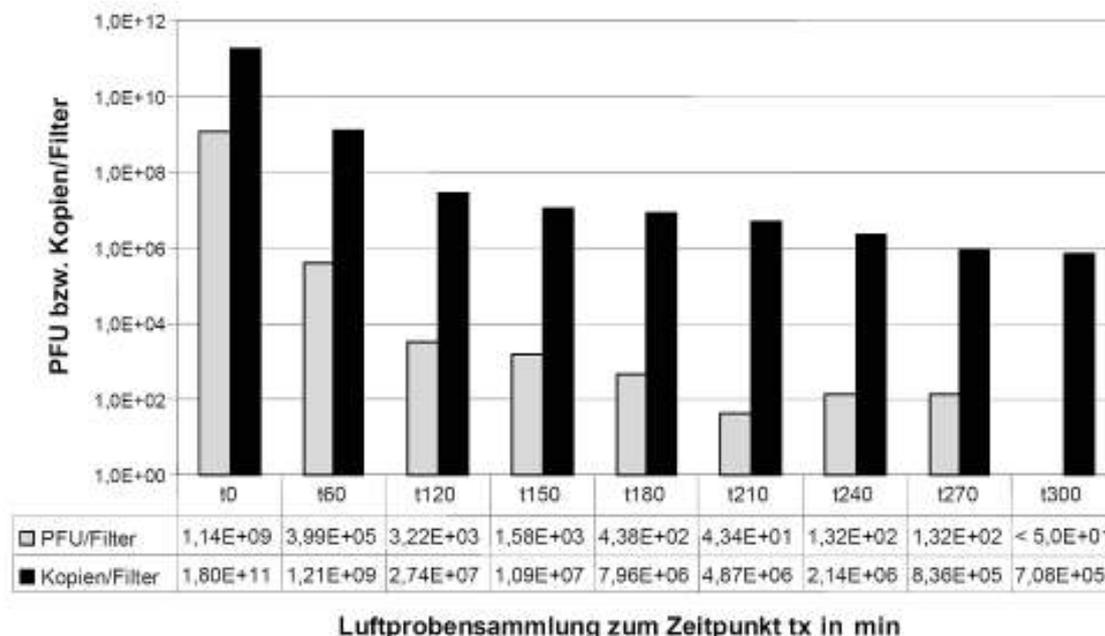


Bild 3. Verweilzeit von MS2-Viren nach Vernebelung in eine RLT-Anlage.
 Ermittelte MS2-Konzentrationen mittels Phagentiterung (PFU; graue Balken) und Real-Time PCR (Kopien; schwarze Balken) pro Gelatinefilter. Nach einmaliger Vernebelung von $4,68 \cdot 10^{10}$ PFU in die RLT-Anlage wurden Luftproben zum Zeitpunkt t_0 sowie zu den Zeitpunkten t_{60} bis t_{300} (min) entnommen; die untere Nachweisgrenze der PFU-Bestimmung beträgt 100 PFU/Filter, die der Real-time PCR 50 Kopien/Filter.

Die Inaktivierungsexperimente wurden mit Steritube UVC-Modulen (TUV, UVC 2 x 95 W, Philips) der Fa. Virobuster Technology, Niederlande, durchgeführt, wobei die UVC-Strahler separat zuschaltbar waren. Jedes Modul hat eine Durchflusskapazität von maximal 400 m³/h und lässt sich in beliebiger Anzahl über einfache Steckverbindungen mit Adapteranschlüssen in RLT-Anlagen integrieren (Bild 2). Die Bestrahlungsdosis kann bei einer Luftgeschwindigkeit von 4,1 m/s mit 5,4 mWs/cm² angegeben werden. Diese Dosiswerte werden aber gemäß Herstellerangaben durch einen Radialventilator (Luftverwirbelung) und durch reflektierende Brennerkammeroberflächen um ein Vielfaches erhöht. Die Luftprobenahmen erfolgten direkt im Auslassbereich eines Moduls mit Membranfiltration.

3 Ergebnisse

Die Verweilzeit des Bakteriophagen MS2 in einer RLT-Modellanlage wurde untersucht (Bild 5). MS2 kann als Modellsystem für Noroviren betrachtet werden. Nach Vernebelung von $4,68 \cdot 10^{10}$ Viren in den Luftstrom des RLT-Moduls (kein Filterelement integriert), lassen sich selbst nach vier Stunden noch mehr als 100 infektiöse Partikel pro Kubikmeter Zuluft nachweisen. Die Abreicherung der Viren wird über Real-Time PCR bestätigt. Deutlich wird hierbei ebenfalls die Sensitivität des spezifischen Nukleinsäurenachweises mit Real-Time PCR. 300 min nach der Vernebelung (t_{300}) sind keine infektiösen Virenpartikeln mehr nachweisbar, während die PCR einen deutlichen Nachweis über amplifizierbare Genomanteile liefert.

Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls für die anderen in Bild 1 gezeigten Viren erhalten. Selbst komplexe Viren, wie der Bakteriophage Lambda und M15, scheinen eine entsprechend hohe Stabilität in Luftströmen zu haben.

Bei Integration eines F5- oder F7-Filterelementes wird deutlich, dass Aerosole des Virus MS2 nicht in ausreichender Form durch diese Filterelemente zurückgehalten werden (siehe Bild 4). Dabei zeigt sich, dass ein Großteil der eingebrachten Viren in der RLT-Anlage verbleibt, bzw. nicht auf dem Membranfilter des Luftprobenahmesystems nieder-

Eingebrachte Virenmenge (MS2) $1,5 \cdot 10^8$ PFU

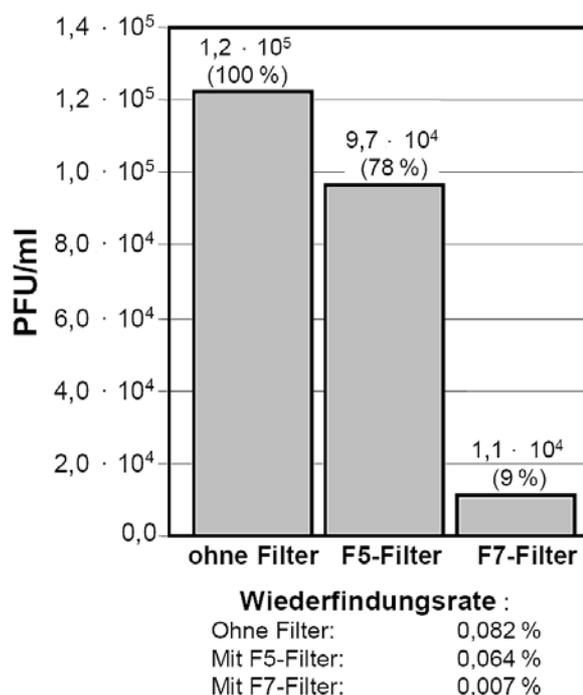


Bild 4. Abreicherung von MS2-Viren (PFU) mittels F5- bzw. F7-Filter.

Dargestellt ist die Wiederfindung von MS2-Phagen nach Passage einer RLT-Anlage mit und ohne Filterelemente

geschlagen wird. Dies war zu erwarten, da der für die Membranfiltration eingesetzte Filterquerschnitt nur einem Teilquerschnitt des Luftkanals entspricht. Die Wiederfindungsrate beträgt zwischen 0,82 (ohne Filter) und 0,07% (F7) nach Passage. Damit kommt es zwar zu einer mechanischen Abreicherung der Viren um eine log-Stufe (F7) bzw. 0,2 log-Stufen (F5) im Vergleich zur Kontrolle ohne Filter, jedoch ist dies insbesondere beim F5-Filterelement wenig effektiv. Wird dagegen in den Luftstrom ein UVC-Modul integriert, lassen sich, wie aus Bild 5 zu erkennen ist, für das Virus MS2 Reduktionen der infektiösen Partikeln um fast vier log-Stu-

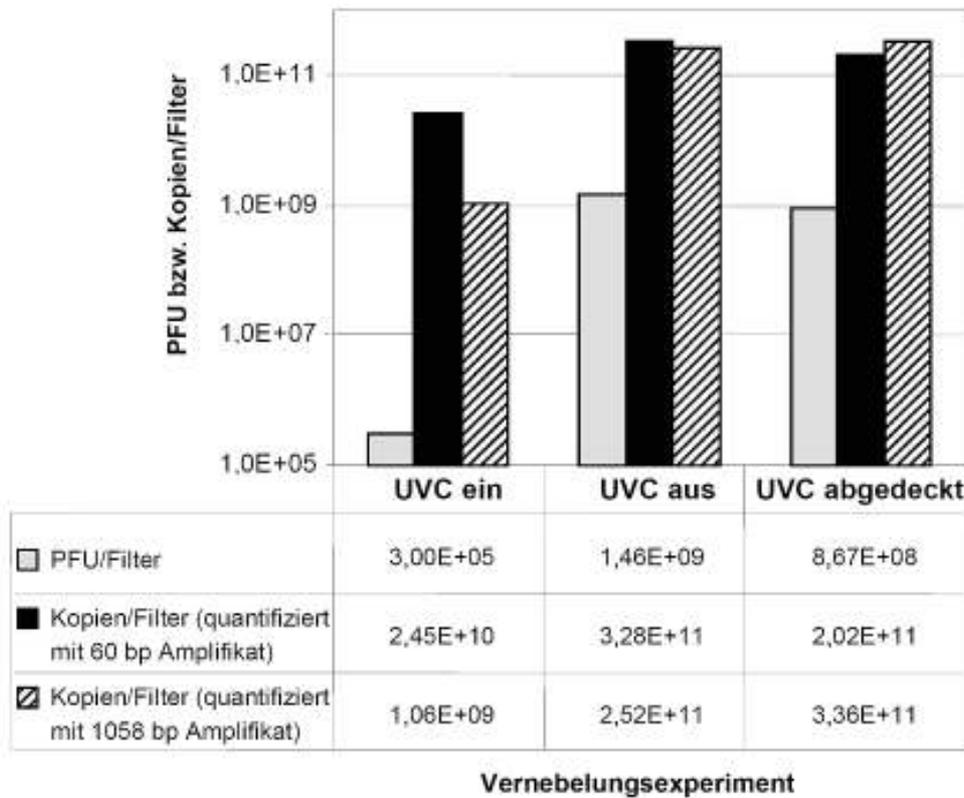


Bild 5. Reduktion des Bakteriophagen MS2 durch UVC-Strahlung.
 Ermittelte Phagenkonzentration pro Filter mittels Titerung (PFU; graue Balken) und Real-Time PCR mit 60 bp (schwarze Balken) bzw. 1 058 bp-Amplifikatgröße (schraffierte Balken) bestimmten Kopienzahlen nach verschiedenen Vernebelungsexperimenten mit und ohne UVC-Bestrahlung des Luftstroms sowie eingeschalteten abgedeckten UVC-Röhren

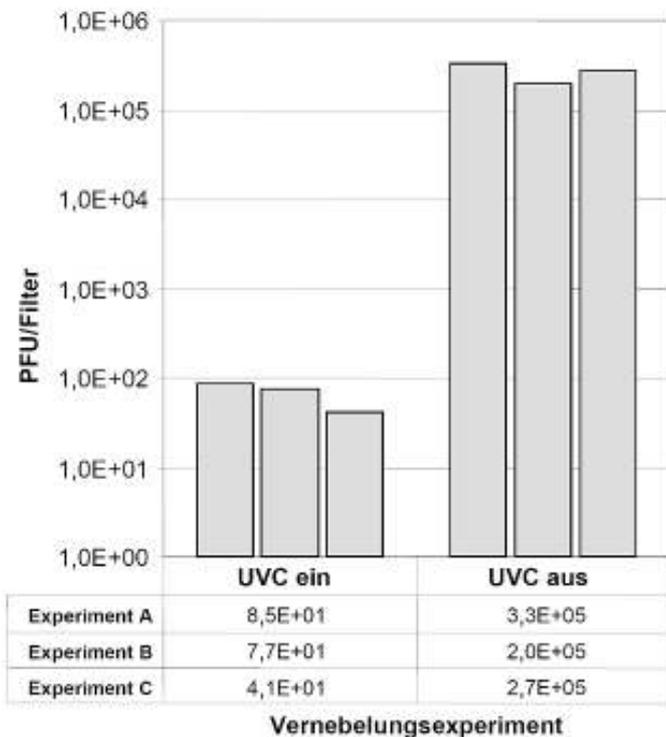


Bild 6. Reduktion des Felinen Calicivirus (FCV) mit UVC-Strahlung in einer RLT-Anlage (Steritube, Fa. Virobuster).

feren erreichen. Die amplifizierbare Nukleinsäuremenge wird in Abhängigkeit von der zur Analyse eingesetzten Amplifikat-Länge durch UVC-Bestrahlung reduziert. Der komplex gebaute Bakteriophage Lambda lässt sich sogar bei einmaliger Passage des Steritube-UVC-Moduls von $1,64 \cdot 10^6$ infektiösen Virenpartikeln unter die Nachweisgrenze von $1 \cdot 10^2$ reduzieren. Für den filamentösen *E. coli*

Phagen M13 und phi X174, beides ss-DNA-Phagen, wurden Reduktionsraten bei zugeschalteter UVC von 99,999 % ermittelt.

Die Vernebelung feiner Caliciviren in RLT-Modellanlagen zeigte, dass der Einsatz eines F7-Filterelements lediglich zu einer Reduktion luftgetragener Viren um eine log-Stufe führte. Währenddessen konnte durch UVC-Strahlung eine Reduktion um vier log-Stufen erzielt werden (Bild 6). Die Daten belegen also die Effektivität von UVC-Modulen gegenüber klassischen Filterelementen hinsichtlich der Inaktivierung luftgetragener Viren.

4 Diskussion

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die derzeit in der Richtlinie VDI 6022 vorgeschlagenen Filterelemente nur eine begrenzte Reduktion von infektiösen Virenpartikeln in Zuluft- bzw. Umluftströmen bieten. Die Zahl der bei einer Norovirusinfektion einer Einzelperson über Erbrochenes (Vomitus) freigesetzten Viruspartikeln kann bei über $3 \cdot 10^7$ liegen [4]. 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 bis 100 Viruspartikeln ausreichen. Selbst komplex gebaute Viren sind in Luftströmen von RLT-Anlagen mehrere Stunden stabil. Die molekularbiologischen Analysen mit Real-Time PCR demonstrieren, dass eine schnelle und sensitive Analytik viraler Nukleinsäuren im Luftstrom von RLT-Anlagen auf der Basis der Membranfiltration 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 Kontami-

nationen zu überprüfen. Dies könnte in Zukunft eine Möglichkeit bieten, die Effizienz von Reinigungs- bzw. Desinfektionsmaßnahmen zu validieren.

Eine Alternative zu mechanischen Filterelementen für die Inaktivierung viraler Erreger bietet die UVC-Strahlung. Die Integration von UVC-Strahlern in RLT-Anlagen zeigt eine hohe Inaktivierungseffizienz im Vergleich zum Rückhaltevermögen der 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 gute Alternative zur Reduktion luftgetragener Mikroorganismen, insbesondere von Viren bieten. Die Modularität des hier verwendeten Steritubes bietet die Möglichkeit eines einfachen Einbaus der Module auch in bereits bestehende Anlagen.

Zukünftige Feldstudien sollen zeigen, inwieweit eine Integration von UVC-Modulen in RLT-Anlagen zur Reduktion von Befindlichkeitsstörungen/Gesundheitsbeschwerden bei Mitarbeitern führen kann. Weiterhin sollen im Rahmen von Feldstudien zukünftig bei Hygieneinspektionen an RLT-Anlagen gewonnene Luftproben mit Real-Time PCR auch auf Viren untersucht werden. Dabei wäre insbesondere eine Analyse der Filtrerrückstände von Interesse.

Danksagung

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

Literatur

- [1] VDI 6022 Blatt 1: Hygiene-Anforderungen an Raumluftechnische Anlagen und Geräte. Berlin: Beuth 2006.
- [2] *Gwaltney, J. M.*: Acute Bronchitis. In: *Mandell, G. L.; Bennett, J. E.; Dolin, R.* (Hrsg.): Principles and practice of infectious diseases, S. 606-612. 4th Ed. New York: Churchill Livingstone 1995.
- [3] *Müller, T. R.*: Infektionen des mittleren und unteren Respirationstraktes. In: *Vogel, F.* (Hrsg.): Respiratorische Infektionen, S. 23-32. 2. Aufl. Stuttgart: W. Kohlhammer 1996.
- [4] *Marks, P. J.; Vipond, I. P.; Carlisle, D.; Deakin, D.; Fey, R. E.; Caul, E. O.*: Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiol. Infect.* 124 (2000), S. 481-487.
- [5] *Menzies, D.; Popa, J.; Hanley, J.; Rand, T.; Milton, D.*: Effect of ultraviolet germicidal lights installed in office ventilation systems on workers health and wellbeing: double-blind multiple crossover trial. *Lancet* 362 (2003), S.1785-1791.
- [6] *Bidawid, S.; Malik, N.; Adegbinrin, O.; Sattar, S. A.; Farber, J. M.*: A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus. *J. Virol. Methods* 107 (2003), S. 163-167.
- [7] *Dreier, J.; Störmer, M.; Kleesiek, K.*: Use of bacteriophage MS2 as internal control in viral RT-PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005), S. 4551-4557.