



**Forschungsvorhaben S 770
gefördert durch die
Stiftung Industrieforschung:**

**Analyse der
Verbreitung aerogener Viren
über Raumluftechnische Anlagen und
Entwicklung von Desinfektionsmaßnahmen**



Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Kleesiek

Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
Georgstraße 11
32545 Bad Oeynhausen

Tel.: 05731 - 97 13 90
Fax.: 05731 - 97 23 07
E-Mail: iltm@hdz-nrw.de

www.hdz-nrw.de
www.blutspendedienst-owl.de

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung	5
1.	Allgemeine Angaben	6
1.1	Antragssteller	6
1.2	Forschungsthema	6
1.3	Zuschussempfänger	7
1.4	Forschungsstellen	7
1.5	Projektlaufzeit	10
1.6	Fördersumme	10
1.7	Angaben über Pilotunternehmen	10
1.8	Konsortium	11
2.	Einleitung	14
2.1	Viren	14
2.2	Übertragung von Viren auf dem Luftweg	14
2.3	Das Sick Building Syndrome (SBS)	17
2.4	Modellsysteme humanpathogener Viren	18
2.4.1	Bakteriophagen	18
2.4.2	Feline Caliciviren als Modellsystem für humanpathogene Noroviren	21
2.5	Germizide Wirkung ultravioletter Strahlung	23
2.6	RLT-Modellanlagen	25
2.7	UV-Bestrahlung zur Inaktivierung von Mikroorganismen und Viren	29
2.8	Untersuchung der Virusinaktivierung mittels PCR	31
3.	Material	32
3.1	Primer	32
3.2	TaqMan-Sonden	34
3.3	Bakterienstämme	35
3.4	Bakteriophagen	35
3.5	Zelllinie und Virus der Analyse feliner Caliciviren	35
3.6	Reagenzien	36
3.7	PCR-Reagenzien, Enzyme	37
3.8	Nährmedien zur Kultivierung der Bakterien	37
3.9	Medienzusätze	38
3.10	Material zur Analyse feliner Caliciviren	39
3.11	Medien zur Analyse feliner Caliciviren	39
3.12	Puffer	40
3.13	Testkits	40

3.14	Geräte	41
3.15	Verbrauchsmaterialien	42
3.16	Software	43
3.17	DNA-Längenstandards	44
3.17.1	Daten und Herstellerangaben zum Steritube HVAC (Virobuster, Enschede, NL)	44
3.17.2	Daten und Herstellerangaben zum BÄ•RO UVC-Modul	45
4.	Methoden	46
4.1	Kultivierung der Bakterien, Herstellung von Phagenlysaten durch konfluente Lyse sowie Titerung von Phagenlysaten und Gelatinefilterproben	46
4.1.1	Kultivierung der Bakterien und Aufbereitung zum Plattieren mit Phagen	46
4.1.2	Bestimmung des Phagentiters mittels TOP-Agar-Methode	46
4.1.3	Herstellung von Phagenlysaten durch konfluente Lyse	47
4.1.4	Titerung eines Lysats	47
4.2	Vernebelung von Phagenlysaten und Luftprobennahme	48
4.2.1	Vernebelung von Phagenlysaten	48
4.2.2	Luftprobennahme	48
4.2.2.1	Luftprobennahmebedingungen	48
4.2.3	Desinfektion der RLT-Modellanlagen	49
4.3	Nukleinsäureextraktion aus Phagenlysaten und Filtern	49
4.3.1	DNA-Extraktion	49
4.3.1.1	Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll	50
4.3.2	RNA-Extraktion	50
4.3.2.1	Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll	51
4.3.3	Plasmidisolierung aus Bakterien	51
4.3.3.1	Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll	51
4.4	Isolierung eines PCR-Produktes in den pCR-2.1-TOPO Vektor und Klonierung in <i>E. coli TOP 10 F'</i>	52
4.4.1	Durchführung (nach dem Protokoll des Herstellers modifiziert)	53
4.4.2	Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durch M13-PCR	54
4.4.2.1	Durchführung	54
4.4.3	Herstellung von PCR-Standards mit definierter Kopienzahl	55
4.4.3.1	DNA-Standards von Lambda, M 13 und Phi X174	55
4.4.3.2	RNA-Standards von MS2	56
4.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	56
4.5.1	Herstellung eines Agarosegels	57
4.5.2	Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	57
4.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	57
4.6.1	Primersysteme	57
4.6.2	PCR im Block-Thermocycler	59

4.6.3	Amplifikation in der Real-Time PCR am Rotor-Gene	60
4.6.3.1	Standardprotokolle für Real-Time PCR Reaktionen am Rotor-Gene	61
4.6.3.2	Temperaturprogramme der Real-Time PCR am Rotor-Gene für unterschiedliche Primersysteme	64
4.6.3.3	Absolute Quantifizierung der Kopienzahl mittels Real-Time PCR	66
4.6.4	Amplifikation in der Real-Time PCR am LightCycler	66
4.7	DNA-Sequenzierung	68
4.7.1	Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen)	68
4.7.1.1	Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll	68
4.7.2	DNA-Sequenzierung (Cycle Sequencing)	68
4.7.2.1	Sequenzierungsansatz mit dem „BigDye Terminator Kit“	69
4.7.3	Aufreinigung der Sequenzierreaktion über Sephadex-Säulen	69
4.7.3.1	Durchführung	70
4.7.4	Analyse der DNA-Sequenzierungsprodukte mittels Kapillarelektrophorese	70
4.8	Überprüfung des Rückhaltevermögens von F5 & F7 Filtern und Inaktivierungsexperimente mit Steritube UVC-Modulen	71
4.9	Methode zur Analyse feliner Caliciviren	71
4.9.1	Zellansucht	71
4.9.2	Viruspropagation	71
4.9.3	Durchführung der Titerbestimmung (Plaque Assay)	72
4.9.4	Probennahme und Bestimmung des Virusgehaltes aus den Gelatine-Filtern	72
5.	Ergebnisse	74
5.1	Ermittlung der Wiederfindungsrate und der unteren Nachweisgrenze der Phagentiterung durch die Top-Agar-Methode	75
5.2	Etablierung von PCR-Systemen zum Nachweis UVC-bedingter Nukleinsäureschäden	76
5.2.1	Bestrahlung von Phagen-Nukleinsäuren	76
5.2.1.1	Phi X174-DNA	77
5.2.1.2	Lambda-DNA	77
5.2.1.3	MS2-RNA	78
5.2.1.4	Phi6-RNA und Phi13-RNA	79
5.2.2	Entwicklung einer internen Kontrollreaktion	81
5.2.3	Konstruktion von PCR-Standards	82
5.3	Temperaturabhängige Stabilität des Phagen M13	83
5.4	Vernebelungsexperimente am Steritube	84
5.4.1	Auswirkung der Vernebelungsdauer auf die im Gelatinefilter gemessenen Phagentiter und Genomkopien	84
5.4.2	Vernebelungsbedingter Verlust des Phagentiters	87

5.4.3	Verweildauer von Phagen in RLT-Anlagenkomponenten	91
5.5	Einfluss von UVC-Bestrahlung des Luftstroms auf die Transmission von Viren	93
5.5.1	Wirkung von UVC-Strahlung auf Phi X174	94
5.5.2	Wirkung von UVC-Strahlung auf MS2	101
5.5.3	Wirkung von UVC-Strahlung auf Lambda	107
5.5.4	Wirkung von UVC-Strahlung auf M13	110
5.6	Rückhaltevermögen von F5- und F7-Filtern	112
5.7	Wirkung von mechanischer Filtration und UVC-Strahlen auf Feline Caliciviren	114
6.	Diskussion	120
6.1	Etablierung von PCR-Systemen und vorbereitende Versuche	120
6.2	Vernebelung von Phagen in RLT-Anlagen und nachfolgende Luftprobenahme	122
6.3	UVC-Bestrahlung von Luftströmen in RLT-Anlagen	126
6.4	Vergleich der getesteten UVC-Module	131
6.5	Ausblick	132
7.	Literaturverzeichnis	134
8.	Abkürzungsverzeichnis	140
9.	Veröffentlichungen	143
9.1	Publikationen	143
9.2	Tagungsbeiträge	143
9.3	Transfer der Ergebnisse an mittelständige Unternehmen	143
	Anhang	145

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte für verschiedene Virentypen gezeigt werden, dass diese in Luftströmen auch über längere Zeit stabil sind und ihre Infektiosität nicht verlieren.

Diese Tatsache ist insbesondere für komplexer gebaute Viren mit ihren fragilen proteinogenen Strukturen hervorzuheben. Die oftmals vermutete Dehydratisierung von viralen Proteinen mit Verlust der viralen Infektiosität in Luftströmen lässt sich damit nicht bestätigen.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine analytische Methode etabliert, die es ermöglicht mittels Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) virale Nukleinsäuren in Luftströmen zu erfassen und zu quantifizieren. Das hierbei eingesetzte Verfahren der Membranfiltration wurde durch eine Applikation hinsichtlich der Filteraufarbeitung für die PCR-Technologie nutzbar gemacht. Damit steht zukünftig eine Methode zur Verfügung, die es ermöglicht virale Nukleinsäuren in Luftströmen mittels Real-Time PCR sicher und sensitiv zu quantifizieren.

Die derzeit für den Zuluftbereich bzw. für die Umluft nach dem Stand der Technik (VDI 6022) einzusetzenden Filterelemente (F5/F7) wurden auf ihre Filtrationsleistung hinsichtlich viraler Partikel getestet. Hierbei wurde festgestellt, dass RLT-Anlagen mit einer F5-Filterstufe unter den gewählten Bedingungen lediglich zu einer Virus-Abreicherung von 0,2 log-Stufen führen, während dessen Systeme mit einem F7-Filter eine log-Stufe in der Viruselimination erreichen. Für eine Infektion durch Noroviren sind Aerosole mit 10-100 Virenpartikeln ausreichend. Beim Vomittieren einer einzelnen Person können durchaus 3×10^7 Viren in den Luftraum freigesetzt werden. Daher scheint derzeit, insbesondere in Umluftbereichen, kein ausreichender Schutz hinsichtlich derartiger viraler Infektionen vorzuliegen. Die Stabilität in Luftströmen von Felinen Caliciviren (FCV) als Surrogatvirus für humanpathogene Noroviren wurde mittels einer dafür etablierten Nierenzellkultur nachgewiesen.

Die sichere und nachhaltige Inaktivierung viraler Erreger gelingt mittels in Luftströme integrierter UVC-Module. Hierbei spielt, wie der Vergleich zweier unterschiedlicher Systeme zeigt, die Geometrie der Anordnung der UVC-Radiatoren eine wichtige Rolle. Mittels UVC-Integration in die hier verwendeten Versuchsanlagen sind durchgängig Reduktionen luftgetragener Viren um mindestens 10^3 bis 10^5 log-Stufen möglich. Bedenkt man, dass 80% aller Erkrankungen des oberen Atemtraktes initial durch virale Erreger hervorgerufen werden, wird die UVC-Technologie zukünftig große Bedeutung für den Stand der Technik von RLT-Anlagen haben.

1. Allgemeine Angaben

1.1 Antragssteller

Forschungsstelle 1

Prof. Dr. med. Knut Kleesiek (Leiter der Forschungsstelle)
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
Georgstrasse 11
D-32545 Bad Oeynhausen
Tel. +49 (0) 5731-971391
Fax +49 (0) 5731-972307
Email: kkleesiek@hdz-nrw.de

Dr. rer. nat. Jens Dreier (Projektleiter)
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum
Georgstrasse 11
D-32545 Bad Oeynhausen
Tel.: +49 (0) 5731-97-2036
Mobil: +49 (0) 5731-97-3841
Fax: +49 (0) 5731-97-2307
e-mail: jdreier@hdz-nrw.de

1.2 Forschungsthema

Analyse der Verbreitung aerogener Viren über Raumluftechnische Anlagen und Entwicklung von Desinfektionsmaßnahmen

1.3 Zuschussempfänger

Univ.-Prof. Dr. med. Knut Kleesik
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Postfach 10 03 61
32545 Bad Oeynhausen

1.4 Forschungsstellen

Forschungsstelle 1:

Univ.-Prof. Dr. med. Knut Kleesik
Dr. rer. nat. Jens Dreier
Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen
Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin
Postfach 10 03 61
32545 Bad Oeynhausen

Das Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin unter Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. Knut Kleesik gliedert sich in die drei großen Bereiche Laboratoriumsmedizin, Transfusionsmedizin und in eine weitere wesentliche Zielsetzung des Universitätsinstituts, die Forschung und Lehre. Außerdem ist das Institut Referenzinstitut der Bundesärztekammer für die Durchführung von Ringversuchen zur Qualitätskontrolle in der Laboratoriumsmedizin. Das Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrums Nordrhein-Westfalen, Universitätsklinik der Ruhr-Universität Bochum, umfaßt im Rahmen der Krankenversorgung die gesamte laboratoriumsmedizinische Diagnostik. Hierzu gehören Klinische Chemie, Infektionserregerserologie, medizinische Mikrobiologie, Endokrinologie, Immunhämatologie, molekularbiologischer Nachweis von Gendefekten und transfusionsmedizinisch relevanter Infektionserreger. Im angeschlossenen zentralen Blutspendedienst werden pro Jahr ca. 40.000 Blutprodukte hergestellt. Als pharmazeutisches Unternehmen unterliegt das Institut strengen Auflagen, was sich vor allem auch in der sorgfältigen Entwicklung eigener PCR-Testsysteme niederschlägt. Bei der Methodenentwicklung und Einführung von Nukleinsäure-Amplifikationstests (NAT) für transfusionsrelevante Viren war unser Institut Vorreiter in den 80er Jahren. Eine Vielzahl von eigenen PCR-Methoden wurden in der Zwischenzeit von uns entwickelt, evaluiert und vom Paul-Ehrlich-Institut, Langen genehmigt.

Insgesamt werden pro Jahr mehr als 5,5 Mio. Analysenergebnisse auf 500.000 Laborbefunden mitgeteilt und über 500 verschiedenen Untersuchungsmethoden angeboten. Insgesamt stehen im Labor dafür acht Ärztinnen und Ärzte, darunter vier Fachärzte, und sieben Naturwissenschaftler zur Verfügung. Die Durchführung der Analysen wird dabei von 52 qualifizierten und zuverlässigen Medizinisch-Technischen Assistentinnen übernommen. 4 Sekretärinnen

Im Universitätsinstitut haben Forschung und Methodenentwicklung einen hohen Stellenwert. Die wissenschaftlichen Arbeiten zielen dabei auf die Biochemie des Bindegewebs- und Knorpelstoffwechsels, das Gerinnungshemmprotein TFPI, die Ursachen von Thrombosen und Wiederverschlüssen von Koronargefäßen sowie auf molekularbiologischen Methoden bei der seltenen Krankheit Pseudoxanthoma elasticum und zum Nachweis transfusionsrelevanter Mikroorganismen. Zahlreiche Diplom- und Doktorarbeiten zum Dr. rer. nat., vor allem aber Publikationen in renommierten internationalen biochemischen Zeitschriften, zeugen von der besonderen wissenschaftlichen Leistungsfähigkeit des Instituts.

Das molekularbiologische Labor des Institutes für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin des Herz- und Diabeteszentrums NRW ist mit den wesentlichen Apparaten ausgestattet, die für molekularbiologische Arbeiten erforderlich sind. Zellphysiologische Arbeiten sind in etablierten separaten Zellkulturlaboren bzw. im mikrobiologischen Labor möglich. Das molekulargenetische Labor besitzt die Erlaubnis zum Betrieb einer gentechnischen Anlage der Sicherheitsstufe S1. Das Institut verfügt über Laboratorien der Sicherheitsstufe 2 und 3 (nach BioStoffV).

Für das geplante Forschungsvorhaben zum Nachweis der Virus-Transmission über RLT-Anlagen stehen im Institut alle notwendigen Voraussetzungen zur Verfügung, um eine mikrobiologische und molekulargenetische Diagnostik zu etablieren. Dabei besteht eine langjährige Erfahrung bei der Entwicklung und Durchführung molekulargenetischer Testsystemen. Eine Reihe von PCR-Methoden für Viren (Phagen, humanpathogene Viren), die für das Projekt benötigt werden, liegen bereits vor. Im Bereich der medizinischen Mikrobiologie und Virologie werden molekularbiologische Methoden und Techniken in der klinischen Infektionserregerdiagnostik routinemäßig eingesetzt. Im Institut für Laboratoriums- und Transfusionsmedizin wird eine Vielzahl humanpathogener Viren mit molekulargenetischen Methoden routinemäßig diagnostiziert. Zum Pilotunternehmen Biotec GmbH und zur Forschungsstelle 2, der Hochschule OWL, Lemgo, Life Science Technologies, bestehen langjährige Beziehungen im Bereich der Diagnostik von Mikroorganismen. Vor allem die räumliche Nähe der Forschungsstellen und des Pilotunternehmens in der Region Ostwestfalen-Lippe ermöglicht einen schnellen Austausch von Informationen und Probenmaterialien.

Kooperierende Forschungsstelle :

Prof. Dr. rer. nat. Barbara Becker

Hochschule OWL (vorm. Fachhochschule Lippe & Höxter)

Life Science Technologies, Labor Mikrobiologie

Liebigstr. 87, 32657 Lemgo

Tel. 05261- 702 324, Fax 05261-702 404, Email: barbara.becker@fh-luh.de

Die Kompetenz der Forschungsstelle ist begründet in folgenden Aspekten. Frau Prof. Dr. Becker ist Dipl.-Ing. Lebensmitteltechnologie, Dipl.-Biologin, promovierte 1991 mit einem virologischen Thema an der Universität Göttingen und ist seit 2002 Professorin für das Fach Mikrobiologie an der Hochschule OWL in Lemgo. Seit 1995 arbeitet die Antragstellerin an der Thematik „Virusübertragung durch Lebensmittel“ und präsentierte die Ergebnisse ihrer Forschung auf nationalen und internationalen Kongressen und Workshops. Im Rahmen von zwei Forschungsaufenthalten (1995 und 2003) im Labor von Prof. D. O. Cliver (weltweit anerkannter Experte für „foodborne viruses“), University of California, Davis, USA, beschäftigte sich die Antragstellerin mit dem molekularbiologischen Nachweis von Hepatitis A-Virus in Lebensmitteln sowie mit Zellkulturtechniken zum Nachweis von FCV. 2003 initiierte sie die „Arbeitsgruppe Lebensmittelassoziierte Viren“ (ALV), die sich in regelmäßig stattfindenden Fachgesprächen eingehend u. a. mit dem Nachweis von Viren in Lebensmitteln und der Norovirus-Problematik befaßt. Diese Arbeitsgruppe hat im April 2004 einen Ringversuch „Nachweis von Noroviren in Tupferproben – Ergebnisse eines Ringversuchs zur Methodenentwicklung“ und im März 2005 einen Workshop „Nachweis von Noroviren in Lebensmitteln / Umgebungsproben“ durchgeführt. Frau Prof. Dr. Becker obliegt die Leitung der Projektgruppe „Viren“ im DIN (Arbeitsausschuß „Mikrobiologische Lebensmitteluntersuchung einschließlich Schnellmethoden“), sie ist Mitglied der deutschen Delegation des CEN (CEN/TC 275/WG 6 - Food Analysis - horizontal methods, microbial contamination - TAG 4 – Detection of viruses in food) sowie der LMBG-Unterarbeitsgruppe „Nachweis von Viren in Lebensmitteln“. Die Antragstellerin referierte auf zahlreichen Tagungen, Symposien und Workshops zum Thema und veröffentlichte Ergebnisse zur Epidemiologie und Inaktivierung. Studien zur Überdauerung von Viren in Lebensmitteln wurden mit Poliovirus als Modell von der Antragstellerin veröffentlicht.

1.5 Projektlaufzeit

Dauer:	24 Monate
Arbeitsbeginn:	01.02.2007
Arbeitsende:	31.01.2009

1.6 Fördersumme

Förderbetrag der Stiftung: € 160.382,-

1.7 Angaben über Pilotunternehmen

Biotec GmbH

Elbrachsweg 76, 33332 Gütersloh

Die Firma Biotec GmbH (HRB-Nr. 3829, Amtsgericht Gütersloh), gegründet 1991, wird als Pilotunternehmen zusammen mit den Forschungsstellen die Entwicklung eines Viren-Modellsystems und Testung der Verbreitung in RLT-Anlagen prüfen.

Die Firma Biotec GmbH ist ein Hygieneinstitut mit Sitz in Gütersloh und Zweigstelle in Mittweida bei Dresden. Das Unternehmen beschäftigt 15 Mitarbeiter mit einem hohen Anteil von Akademikern (Dipl. Ing. Chemie und Dipl. Biologen). Das Labor ist zugelassen nach dem Infektionsschutzgesetz und beschäftigt sich neben der Mikrobiologie auch mit toxikologischen und umweltrelevanten Fragestellungen. Ein weiteres Arbeitsgebiet ist die Krankenhaushygiene nach DIN1946, Teil 4. In diesem Bereich erfolgt die Abnahme und Überprüfung von OP-Einheiten, sowie die Abnahme von Neubauten nach Krankenhausbauverordnung.

Das mittelständische Unternehmen beschäftigt sich seit über 10 Jahren mit der Hygiene von RLT-Anlagen (s. Referenzliste). Das Unternehmen ist seit nunmehr 4 Jahren VDI-Institut (Verband Deutscher Ingenieure) mit der Aufgabe, die VDI-Richtlinie 6022 publik zu machen. Hierzu werden in regelmäßigen Abständen bundesweite Schulungen angeboten. Die Firma Biotec GmbH ist weiterhin im Richtlinienausschuss des VDI Düsseldorf vertreten.

1.8 Konsortium

- **Biotec GmbH (Pilotunternehmen, s. 1.7)**
Elbrachsweg 76, 33332 Gütersloh
- **BÄ·RO GmbH & Co. KG**
Wolfstall 54 –56, 42799 Leichlingen

Das Unternehmen BÄ·RO GmbH Co. KG wurde 1963 in Leichlingen gegründet und beschäftigt an seinen 6 nationalen und 42 internationalen Standorten ca. 400 Mitarbeiter. Als Pionier beschäftigt sich Heinz Bähren mit der ersten warenspezifischen Beleuchtung und entwickelt einen Preßglasstrahler, der eine äußerst geringe Wärmestrahlung hat und so zunächst in Fleischereien - zum Schutz der Frischwaren - eingesetzt wird. BÄ·RO hat diverse patentierte Entwicklungen. Die langjährigen Erfahrungen im Bereich der Lebensmittel-Frische-Beleuchtung werden 1978 auf die neue Niedervolt-Halogentechnik übertragen. BÄ·RO inszeniert geschlossene Lichtkonzepte und wird zum kompetenten Ansprechpartner großer Handelsketten. 1992 wird das BÄ·RO Forschungs- und Entwicklungszentrum eröffnet und es beginnt die Entwicklung der BÄ·RO UV-C-Entkeimungstechnik. Entkeimung mittels UV-C Strahlung ist seit Jahrzehnten eine bewährte Technik. Für die Lagerung von frischen Lebensmitteln wird die Luftentkeimung mit UV-C-Strahlung in einer gekapselten Bestrahlungskammer eingesetzt. Das BÄ·RO Luftentkeimungsgerät erhielt vom TÜV Rheinland das Siegel für "Geprüfte Sicherheit".

- **Sartorius AG**
Weender Landstraße 94-108, 37075 Göttingen

Der Sartorius Konzern ist ein international führender Labor- und Prozesstechnologie-Anbieter mit den Segmenten Biotechnologie und Mechatronik. Der Technologiekonzern erzielte im Jahr 2004 einen Umsatz von 467,6 Millionen Euro. Das 1870 gegründete Göttinger Unternehmen beschäftigt zurzeit rund 3.750 Mitarbeiter. Das Segment Biotechnologie umfaßt Filtrations- und Separationsprodukte, Bioreaktoren sowie Proteomics. Im Segment Mechatronik werden insbesondere Geräte und Systeme der Wäge-, Meß- und Automationstechnik für Labor- und Industrieanwendungen sowie Gleitlager hergestellt.

Die wichtigsten Kunden von Sartorius stammen aus der pharmazeutischen, chemischen sowie der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie und aus zahlreichen Forschungs- und Bildungseinrichtungen des öffentlichen Sektors. Sartorius verfügt in Europa, Asien und

Amerika über eigene Produktionsstätten sowie über Vertriebsniederlassungen und örtliche Handelsvertretungen in mehr als 110 Ländern.

Im Bereich der Luftkeimuntersuchung und der Luftprobennahme verfügt das Unternehmen über langjährige Erfahrung. Es werden verschiedene Luftsammler (z.B. MD8 Airscan, AirPort MD8) und spezielle Gelatinemembranfilter für Nachweis von Viren, Bakterien und Pilzen angeboten. Dabei liegen im Bereich des Nachweises von Virusaerosolen mit dem Gelatinemembranfilter-System verschiedene Studien vor.

- **Zentrum für Ultrastrukturelle Diagnostik, IIT GmbH**
Universitätsstr. 25, 33615 Bielefeld

Das in der IIT GmbH als Profitcenter angesiedelte Zentrum für Ultrastrukturelle Diagnostik vermarktet das Know-how, das durch die langjährige Tätigkeit im Bereich Botanic, durch die Durchführung zahlreicher Anatomiestudien an Pflanzen erworben wurde. Gründer des ZUD sind Dr. Dietrich Bäumer, Dr. Bernwart Laube und Dr. Uwe Kahmann. Das Zentrum für ultrastrukturelle Diagnostik bietet in Zusammenarbeit mit verschiedenen universitären Forschungseinrichtungen ein Dienstleistungsspektrum im Bereich der Elektronenmikroskopie auf dem neuesten Stand der Technik an. Zum Arbeitsbereich des ZUD gehört beispielsweise die Transmissionselektronenmikroskopie, die unter anderem in der Virusdiagnostik eingesetzt wird.

Einen weiteren Schwerpunkt stellt das interdisziplinär entwickelte Verfahren der Immunocytochemie dar. Die Methode erlaubt den Nachweis bestimmter Moleküle, beispielsweise Proteine, in Zellen. Neben dem qualitativen Nachweis sind auch Aussagen zur Quantität möglich. So ist im Bereich Gentechnologie das Aufzeigen gentechnischer Veränderungen machbar. In der Biotechnologie wird die Methode bereits teilweise zur Überwachung und Erkennung von Viruspartikeln bei Produktionsprozessen eingesetzt, die sonst schwer nachweisbar sind.

Die Rasterelektronenmikroskopie und Oberflächenstrukturanalyse, ein weiterer Arbeitsbereich des ZUD, ist ebenfalls in vielfacher Hinsicht für die Qualitätskontrolle geeignet. Sie gestattet zum Beispiel die Produktionsüberwachung von Schrauben, Blechen oder Chips.

- **CARO Consulting & Management GmbH**

Kurfürsterstraße 94, 48599 Gronau (Westf.)

Die Firma CARO Consulting & Management GmbH beschäftigt sich u. a. mit der Umsetzung von Luftentkeimungstechnologien im medizinischen Bereich, sowie in der Nahrungsmittelindustrie. Projekte im Bereich der RL-Technik werden von der Kontaktaufnahme beim Kunden bis zur technischen Abnahme von diesem Unternehmen begleitet. Insbesondere Firmen aus dem Bereich UVC-Technologie werden entsprechend unterstützt.

- **Westaflex Werk GmbH**

Thaddäusstraße 5, 33334 Gütersloh

Das Unternehmen ist u. a. auf Automobilteile, flexible Luftkanäle, flexible Alurohre, Schallschutzelemente und Wetterschutzgitter spezialisiert. Ebenso sind sie fachlich versiert, wenn es um Edelstahlrohr, quadratisches Rohr, Rauchfang, Abgasleitung, Abgastechnik, Flexrohr, Luftkanal (flexibel), Schalldämpfer für die Klimaanlage, Schallschutztechnik, Schornstein, Wellrohr, EnEV und Wohnungslüftung geht.

- **Arbeitsgruppe für Umwelttoxikologie (AfU) e.V.**

Am Böckenkampshof 2b, 33619 Bielefeld

Die Arbeitsgruppe für Umwelttoxikologie ist ein eingetragener Verein, der sich seit über 10 Jahren mit umwelttoxikologischen Problemen auseinandersetzt. Die Arbeitsgruppe informiert zu Problemen von Wasser,-Boden und Luftkontaminationen und bietet verschiedene Dienstleistungen im Bereich „Analytik“ an.

2. Einleitung

2.1 Viren

Die Existenz von Viren als Krankheitsauslöser ist der Menschheit lange verborgen geblieben. Ursprünglich wurden als Krankheitsursachen Gifte angenommen, woher sich der Name „Virus“ (lat. „Gift“ oder „Schleim“) angeleitet hat. Die Sichtbarmachung der Viren wurde aufgrund ihrer geringen Größe mit Durchmessern von 16 nm bei Circoviren bis hin zu 300 nm bei Pockenviren erst nach der Entwicklung des Elektronenmikroskops von Helmut und Ernst Ruska im Jahre 1940 möglich. Durch elektronenmikroskopische Untersuchung konnte erstmals die Struktur des Tabakmosaikvirus geklärt werden. Erschwerend kam bei der Untersuchung von Viren hinzu, dass sie sich nicht wie Bakterien in künstlichen Nährmedien vermehren ließen (Modrow et al., 2003).

Viren können als infektiöse Einheiten beschrieben werden, welche sich nicht selbst vermehren können, sondern dazu die Wirtszelle benötigen. Die Viruspartikel werden auch Virionen genannt, sie bestehen aus Proteinen und sind bei einigen Virustypen von einer Lipidmembran umgeben. Sie entfalten erst in der Wirtszelle ihre Genomaktivität und bringen die Zelle dazu, Viruspartikel herzustellen. Neben Strukturinformationen besitzen Viren Gene für bestimmte regulatorisch aktive Proteine (z.B. Transaktivatoren) und Enzyme wie Proteasen und Polymerasen (Modrow et al., 2003). Bemerkenswert erscheint die Tatsache, dass einige Viren wie das Hühnerpockenvirus Gene für Photolyasen besitzen, welche die Virennukleinsäure nach Sonnenlichtexposition in der Wirtszelle von UV-Schäden reparieren können (Srinivasan et al., 2000).

Das Erscheinungsbild von Virionen ist sehr vielfältig. Neben kleinen kompakten Viren mit ikosaedrischer Form gibt es komplex aufgebaute Viren mit Kopf-Schwanz-Strukturen oder filamentösem Aufbau (Klaus et al., 1992).

2.2 Übertragung von Viren auf dem Luftweg

Damit Viren auf dem Luftweg übertragen werden können, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein. Hinsichtlich der Stabilität und Infektiosität müssen solche Viren außerhalb ihres Wirtsorganismus stabil und relativ unempfindlich gegenüber Austrocknung sein. Zahlreiche humanpathogene Viren sind aerogen durch Aerosole und / oder Staub (Tröpfcheninfektion und Schmierinfektion) übertragbar, wobei die Übertragung über Schleimhäute von Mund,

Nase und Rachen erfolgt (Porstmann et al., 1996; Modrow et al., 2003). Diese Viren werden auf horizontalem Weg übertragen. Von Bedeutung ist vor allem die homologe Weitergabe von Mensch zu Mensch, diese kann zu Epidemien, Pandemien oder Endemien in der Bevölkerung führen. Der Ausbruch einer Infektion durch die Übertragung von Viren auf dem Luftweg hängt neben der Tenazität, d. h. der Überlebensfähigkeit der Viren in der Umwelt, und deren Eintrittspforten in den menschlichen Körper unter anderem von der Konzentration der infektiösen Partikel in der Luft ab. Aerogene Infektionen treten häufig bei direktem Kontakt auf, wobei virushaltige Aerosole beim Niesen oder Husten von Personen mit Infektionskrankheiten der Atemwege abgegeben werden, während indirekte Übertragung von Viren neben der Tröpfcheninfektion noch die Verbreitung durch kontaminierte Hände oder Oberflächen über Schmier- und Schmutzinfektionen beinhaltet (Modrow *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2005).

Infektiöse Partikel in Virus-Aerosolen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 3 μm und können so die Schutzmechanismen des oberen Respirationstraktes, wie z.B. das Flimmerepithel, umgehen und Infektionen hervorrufen. Da die Immunsensitivität von Personen variiert, kann keine bestimmte Mindestkonzentration an Viren in einem Tröpfchen in der Luft festgelegt werden, nach dessen Inspiration zwangsläufig eine Infektion folgt (Brickner *et al.*, 2003).

Es konnte gezeigt werden, dass Tröpfchen eines Affen-Rotaviren-Aerosols, von denen 87 % einen Durchmesser von ein bis 3,3 μm besitzen, in der Luft über einen Zeitraum von 24 Stunden nachweisbar sind und noch Infektiosität besitzen (Ijaz *et al.*, 1987). Aus diesem Grund kann von Aerosolen humanpathogener Viren ebenfalls ein längerfristiges Infektionsrisiko resultieren. Wenn beispielsweise eine mit Influenzaviren infizierte Person niest, entstehen ebenfalls infektiöse Tröpfchen verschiedener Größen. Von solchen Tröpfchen geht sehr lange ein Infektionsrisiko aus, da sie von anderen Personen eingeatmet oder in Gebäuden in den Ansaugstrom einer RLT-Anlage gelangen und sich so raumübergreifend in der Atemluft verteilen könnten.

Zu den humanpathogenen Viren, die über die Luft übertragen werden könnten, zählen unter anderem Adenoviren, z.B. als Erreger von Bronchitis oder Gastroenteritis, Coronaviren wie z.B. der Erreger des schweren akuten respiratorischen Syndroms (SARS), Picornaviren wie Polio-, Echo- und Coxsackieviren, Influenzaviren, Parvoviren wie z.B. das Parvovirus B19, Caliciviren wie z.B. Noroviren als Erreger von Gastroenteritis und Paramyxoviren wie das Mumps-Virus, Parainfluenzaviren und das Respiratory-Syncytial-Virus (Modrow *et al.*, 2003; BERPohl, 2005).

Ein Beispiel, in dem Viren auf dem Luftweg übertragen werden, ist die Ausbreitung von Gastroenteritis durch Noroviren. Diese wurden 1972 elektronenmikroskopisch entdeckt

(Kapikian *et al.*, 1972). Die Ausbreitung von Noroviren über die Luft geschieht z.B. durch Bildung norovirenhaltiger Aerosole nach Erbrechen einer Person oder von deren Stuhl (Thornton *et al.*, 2004). Zudem kann die Ausscheidung von Noroviren über den Stuhl auch einige Tage nach Abklingen der Symptome noch anhalten, während das Erscheinungsbild des Stuhls kein zuverlässiger Indikator für das Vorhandensein von Noroviren ist (Goller *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass in einem Restaurant durch Erbrechen einer infizierten Person entstandene Norovirenaerosole über die Deckenventilation verbreitet wurden, so dass mit zunehmender Entfernung vom Infektionsherd kontinuierlich abnehmende Infektionsraten anderer Personen beobachtet wurden, jedoch traten nachfolgend Infektionen noch mehrere Tische entfernt mit einer Häufigkeit von über 40 % auf (Marks *et al.*, 2000). Somit ist das aerogene Infektionsrisiko mit Noroviren als nicht unerheblich einzuschätzen (MMWR, 2001; Robert Koch Institut, 2004).

Coronaviren werden durch Tröpfcheninfektion auf dem Luftweg übertragen. Die meisten Coronaviren verursachen Atemwegs- oder Darminfektionen in einem bestimmten Wirt, indem sich derartige Viren ausschließlich in den Epithelzellen des Respirationstraktes oder des Darmes replizieren. Von den humanpathogenen Coronaviren wie dem humanen Coronavirus 229E und OC43 ist bekannt, dass sie in der Regel die Flimmerepithelzellen des oberen Respirationstraktes infizieren. Bis zu 90 % der Erwachsenen besitzen Antikörper gegen beide Viren, was ein Hinweis auf ihre weite Verbreitung darstellt. Die genannten Coronaviren sind neben den Rhinoviren für die meisten leichteren respiratorischen Infekte verantwortlich zu machen, es wird davon ausgegangen, dass Coronaviren an 20 bis 30 % aller Erkältungskrankheiten des Menschen beteiligt sind. Auch bei Patienten mit Multipler Sklerose wurden die humanen Coronaviren 229E und / oder OC43 in den Zisternen des rauen endoplasmatischen Reticulums von Nervenzellen nachgewiesen (Modrow *et al.*, 2003; Stock, 2004).

Zu weiteren Viren, die sich per Tröpfcheninfektion über die Luft ausbreiten können, zählen die Inflenzaviren aus der Familie der *Orthomyxoviridae*. Hämagglutinin und Neuraminidase sind die Hauptantigenkomponenten der Inflenzaviren und bilden die Basis ihrer Subtypenklassifikation. Es gibt 16 Hämagglutinin- (H1 bis H16) und 9 Neuraminidasetypen (N1 bis N9). Genetische Veränderungen und Mutationen in diesen Proteinen bewirken, dass Viren plötzlich neue Wirte befallen können. Ein Beispiel ist der Erreger der Vogelgrippe H5N1. Um Infektionsrisiken durch Inflenzaviren zu begegnen, sollte der Übertragung über die Luft vorgebeugt werden (Wong & Yuen, 2006).

Auch das Parvovirus B19 wird auf dem Luftweg über ausgeatmete Tröpfchen verbreitet. Es ist in der Lage, neben leichteren erkältungsähnlichen Symptomen auch schwerwiegendere Krankheiten zu verursachen, so dass auch hier vorbeugende Maßnahmen der homologen Übertragung über die Luft getroffen werden sollten. Eine Verbindung von Parvovirus B19

Infektionen mit Encephalopathie, Epilepsie, Meningitis, Myocarditis und autoimmuner Hepatitis ist wahrscheinlich (Servey *et al.*, 2007).

2.3 Das Sick Building Syndrome (SBS)

In modernen Bürogebäuden kommt es häufiger vor, dass Angestellte über arbeitsplatzbezogene Beschwerden oder Symptomkombinationen klagen. Dazu zählen beispielsweise Symptome wie Kopfschmerzen, Müdigkeit, Erkältungen, Konzentrationsschwierigkeiten, Reizungen der Haut, Augen, Nase und des Halses, Atembeschwerden und Muskel-, Gelenk- und Rückenschmerzen (Bourbeau *et al.*, 1996; Menzies *et al.*, 2003). Neben Bakterien könnten Viren für bestimmte Beschwerden verantwortlich sein, wenn man beachtet, dass bei den meisten Erkrankungen des Respirationstraktes in den Wintermonaten meist eine Virusbeteiligung zu beobachten ist (Bermppohl, 2005). Allerdings ist eine virale Beteiligung bei Ausbildung von arbeitsplatzbezogenen Beschwerden bisher nicht untersucht worden. Eine Reihe von Atemwegsbeschwerden wie Rhinitis, arbeitsplatzbezogenes Asthma oder Bronchitis, deren eindeutigstes Symptom ein persistierender Husten ist, können durch eine Vielzahl von Umweltreizen am Arbeitsplatz wie bakterielle Toxine, Reizstoffe oder andere Allergene hervorgerufen werden, wobei die Übertragung dieser Substanzen neben dem direkten Weg durch die Luft auch über RLT-Anlagen verbreitet werden können (Tarlo, 2006). Über solche arbeitsplatzbezogenen Symptome, auch als „*Sick Building Syndrome*“ (SBS) bekannt, sind eine Vielzahl von Studien erschienen (z.B.: Turiel *et al.*, 1983; Finnegan *et al.*, 1984; Robertson *et al.*, 1985; Mendell & Smith, 1990; Ooi *et al.*, 1998; Menzies *et al.*, 1999, 2003), welche die Ursachen des SBS allgemein und in Korrelation mit dem Vorhandensein von RLT-Anlagen untersuchen. Neuere Studien zeigen, dass das Auftreten von SBS-Symptomen und eine verminderte Arbeitsleistung und Produktivität der Angestellten in direktem Zusammenhang stehen könnten, wodurch die Optimierung der RLT-Anlagen und eine Verminderung des SBS auch für Arbeitgeber von Interesse sein sollten (Wyon, 2004; Niemelä *et al.*, 2006).

Im Allgemeinen konnte ein häufigeres Auftreten von SBS-Symptomen in künstlich klimatisierten Gebäuden beobachtet werden (Finnegan *et al.*, 1984; Robertson *et al.*, 1988; Mendell & Smith, 1990; Teeuw *et al.*, 1994; Bourbeau *et al.*, 1996; Mendell *et al.*, 1996). Dabei ist das Auftreten von SBS-Symptomen nicht allein von Umweltfaktoren wie der Temperatur, relativen Luftfeuchtigkeit, Kohlenmonoxid, Ozon oder der eingestellten Luftgeschwindigkeit der RLT-Anlage abhängig (Turiel *et al.*, 1983; Robertson *et al.*, 1988).

Vielmehr deuten Untersuchungen im Zusammenhang mit SBS-Symptomen auf ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Umweltfaktoren mit innenräumlicher Luftverschmutzung hin (Ooi *et al.*, 1998; Wyon, 2004). Der Einbau einer in Bauweise und Funktion optimierten modernen RLT-Anlage konnte die Häufigkeit arbeitsplatzbezogener Symptome vermindern (Bourbeau *et al.*, 1996). Infektionen des unteren Respirationstraktes und der Schleimhäute konnten eindeutig mit einem erhöhten Feuchtigkeitsniveau der Atemluft und einer vernachlässigten Reinigung der RLT-Komponenten in Korrelation gebracht werden (Mendell *et al.*, 2006). Erhöhte Präsenz von gram-negativen Bakterien wie Legionellen, Pseudomonaden und *Helicobacter pylori* sowie Bestandteilen deren äußerer Zellmembran, den Endotoxinen, konnte eindeutig in symptombelasteten Gebäuden beobachtet werden (Teeuw *et al.*, 1994).

Ob Viren an der Ausbildung von Symptomen des SBS mit beteiligt sind, ist bisher noch nicht untersucht worden. Durch den Einsatz von UVC-Bestrahlung in einer RLT-Anlage konnte das Wohlbefinden von Menschen im Zuluftbereich messbar verbessert werden (Menzies *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde die inaktivierende Wirkung der Bestrahlung auf Viren jedoch nicht untersucht. Aufgrund der Häufigkeit viraler Erkrankungen und der Tatsache, dass einige humanpathogene Viren wie Adenoviren, Coronaviren, Coxsackieviren, Influenzaviren, Rhinoviren, Rotaviren, Sindbisviren als Vertreter der Togaviren wie das Rötelnvirus, Vacciniavirus (Impfvirus gegen das Pockenvirus) und Varicella Zoster Viren experimentell auch in der Luft im Aerosol stabil und infektiös bleiben (Jensen, 1964; Ijaz *et al.*, 1987; Brickner *et al.*, 2003; Myatt *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2006) und sich durch Kollisionsvernebelung und Ventilatoren oder Pumpen über geschlossene Systeme ohne signifikanten Infektiositätsverlust verbreiten lassen (Jensen, 1964; Ijaz *et al.*, 1987; Brickner *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2006), kann eine Mitbeteiligung an SBS-Symptomen als wahrscheinlich angenommen werden.

2.4 Modellsysteme humanpathogener Viren

2.4.1 Bakteriophagen

Um die Transmission von Viren über RLT-Anlagen zu untersuchen, ist der Einsatz human- und tierpathogener Viren ohne aufwändigere Schutzmaßnahmen aufgrund der unkontrollierbaren Virenausbreitung problematisch. In vorausgegangenen Studien zur Virus-Inaktivierung durch UV-Strahlung oder anderen Desinfektionsmaßnahmen wurden aus diesem Grund Bakteriophagen als Modellsysteme humanpathogener Viren eingesetzt (Meng

& Gerba, 1996; Nuanualsuwan *et al.*, 2002; Shin & Sobsey, 2003; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Griffiths *et al.*, 2005; Hijnen *et al.*, 2005; Templeton *et al.*, 2005; Tseng & Li, 2005).

Bakteriophagen sind Viren, die sich in Bakterien als Wirtszelle vermehren. Da sie für andere Lebewesen ungefährlich sind, wurden sie für diese Arbeit als Modellsysteme humanpathogener Viren ausgewählt. Zudem bieten sie den Vorteil, dass Ihre Infektiosität mittels Bakterien bestimmt werden kann, welche einfacher als eukaryotische Zellsysteme zu handhabenden sind. In dieser Arbeit wurden hauptsächlich die *E. coli* Phagen Phi X174 und MS2 betrachtet.

Der Phage MS2 aus der Familie der *Leviviridae* ist mit seinem einzelsträngigen linearen RNA-Genom stellvertretend für Viren der Familie der *Picornaviridae* wie Enteroviren (Poliovirus, Coxsackievirus), Rhinoviren (Schnupfenvirus) und Hepatoviren (Hepatitis-A-Virus), sowie als Modellsystem für Viren aus der Familie der *Caliciviridae* wie das Norovirus (Modrow *et al.*, 2003) in vorangegangenen Studien verwendet worden (Meng & Gerba, 1996; Nuanualsuwan *et al.*, 2002; Shin & Sobsey, 2003; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Hijnen *et al.*, 2005; Griffiths *et al.*, 2005; Templeton *et al.*, 2005; Tseng & Li, 2005). Außerdem wird MS2 wie Coronaviren durch ein einzelsträngiges RNA-Genom charakterisiert. Coronaviren sind mit einer Lipidmembran umhüllt und insbesondere als Erreger von Atemwegs- und Darminfektionen bekannt, zu ihnen zählt auch das 2002 neu aufgetretene *Severe Acute Respiratory Syndrome* (SARS) Virus (Stock, 2004).

Zu den Viren mit einem einzelsträngigen ringförmigen DNA-Genom zählen z.B. die der Familie der *Parvoviridae* wie das Parvovirus B 19 als Erreger der Ringelröteln oder Viren der Familie der *Circoviridae* wie das humanpathogene TT-Virus, welches 1997 erstmals entdeckt wurde und vermutlich von Haustieren auf den Menschen übertragen wird. Eine Infektion mit dem TT-Virus verläuft jedoch symptomlos und stellt keine Gefahr dar (Modrow *et al.*, 2003). Stellvertretend für diese humanpathogenen Viren wurde der Phage Phi X174 aus der Familie der *Microviridae* ausgewählt (Nuanualsuwan *et al.*, 2002; Hijnen *et al.*, 2005; Tseng & Li, 2005). Viren aus der Familie der *Adenoviridae* wie humane Adenoviren, die für eine Vielzahl von Erkrankungen beim Menschen verantwortlich sind (z.B. Gastroenteritis, Bronchitis, Augenerkrankungen), besitzen zwar ein doppelsträngiges, lineares DNA-Genom, haben aber einen ähnlichen Capsiddurchmesser wie der Phagen Phi X174.

Phi X174 und MS2 weisen ein kleines und kompaktes Erscheinungsbild auf. Sie wurden als Modellsysteme ausgewählt, weil zu vermuten war, dass eine Transmission von ihren Lysaten in Aerosolform über RLT-Anlagen ihre Infektiosität bewahren könnte, zumal viele ihrer humanpathogenen Verwandten über die Luft übertragen werden. Zudem ist ihre Stabilität im Aerosol gezeigt worden (Tseng & Li, 2005).

Das Capsid des Phagen Phi X174 ist ikosaedrisch mit hervorstehenden Spikes geformt und hat einen Durchmesser von 25 nm (Abb. 2.1). Das Genom hat eine Länge von 5386 Nukleotiden, es codiert für insgesamt neun Gene für Capsidproteine und interne Proteine (Calendar, 1988). Nach einer Infektion einer Zelle mit Phi X174 werden nach einer Latenzzeit von 13 bis 16 Minuten etwa 200 Phagen pro Zelle freigesetzt. Dabei wird die Zelle lysiert. An der Rezeptorerkennung der Adsorption von Phi X174 an die Zielzelle sind Spikes und das Hauptcapsidprotein beteiligt, als Rezeptor dient ein Lipopolysaccharid. Die optimale Adsorption an die Zielzelle erfolgt bei einem pH von 6 bis 7,5 (Klaus *et al.*, 1992).

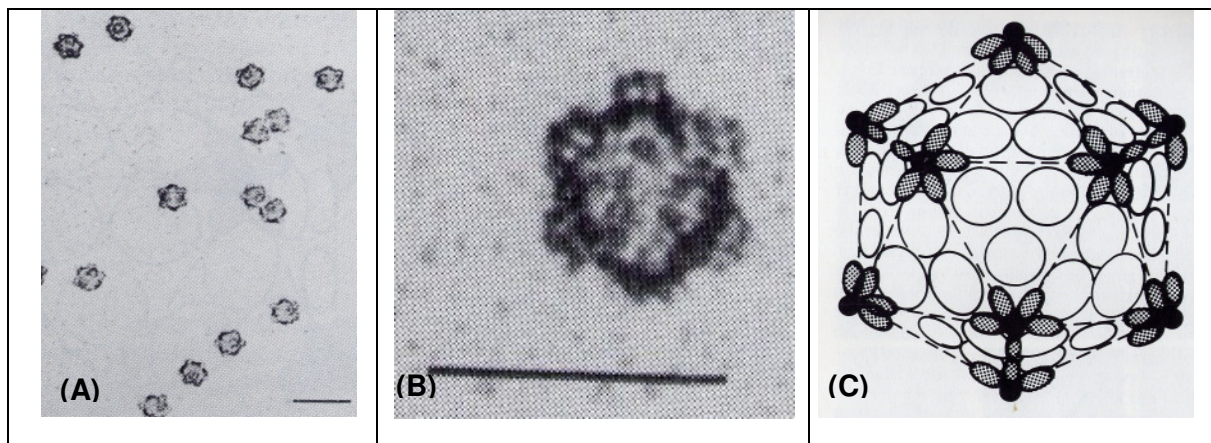


Abb. 2.1: Erscheinungsbild von Phi X174

(A): Mehrere Phagen, (B): Ein einzelner Phage im Detail mit zu erkennenden Spikes auf der Oberfläche; die Balken entsprechen jeweils 50 nm, (C): Schematischer Capsidaufbau mit den verschiedenen Proteinen (aus: Calendar, 1988).

Im Gegensatz zu Phi X174 infiziert MS2 seine Wirtszellen über F-Pili. Sein einzelsträngiges RNA-Genom besitzt 3569 Nukleotide und codiert für vier Proteine: Das Haupt-Hüllprotein, von dem 180 Moleküle die ikosahedrale Virushülle bilden, ein weiteres Hüllprotein zur Adsorption an der Wirtszelle, eine RNA-abhängige RNA-Polymerase zur Replikation des Virusgenoms und ein Protein zur Lyse der Wirtszelle (Knippers, 2006).

Neben Phi X174 und MS2 wurde in dieser Arbeit das Übertragungsverhalten der Phagen Lambda und M13 in die Untersuchung einbezogen.

Der Phage Lambda aus der Familie der *Siphoviridae* zählt zu den komplexer aufgebauten Viren mit einem doppelsträngigen linearen DNA-Genom. Er besitzt einen ikosaederförmigen Kopf mit einem Durchmesser von 54 nm und einen flexiblen Schwanz mit einer Länge von 150 nm (Abb. 2.2). Die Adsorption an der Zelloberfläche erfolgt durch Wechselwirkung des Proteins der Schwanzspitze mit einem Proteinteil in der Zellmembran. Dieses Zellmembranprotein gehört zur Maltose-Permease, welche einen Kanal durch die Zellmembran für die Aufnahme von Maltose und Maltodextrine bildet. Lambda hat die

Fähigkeit, von bestimmten Wirtsfaktoren abhängig zwischen lytischem und lysogenem Infektionsweg zu wechseln. Solche Phagen werden temperente Phagen genannt (Klaus *et al.*, 1992; Watson *et al.*, 2004).

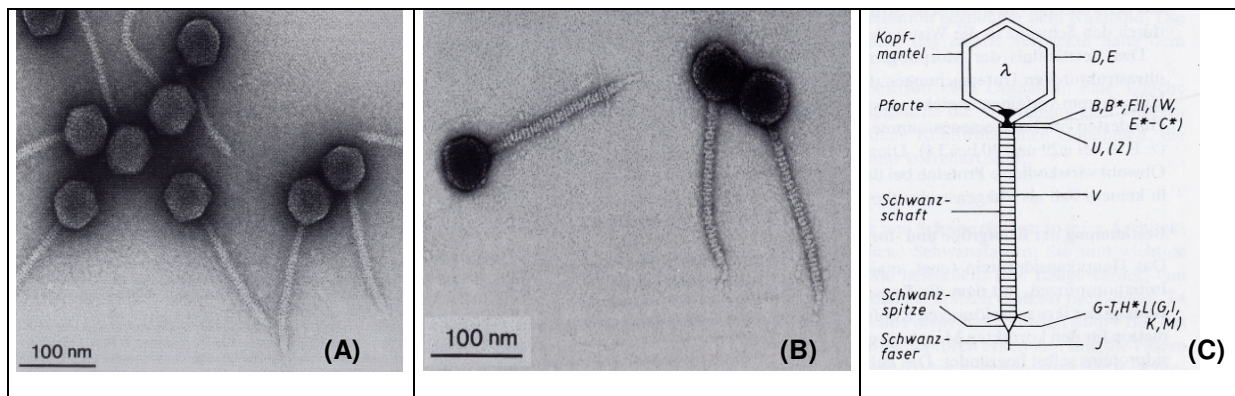


Abb. 2.2: Erscheinungsbild von Lambda

(A) und (B): elektronenmikroskopische Aufnahmen von Lambda-Phagen; (C): Schematische Zeichnung von Lambda mit seinen einzelnen Proteinanteilen (Legende nicht gezeigt); (aus: Klaus *et al.*, 1992).

M13 aus der Familie der *Inoviridae* zählt zu den filamentösen Phagen mit einem einzelsträngigen ringförmigen DNA-Genom. M13 hat einen Durchmesser von 7 nm und eine Länge von bis zu 2 μm . Die Infektion erfolgt wie bei MS2 F-Pilus-spezifisch (Abb. 2.3) (Birge, 2000). M13 wurde ebenso wie Lambda aufgrund seiner Struktur für die Übertragung durch RLТ-Anlagen ausgewählt, da unklar ist, ob komplexer aufgebaute Viren durch den Vernebelungsvorgang Schaden nehmen und dabei ihre Infektiosität einbüßen.

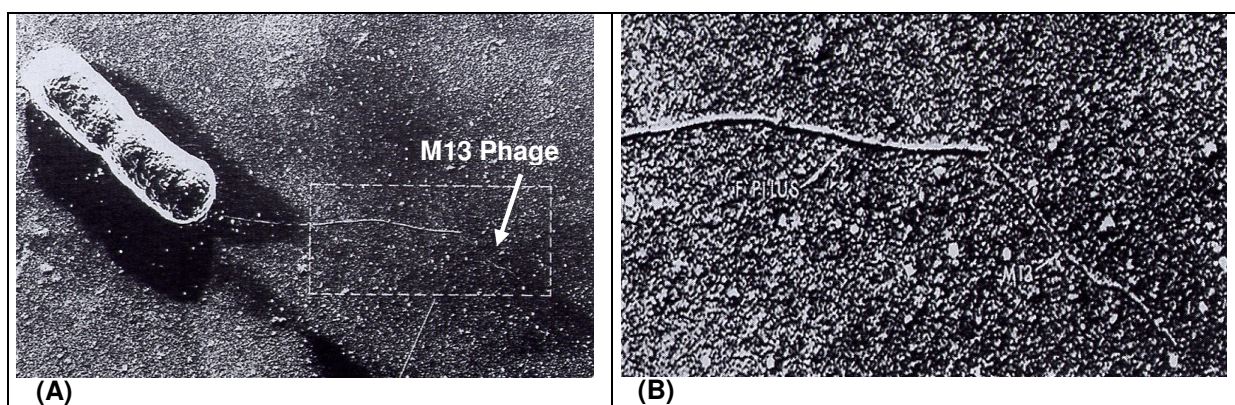


Abb. 2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von M 13

(A): M 13 an einem F-Pilus einer Wirtszelle, durch gelben Pfeil markiert; (B): Ausschnittsvergrößerung umrandeter Bereich aus (A) (aus: Birge, 2000).

Mit der hier getroffenen Auswahl an Bakteriophagen ist ein weites Spektrum analog bzw. ähnlich strukturierter humanpathogener Viren abgedeckt.

2.4.2 Feline Caliciviren als Modellsystem für humanpathogene Noroviren

Derzeit sind vor allem Noroviren im Fokus des öffentlichen Interesses. Diese zu der Familie der Caliciviren gehörende Virusgruppe ist weltweit verbreitet und für einen Großteil der nicht bakteriell bedingten Gastroenteritiden bei Kindern und Erwachsenen verantwortlich. Noroviren sind häufig Ursache von akuten Gastroenteritis-Ausbrüchen in Gemeinschaftseinrichtungen. Die Übertragung erfolgt fäkal-oral oder durch Aerosole, die z. B. während des Erbrechens entstehen. Obwohl auch kontaminierte Lebensmittel oder Trinkwasser Ausbrüche auslösen können, steht die Übertragung von Mensch zu Mensch ganz offensichtlich im Vordergrund. Die Kontagiösität ist sehr hoch, nur wenige Viruspartikel können schon zur Infektion führen. Erkrankte können nach Abklingen der akuten Symptome noch für längere Zeit das Virus über den Stuhl ausscheiden (Robert Koch Institut (2004)).

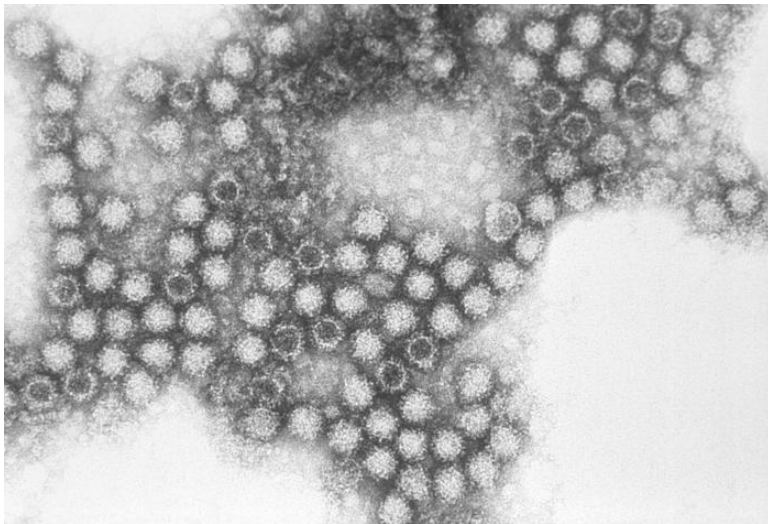


Abb. 2.3.1 Felines Calicivirus

Elektronenmikroskopische Aufnahme (Durchmesser der Viren 35 - 40nm)

In den letzten Jahren steigt die Zahl nachgewiesener Norovirusinfektionen, wobei die hohe Anzahl letaler Infektionen sowohl die Entwicklung neuer diagnostischer Methoden und effektive Hygiene- und Desinfektionsmaßnahmen erforderlich gemacht hat. Noroviren lassen sich jedoch nicht in Versuchstieren oder Zellkulturen anzüchten, so dass Wirksamkeitsprüfungen nicht am Erreger selber durchgeführt werden können. Stattdessen wird bisher das zur selben Familie gehörende feline Calicivirus (FCV) als Prüforganismus (Surrogatvirus) verwendet. Feline Caliciviren unterscheiden sich in ihrem Feinbau und in weiteren Besonderheiten von humanen Caliciviren. FCV gehören in der Gruppe der Caliciviren zur Familie der Vesiviren. Das FCV ist ein seit vielen Jahren bekannter Erreger von Erkrankungen des oberen Respirationstraktes bei der Katze. Das Erkrankungsbild der Infektion variiert sehr stark und ist von mehreren Faktoren abhängig: der Infektionsroute, der Infektionsdosis, der Virulenz des Stammes, dem Alter des Tieres und dem Status der

Immunabwehr. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich aerogen über virushaltige Sekrete des Nasen-/Rachenraums. Feline Caliciviren haben als unbehüllte Viren eine hohe Stabilität in der Umwelt und sind je nach Umweltbedingungen für mehrere Tage bis Wochen infektiös für andere Katzen.

Die Infektion mit dem feline Calicivirus kann in der akuten Form mit Nasen- und Augenausfluss, Niesen, Fieber, Konjunktivitis, Stomatitiden und, wenn auch selten, temporäre Lahmheiten infolge einer Arthritis einhergehen. Das Bild der chronischen FCV-Infektion ist hauptsächlich gekennzeichnet durch chronische Stomatitiden und Gingivitiden, die sich in der Praxis nicht selten als ein hartnäckiges klinisches Problem darstellen und schwierig zu therapieren sind.

2.5 Germizide Wirkung ultravioletter Strahlung

Die germizide Wirkung von ultravioletter Strahlung (UV-Strahlung) wird bereits seit über 100 Jahren zu Desinfektionszwecken genutzt (Urbach *et al.*, 1976). In Untersuchungen an einer großen Zahl von Organismen wurde bestätigt, dass der kurzwellige Anteil des Sonnenlichtes mit Wellenlängen von unter 313 nm zu etwa 80 % an der letalen und mutagenen Wirkung der UV-Strahlung beteiligt ist (Zölzer & Kiefer, 1989).

Die germizide Wirkung von UV-Strahlung basiert in erster Linie auf irreparablen Schäden der Nukleinsäuren. Bereits 1929 wurde entdeckt, dass die relative Effektivität verschiedener Wellenlängen des Abtötens von Bakterien mit dem Absorptionsspektrum der Nukleinsäure korreliert, jedoch blieben die chemischen Grundlagen der Effekte von UV-Strahlung auf Nukleinsäuren bis in die späten vierziger Jahre ungeklärt (Urbach *et al.*, 1976).

UV-Strahlung umfasst Wellenlängen von 400 nm bis 185 nm, wobei diese in drei verschiedene Wellenlängenbereiche unterteilt wird: UVA-Strahlung von 400 nm bis 320 nm, UVB-Strahlung von 320 nm bis 280 nm und UVC-Strahlung von 280 nm bis 185 nm (Stuart & Klages, 2000). Die UVC-Strahlung ist der energiereichste UV-Strahlungstyp. Auf der Erdoberfläche wird die UVC-Strahlung in natürlicher Weise vom atmosphärischen Sauerstoff und der Ozonschicht absorbiert, während die längerwelligen UVA- und UVB-Strahlen auf die Erdoberfläche gelangen können (Urbach *et al.*, 1976; Sinha & Häder, 2002). UVC-Strahlung übt die größten schädigenden Einflüsse auf Nukleinsäuren aus.

Zu den zwei Haupttypen der UV-induzierten mutagenen DNA-Schäden zählen zum einen Cyclobutan-Pyrimidin Dimere (CPDs) (Abb. 2.4) wie Thymin-Dimere und das seltener

auftretende Thymin-Cytosin-Dimer. Zum anderen können 6-4 Photoprodukte (6-4PPs) (Abb. 2.4) entstehen (Sinha & Häder, 2002).

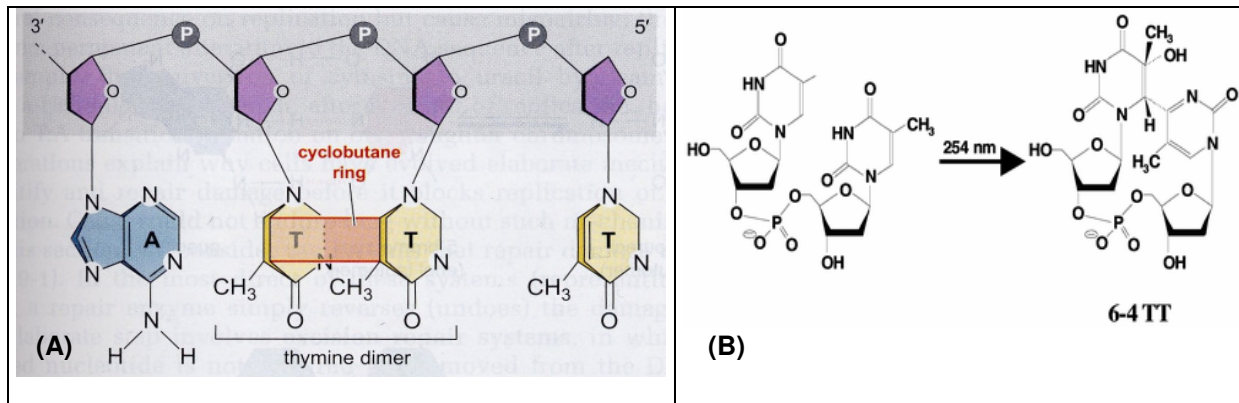


Abb. 2.4: UV-induzierte Nukleinsäureschäden

Darstellungen UV-induzierter Nukleinsäureschäden; **(A)**: Bildung eines Cyclobutanringes zwischen zwei benachbarten Thyminen und Entstehung eines Thymin-Dimeres (aus: Watson *et al.*, 2004); **(B)**: Bildung von 6-4 Photoprodukten zwischen zwei benachbarten Thyminen (aus: Sinha & Häder, 2002).

Diese DNA-Schäden führen zu einer Distorsion der DNA-Doppelhelix. Es konnte gezeigt werden, dass mit UVC bestrahlte, zirkuläre, doppelsträngige und kovalent geschlossene DNA-Moleküle in Agarosegelen veränderte Wanderungsmuster aufweisen, die mit den beschriebenen DNA-Schäden in Zusammenhang gebracht werden konnten (Boullard & Giacomoni, 1988). Außerdem werden durch CPDs DNA- bzw. RNA-Polymerasen inhibiert, wodurch fast jedes CPD die Expression am Ort seines Auftretens unterbricht und nur ein kleinerer Anteil an CPDs zu Mutationen führt (Sinha & Häder, 2002).

In einem Experiment wurde bestätigt, dass es bei UVC-Bestrahlung des Phagen M13 dosisabhängig ebenfalls zu ansteigender Formation von CPDs und 6-4PPs kommt, während an der Proteinhülle des Phagen keine Veränderung festgestellt werden kann. Außerdem können durch UVC-Strahlung entstandene freie Sauerstoffradikale zu oxidativem Schaden der DNA wie Oxidation von Guanin zu 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (oxoG) führen. Der oxidative Schaden an Nukleinsäuren durch Sauerstoffradikale scheint im Verhältnis zur UVC-Bestrahlung zu vernachlässigen zu sein (Kurosaki *et al.*, 2003; Watson *et al.*, 2004). Schäden an den Proteinen des Phagencapsids entstehen erst bei längeren Expositionen zur UVC-Bestrahlung von 20 bis 40 Minuten Dauer (Miller & Plagemann, 1974).

Bei RNA treten vergleichbare UV-bedingte Schäden wie bei DNA auf. Es konnte bereits bei kürzerer UV-Bestrahlung von Mengoviren eine Bildung von Uracil-Dimeren, und damit korrelierend ein Infektiositätsverlust, beobachtet werden (Miller & Plagemann, 1974). Bei bestrahlten Polioviren konnte eine Abnahme der Infektiosität ihrer RNA beobachtet werden (Nuanualsuwan & Cliver, 2003).

Die korrekte Übertragung der genetischen Information einer Zelle auf ihre Tochterzellen ist entscheidend für das Überleben des gesamten Organismus. Deshalb haben sich in Zellen eine Reihe von Nukleinsäurereparaturmechanismen entwickelt, welche auch an der Wiederherstellung von UV-geschädigten Virennukleinsäuren beteiligt sein können, nachdem das Virus seine Nukleinsäure in die Wirtszelle schleusen konnte. Zu diesen Reparaturmechanismen zählen z.B. die Photoreaktivierung, bei der eine Photolyase die Bildung von CPDs direkt umkehrt. Dazu ist die Energie des sichtbaren Lichts nötig. (Sinha & Häder, 2002; Watson *et al.*, 2004). Ein weiterer Reparaturmechanismus ist die ebenfalls enzymabhängige Excisionsreparatur, welche in Basen- und Nukleotid-Excisionsreparatur unterteilt wird (de Laat *et al.*, 1999; Sinha & Häder, 2002; Watson *et al.*, 2004).

In Fällen, in denen eine Zelle DNA-Schäden aus unbekanntem Gründen nicht reparieren kann, ist die Läsionsumgehung einiger Polymerasen von Bedeutung. Solche Polymerasen setzen eine inkorrekte Base gegenüber der Läsion ein und fahren dann mit der Elongation fort (Bridges, 1999; Sinha & Häder, 2002).

2.6 RLT-Modellanlagen

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde eine RLT-Versuchsanlage über eine Länge von 6 m aufgebaut. Als Kanalquerschnitt wurde ein Standardmass mit 700 x 400 mm gewählt. Die RLT-Anlage ist mit klassischen Bauteilen ausgestattet, wobei es sich hierbei um eine Teilklimaanlage handelt. Das UVC-Modul ist über Lichtfallen in die Anlage integriert.

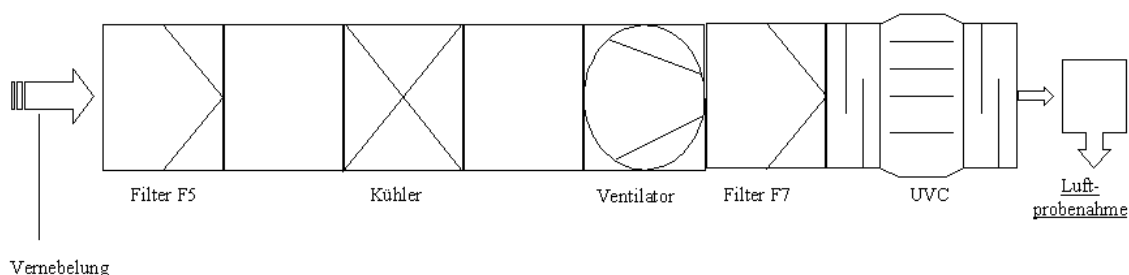


Abb.2.4.1: Schematische Darstellung der RLT-Versuchsanlage

Die Filterkomponenten sind frei austauschbar und jeweils mit einem Differenzdruckmanometer ausgestattet. Der Kühler weist Lamellenabstände von > 6 mm auf. Der Ventilator ist hinsichtlich des Volumenstromes variabel einstellbar und wurde für experimentelle Ansätze mit 2000 m³/h gefahren. Über Messstutzen besteht die Möglichkeit,

Luftfeuchte und Luftgeschwindigkeit extern zu vermessen. Eingesetzt werden hierzu Testo-Messgeräte.

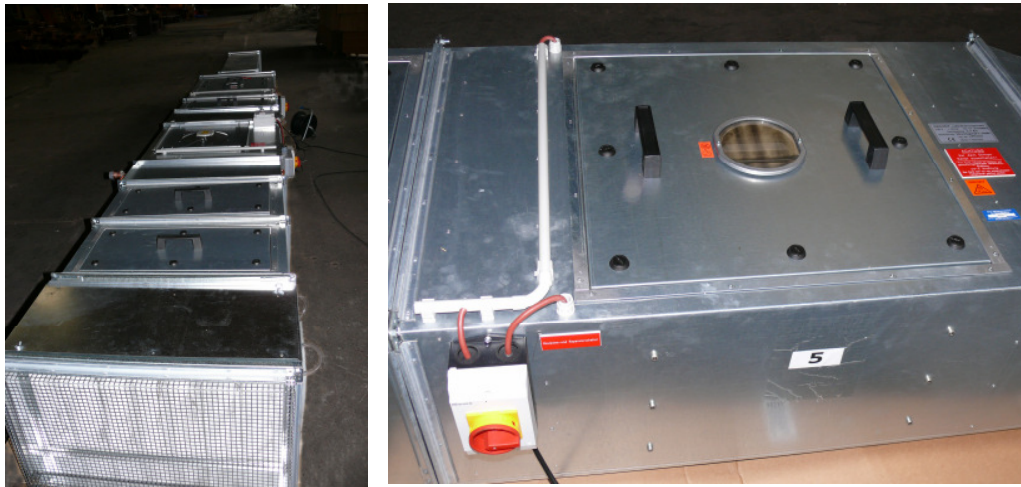


Abb. 2.4.2: RLT-Modellanlage und integrierte UVC-Einheit

Das Bestrahlungskonzept der Firma BÄ•RO sieht eine nicht verspiegelte Brennerkammer vor, bei der zwanzig 95Watt UVC-Strahler im Wandbereich angeordnet sind Abb. 2.4.3.

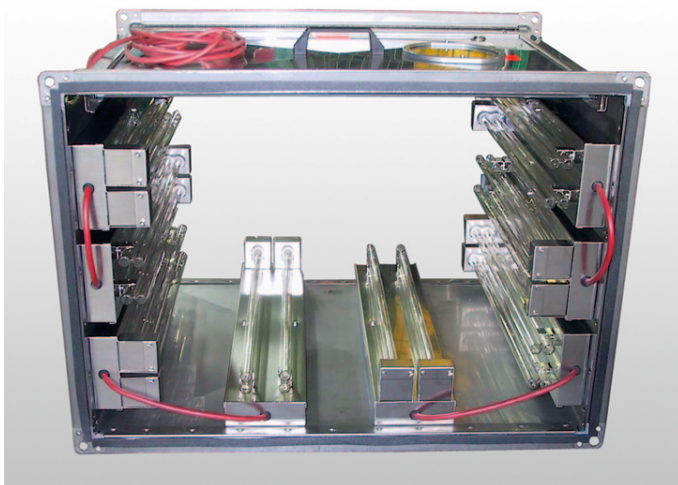


Abb. 2.4.3: UVC-Modul im Querschnitt

In dieser Arbeit wurden parallel Experimente mit einer zweiten RLT-Modellanlage, dem Steritube HVAC der Firma Virobuster Technologies B.V. (Enschede, NL), durchgeführt (Abb. 2.4.4, 2.5; 2.6; 2.7). Der Steritube wurde konzipiert, um in beliebiger Anzahl in Parallelschaltung im Luftstrom einer RLT-Anlage die Luft mit UVC-Strahlung zu desinfizieren.



Abb. 2.4.4: Steritube in modularer Anordnung

Ein Steritube hat die Form einer Röhre, an deren Vorder- und Hinterende weitere Kanalkomponenten zur Verlängerung des Luftstromweges befestigt werden können (Abb. 2.5; 2.7). Das Steritube-Modell besitzt einen Ventilator (Abb. 2.6), dessen Leistung über eine Steuerungssoftware reguliert wird. Zusätzlich sind vom Lufteinlass aus gesehen hinter dem Ventilator zwei 95 W UVC-Röhren installiert (Abb. 2.6), welche ebenfalls über die Steuerungssoftware zugeschaltet werden können, um den Luftstrom mit UVC-Strahlen zu desinfizieren. Die innere Oberfläche des Bestrahlungsbereichs ist verspiegelt, um den Wirkungsgrad der UVC-Bestrahlung zu erhöhen (Nach Herstellerangaben kann pro Modul ein maximales Luftvolumen von bis zu 400 m³/h entkeimt werden).

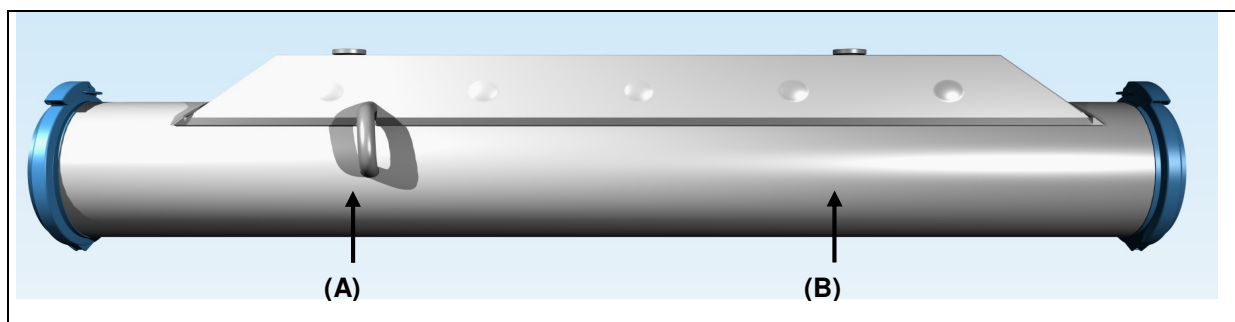


Abb. 2.5: Seitenansicht eines Steritubes HVAC

Links befindet sich der Lufteinlass, rechts der Luftauslass; **(A)**: Der Pfeil verweist auf die Position des Ventilators im Inneren des Steritubes; **(B)**: Der Pfeil verweist auf die Position des UVC-Bestrahlungsbereichs im Inneren des Steritubes (2 x 95 W UVC-Röhren, Philips); (Quelle: Virobuster).

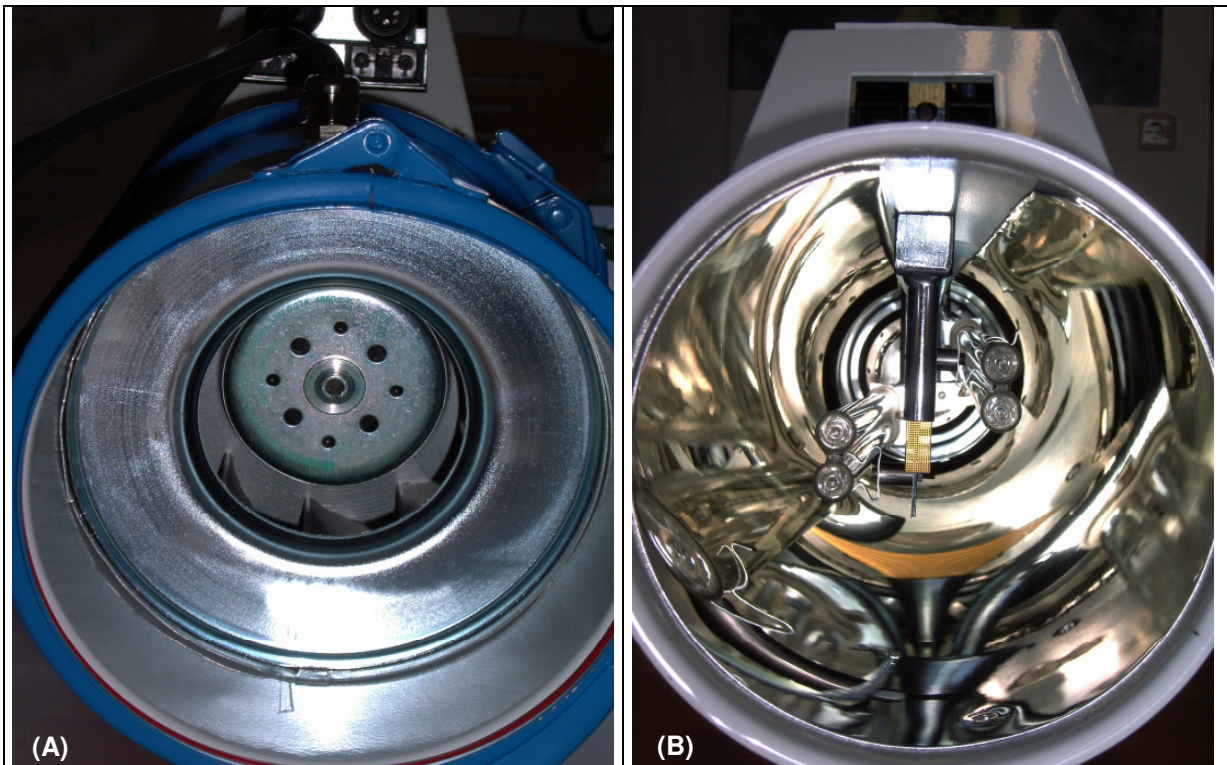


Abb. 2.6: Lufteinlass und Luftauslass eines Steritubes

(A): Blick in die Lufteinlassöffnung des Steritubes, zu erkennen sind die Rotorblätter des Ventilators; (B): Blick in die Luftauslassöffnung, zu erkennen sind zwei 95 W UVC-Röhren sowie die innere verspiegelte Oberfläche, um den Wirkungsgrad der Bestrahlung zu erhöhen.

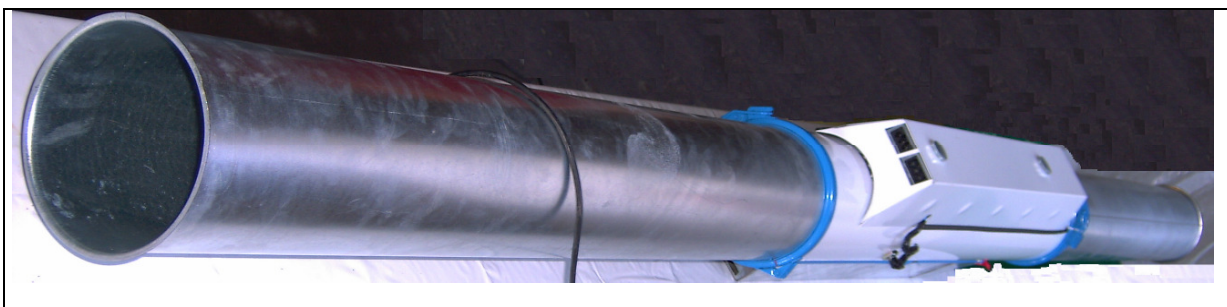


Abb. 2.7: Ansicht des Steritubes mit angefügten Kanalkomponenten

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Vernebelungsexperimenten wurden die durch einen Kollisionsvernebler erzeugten Aerosole mit einem Luftkeimsammler und dazugehörigen Gelatinefiltern (Sartorius, Göttingen) aufgefangen. Gelatinefilter erwiesen sich trotz ihrer im Vergleich zu Viren hohen Porengröße von $3\ \mu\text{m}$ aufgrund der absorptiven Eigenschaften als sehr effizient in ihren Probennahmeeigenschaften und der Luftkeimsammler (Jaschhof, 1992).

2.7 UV-Bestrahlung zur Inaktivierung von Mikroorganismen und Viren

Mikroorganismen, wie Pilze und Bakterien, sowie Viren lassen sich durch verschiedene Agenzien inaktivieren. Dabei wird zwischen chemischer und physikalischer Desinfektion unterschieden (Borneff *et al.*, 1982).

Zur chemischen Desinfektion wird der Einsatz von Bioziden gerechnet. Im Bezug auf Viren konnte eine Wirksamkeit von verschiedenen Alkoholen (Moorer, 2003), NaOH und Formaldehyd (Jones *et al.*, 1991), immobilisierten hydrophoben Polykationen auf Oberflächen (Gelman *et al.*, 2004), Ozon (Komanapalli & Lau, 1998) sowie weiteren Chemikalien wie Glutaraldehyd, Iod, anionische Detergentien, Chlorhexidin und Wasserstoffperoxid (Woolwine & Gerberding, 1995; Doultree *et al.*, 1999) nachgewiesen werden.

Zur physikalischen Desinfektion wird die Bestrahlung mit UV-Licht gerechnet. Um Infektionsrisiken zu minimieren, wurde die Wirksamkeit von UV-Strahlung gegenüber Pilzsporen (Levetin *et al.*, 2001; Lin & Li, 2002; Brickner *et al.*, 2003; Kujundzic *et al.*, 2006) und Bakterien ausführlich untersucht (Kundsinn, 1964; Ko *et al.*, 2000, 2002; Peccia *et al.*, 2001; Lin & Li, 2002; Brickner *et al.*, 2003; Caillet-Fauquet *et al.*, 2004; Griffiths *et al.*, 2005; Hijnen *et al.*, 2005), wobei besonderes Augenmerk auf Bakterienaerosole gerichtet wurde, da künstlich erzeugte Aerosole bei militärischen oder terroristischen Angriffen eine Rolle spielen könnten (Brickner *et al.*, 2003; Kujundzic *et al.*, 2006).

Um Kontaminationen von RLT-Anlage zu verringern, ist bereits der Einsatz von physikalischer Desinfektion durch UV-Systeme im Luftstrom getestet worden (Menzies *et al.*, 2003; Kujundzic *et al.*, 2006). In zahlreichen Studien wurde die germizide Wirkung von UV-Strahlung gegenüber Mikroorganismen und Viren durch Messung von deren UV-Inaktivierungsraten bestimmt (z.B.: Meng & Gerba, 1996; Gerba *et al.*, 2002; Lin & Li, 2002; Brickner *et al.*, 2003; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Hijnen *et al.*, 2005; Tseng & Li, 2005). Somit ist davon auszugehen, dass der Einsatz von UV-Systemen in RLT-Anlagen neben den Gefahren bakterieller und durch Pilze verursachter Infektionsrisiken auch die Risiken viraler Transmission minimiert.

Die Wirksamkeit von UV-Strahlen auf Mikroorganismen und Viren basiert in erster Linie auf den unter 2.4 beschriebenen Nukleinsäureschäden, wobei die Effektivität der UV-Strahlung signifikant von der Strahlungsstärke, Dauer, Raumbeschaffenheit sowie Platzierung der UV-Lampen abhängig ist (Wang *et al.*, 1995; Meng & Gerba, 1996; Ko *et al.*, 2002; Brickner *et al.*, 2003; Caillet-Fauquet *et al.*, 2004; Hijnen *et al.*, 2005). Des Weiteren wird die Erhaltung

der Infektiosität von Viren und der Lebensfähigkeit von Bakterien durch weitere Faktoren wie der relativen Luftfeuchtigkeit (*Relative Humidity*, RH) beeinflusst. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich eine hohe RH, z.B. 80 %, grundsätzlich günstig auf die Stabilität von Viren und Bakterien auswirkt, was bedeutet, dass die zur Inaktivierung nötigen UV-Dosen in feuchter Luft höher als in trockener Luft sind (Ijaz *et al.*, 1987; Ko *et al.*, 2000; Peccia *et al.*, 2001; Lin & Li, 2002). Der Durchmischungsgrad der Luft (Nicas, 1996; Ko *et al.*, 2002) und Proteinlösungen wie Gelatine oder Albumin im Virenaerosol oder Virenlysat (Li *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2006) erhöhen ebenfalls die Stabilität der Mikroorganismen und somit deren Widerstandsfähigkeit gegenüber UV-Strahlung.

Die Anfälligkeit von Mikroorganismen gegenüber UV-Strahlen ist neben physikalischen Umweltfaktoren unter anderem von Eigenschaften wie der Präsenz einer Zellwand und deren Dicke abhängig, da gezeigt werden konnte, dass von Pilzsporen eine bis zu 80 Mal höhere UV-Dosis zur Inaktivierung benötigt wird als von Bakterien (Lin & Li, 2002). Auch die Tenazität, d.h. die Stabilität in der Umwelt, welche durch pH-Toleranz, Temperaturempfindlichkeit, Replikationsfähigkeit und Resistenz gegenüber Austrocknung beeinflusst wird, hat an der UV-Sensitivität von Mikroorganismen und Viren Anteil. Mikroorganismen in einem Aerosol sind dabei leichter durch UV-Bestrahlung zu inaktivieren als in Suspension, was auf einen schützenden Einfluss der Flüssigkeit im Vergleich zu wesentlich kleineren Aerosoltröpfchen zurückzuführen ist (Brickner *et al.*, 2003).

Bezüglich der erforderlichen UV-Inaktivierungsdosis von Viren konnte demonstriert werden, dass diese niedriger als bei Bakterien und Pilzsporen ist (Jensen, 1964; Brickner *et al.*, 2003; Tseng & Li, 2005). Dabei spielt der Typ der Virennukleinsäure eine entscheidende Rolle. Viren mit einem einzelsträngigen RNA-Genom sind mit den niedrigsten UV-Dosen zu inaktivieren, gefolgt von Viren mit einzelsträngigem DNA-Genom, dann folgen Viren mit doppelsträngigem RNA- und dann DNA-Genomen (Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Tseng & Li, 2005). So ist gezeigt worden, dass humane Adenoviren mit ihrem doppelsträngigen DNA-Genom am resistentesten gegenüber UV-Strahlung sind und sich Viren mit einzelsträngigen RNA-Genomen wie Feline Caliciviren (FCV) und MS2 mit den geringsten UV-Dosen zu inaktivieren lassen (Meng & Gerba, 1996; Gerba *et al.*, 2002; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Tseng & Li, 2005).

In Virenaerosolen wurden für 90 % Inaktivierung bei ssRNA-Viren erforderliche UV-Dosen von 339 bis 423 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ gemessen, für ssDNA-Viren 444 bis 494 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, für dsRNA-Viren 662 bis 863 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ und für dsDNA-Viren 910 bis 1196 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$. Für eine 99 %ige Inaktivierung wurden für alle getesteten Phagenaerosole etwa zwei Mal größere UVC-Dosen ermittelt als für eine 90 %ige Inaktivierung (Tseng & Li, 2005).

2.8 Untersuchung der Virusinaktivierung mittels PCR

Dass sich Nukleinsäureschäden aufgrund einer schlechteren Amplifizierbarkeit der Nukleinsäurestränge nachweisen lassen, ist in Ansätzen für DNA (Espy *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2004) und RNA (Shin & Sobsey, 2003; Duizer *et al.*, 2004) gezeigt worden. Dabei konnte beobachtet werden, dass Amplifikate mit einem niedrigeren G+C-Gehalt von 42 % eine stärkere Inaktivierungsrate aufweisen als Amplifikate mit einem höheren G+C-Gehalt von 65 %, was auf eine erhöhte Häufung von Thymin-Dimeren zurückzuführen sein kann (Espy *et al.*, 1993).

Um die Wirksamkeit von UVC-Strahlung gegen Viren mittels molekulargenetischem Nachweis zu überprüfen, wurden verschieden lange Amplifikate der Viren-Nukleinsäure durch konventionelle PCRs generiert und die Bandenintensitäten in Agarosegelen nach EtBr-Färbung verglichen. Dabei zeigte sich, dass längere Amplifikate von 1,2 und 2,0 kb Länge von Schweine-Parvovirus nach UVC-Dosen von 216 mJ/cm² nicht mehr nachzuweisen waren (Wang *et al.*, 2004).

UVC-Strahlung wird auch zur Dekontamination von Blutprodukten genutzt. Die erforderliche UVC-Inaktivierungsdosis von Bakterien und Viren z.B. in Thrombozyten- oder Plasmakonzentraten kann so gewählt werden, dass die erwünschten Proteinfunktionen der Thrombozyten erhalten bleiben und nur die potentiellen Krankheitserreger inaktiviert werden. In diesem Zusammenhang spielen ebenfalls molekulargenetische Nachweismethoden eine Rolle (Lin *et al.*, 1993, 1994; Chin *et al.*, 1995, Caillet-Fauquet *et al.*, 2004; Störmer *et al.*, 2007).

In Ansätzen wurde bereits der Einsatz von Real-Time RT-PCR-Systemen im Vergleich zu konventionellen PCR-Systemen zum Nachweis von UVB-Inaktivierung an Caliciviren getestet. Für jeden untersuchten Virustyp (FCV, Canines Calicivirus und Norovirus) wurden dabei je ein Primersystem für eine konventionelle und Real-Time PCR getestet. Dabei konnte, weil die gewählten Amplifikatgrößen vermutlich zu klein waren, nur eine geringe Reduktion in den ct-Werten der Real-Time PCR detektiert werden, während in den Bandenintensitäten der konventionellen PCR aus RNA-Proben mit UVB bestrahlter und unbestrahlter Proben kein Unterschied festzustellen war (Duizer *et al.*, 2004).

3. Material

3.1 Primer

Tab. 3.1: Primer						
Phage	Bezeichnung	Position	Sequenz (5' - 3')	Annea- lingtem- peratur der PCR	Referenz	
MS2		Acc.-Nr.: V00642				
		MS2-TM3-F	3166-3183	GGC TGC TCG CGG ATA CCC	60 °C	Dreier <i>et al.</i> , 2005
		MS2-TM2-F	3169-3184	TGC TCG CGG ATA CCC G	60 °C	Dreier <i>et al.</i> , 2005
		MS2-2993-F	2993-3015	ACG GGG TTG GGG AGT TGT CGG A	60 °C	diese Arbeit
		MS2-826-F	2826-2848	GCA CTT GCC TAC TAC GGT TTT A	60 °C	diese Arbeit
		MS2-2563-F	2563-2585	ATC GCC TGG TGT GGA GTT TTC T	60 °C	diese Arbeit
		MS2-2310-F	2310-2332	GAA TTT AGG CTC GTT GTA GGG A	60 °C	diese Arbeit
		MS2-1693-F	1693-1712	CCT CAG CAA TCG CAG CAA A	60 °C	diese Arbeit
		MS2-1358-F	1358-1377	CGT TCT CGT CGA CAA TGG C	60 °C	diese Arbeit
		MS2-TM2-R	3229-3210	AAC TTG CGT TCT CGA GCG AT	60 °C	Dreier <i>et al.</i> , 2005
		MS2-TM3-R	3367-3349	TGA GGG AAT GTG GGA ACC G	60 °C	Dreier <i>et al.</i> , 2005
Phi X174		Acc.-Nr.: NC_001422				
		X174-166F	166-191	AGA AGC TCT TAC TTT GCG ACC TTT C	63 °C	diese Arbeit
		X174-688F	688-712	GCG CTG AAT TTA CGG AAA ACA TTA	63 °C	diese Arbeit
		X174-1171F	1171-1195	TGG CCT TGC TAT TGA CTC TAC TGT A	63 °C	diese Arbeit
		X174-1628F	1628-1650	GAT TAC TTC ATG CAG CGT TAC CA	63 °C	diese Arbeit
		X174-1819F	1819-1840	GCC GCG TTT CTT TGT TCC TGA G	63 °C	diese Arbeit
		X174-2135F	2135-2159	GAT TTG CAA GAA CGC GTA CTT ATT C	63 °C	diese Arbeit
		X174-2220R	2220-2196	ACC TGA CTA TTC CAC TGC AAC AAC T	63 °C	diese Arbeit
Lambda		Acc.-Nr.: J02459				
		Lambda - F	2214-2232	ATG CCA CGT AAG CGA AAC A	60 °C	diese Arbeit
		Lambda - 487F	487-509	GAA GAA TGC CAG AGA CTC CGC T	60 °C	diese Arbeit
		Lambda - 830F	830-852	CCC GAA AGA ATC CGC ATA C	60 °C	diese Arbeit
		Lambda - 1415F	1415-1443	TTT TCA TGT TGC CTG CCC	60 °C	diese Arbeit
		Lambda - 1615F	1615-1643	CCC GTG ATG GCA TTC TCT	60 °C	diese Arbeit
		Lambda - R	2491-2471	GCA TAA ACG AAG CAG TCG AGT	60 °C	diese Arbeit

Tab. 3.1 Fortsetzung: Primer

Phage	Bezeichnung	Position	Sequenz (5' - 3')	Annealingtemperatur der PCR	Referenz
M13		Acc.-Nr. : V00604			
	M13 - F	453-448	GTA AAA CGA CGG CCA GT	60°C	Invitrogen
	M13 - 1414F	1414-1432	AGC CTC AGC GAC CGA ATA T	60°C	diese Arbeit
	M13 - R	205-221	CAG GAA ACA GCT ATG AC	60°C	Invitrogen
	M13 - 1530R	1530-1510	TCG GTT TAT CAG CTT GCT TTC	60°C	diese Arbeit
	M13 - 2411R	2411-2431	TAG CGT TTG CCA TCT TTT CAT	60°C	diese Arbeit
	M13 - 2879R	2879-2900	CCG AGG AAA CGC AAT AAT AAC	60°C	diese Arbeit
Phi 6		Acc.-Nr.: NC_003716			
	Phi 6 - 2831F	2831-2852	GCT CAA AAG GCC GAT TAT GAT C	60 °C	diese Arbeit
	Phi 6 - 2910R	2910-2887	AAC GTC ACA GCA GGT AGG TTT TTC	60 °C	diese Arbeit
Phi 13		Acc.-Nr. : AF261668			
	Phi 13 - 4825F	4825-4844	GCT GTC GAA CTT GGC GAT GT	60 °C	diese Arbeit
	Phi 13 - 4935R	4935-4909	AGA GGA ATG ATC TCT TTC TTC ATG ATC	60 °C	diese Arbeit
Interne Kontrolle		Acc.-Nr.: M17987			
	β2-MG-F	343-362	TGA GTA TGC CTG CCG TGT GA	60 °C	Watzinger <i>et al.</i> , 2004
	β2-MG-R	421-447	ACT CAT ACA CAA CTT TCA GCA GCT TAC	60 °C	Watzinger <i>et al.</i> , 2004

3.2 TaqMan-Sonden

Tab. 3.2: TaqMan-Sonden				
Phage	Bezeichnung	Position	Sequenz (5' - 3')	Referenz
MS2		Acc.-Nr.: V00642		
	TM2-S (JOE)	3186-3209	JOE- ACC TCG GGT TTC CGT CTT GCT CGT -BHQ1	Dreier <i>et al.</i> , 2005
	TM2-S (FAM)	3186-3209	FAM- ACC TCG GGT TTC CGT CTT GCT CGT -BHQ1	diese Arbeit
Phi X174		Acc.-Nr.: NC_001422		
	X174-2173S	2173-2194	FAM- TGA CCA GTG TTT CCA GTC CGT T -BHQ1	diese Arbeit
Lambda		Acc.-Nr.: J02459		
	Lambda - S	2467-2444	FAM- TCA TTG CGT CGC TTT TTG CTG TCC -BHQ1	diese Arbeit
M 13		Acc.-Nr. : V00604		
	M13 - 1413S	1443-1466	FAM- CGT GGG CGA TGG TTG TTG TCA TTG -BHQ1	diese Arbeit
Phi 6		Acc.-Nr.: NC_003716		
	Phi 6 - 2858S	2858-2884	FAM- TCT CAA CAG ATC ATC GAA GCG GAC ACG - BHQ1	diese Arbeit
Phi 13		Acc.-Nr. : AF261668		
	Phi 13 - 4873S	4873-4898	FAM- AAA CGG TTC GTT TAT CGG ATC TAA GT -BHQ1	diese Arbeit
Interne Kontrolle		Acc.-Nr.: M17987		
	β2-MG-JOE	364-394	JOE- CCA TGT GAC TTT GTC ACA GCC CAA GAT AGT T -BHQ1	Watzinger <i>et al.</i> , 2004

3.3 Bakterienstämme

Tab. 3.3: Bakterienstämme		
Stamm	Wirtsorganismus der Phagen	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i> TOP10F'	MS2, M13 und Lambda	Invitrogen, Groningen, NL
<i>Escherichia coli</i> DSM 13127	Phi X174	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolica</i> LM2509	Phi13	Prof. Dennis Bamford, University of Helsinki, Finnland
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolica</i> HB10Y	Phi6	Prof. Dennis Bamford, University of Helsinki, Finnland

3.4 Bakteriophagen

Die Bakteriophagen Lambda (DSM 4499), M13 (DSM 13976), MS2 (DSM 13767) und Phi X174 (DSM 4497) wurden von der DSMZ bezogen.

Die Bakteriophagen Phi6 und Phi13 wurden von Prof. Dennis Bamford, University of Helsinki (FIN) bezogen.

3.5 Zelllinie und Virus der Analyse feliner Caliciviren

Zelllinie:	Crandell's Feline Kidney Cells 205P
Zelltyp:	Katzennierenzellen
Herkunft:	Universität Leipzig Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Ursprung:	USA, ATCC, CCL 94 → England, ECACC, Nr. 86093002 → Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Löffler-Institut, 184. Subkultur
Umsatzrate :	1 : 4 bis 1 : 6
Wachstumscharakteristika:	klare, regelmäßige, spindelförmige Zellen, flächenhaft wachsend, Monolayer bei 1 : 6 nach ca. 72-96 h konfluent, zwischenzeitlicher Mediumwechsel
Morphologie:	Fibroplastoid
Inkubation:	37 °C, 5 % CO ₂

Virus:	Felines Calicivirus (FCV)
Klassifikation:	Caliciviridae, Versivirus
Herkunft:	Universität Leipzig Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Ursprung:	oberer Atemwegstrakt der Katze
Stamm:	FS 20
Empfohlener Wirt:	CrFK-Zellen
Effekt:	In vitro: zytopathischer Effekt

3.6 Reagenzien

Agar	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99,6% reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99,8% vergällt (0,2% MEK)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt
H ₂ O Aqua ad injecta	B. Braun AG, Melsungen
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Kanamycin	Invitrogen, Groningen, NL
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Maltose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Pepton aus Fleisch	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Sephadex G50	USB Amersham, USA
TBE-Puffer (10x)	Invitrogen, Groningen, NL
Tris HCl	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

3.7 PCR-Reagenzien, Enzyme

2x Rxn-Reaction Mix (mit 3,2 mM MgSO ₄)	Invitrogen, Groningen, NL
10x Hot-Master Taq Buffer (mit 25 mM MgSO ₄)	Eppendorf AG, Hamburg
Bovines Serumalbumin (BSA) (20 mg/mL)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
dNTPs (dATP, dUTP, dCTP, dGTP, dTTP)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
H ₂ O - PCR-Grade	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MgSO ₄ 50 mM	Invitrogen, Groningen, NL
Hot-Master Taq DNA-Polymerase (5 U/μL)	Eppendorf AG, Hamburg
Super Script III RT-Platinum Taq Mix (5 U/μL)	Invitrogen, Groningen, NL
UNG Uracil-DNA-Glycosylase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lambda-DNA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
MS2-RNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phi X174-DNA	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

3.8 Nährmedien zur Kultivierung der Bakterien

Luria Bertani Medium mit Maltose und Magnesiumsulfat (LBMM-Medium):

10 g	NaCl
10 g	Pepton
5 g	Hefeextrakt
2 g	Maltose
<u>2,5 g</u>	<u>MgSO₄ x 7H₂O</u>
add. 1.000 mL H ₂ O, pH 7,0 (mit HCl)	

LBMM-Festagar: 1.000 mL LBMM-Medium add. 15 g Agar

LBMM-Weichagar: 200 mL LBMM-Medium add. 1,4g
Agarose

SOC-Medium:	20 g/L	Trypton (2%)
	5 g/L	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	<u>20 mM</u>	<u>Glukose</u>
add.	1.000 mL H ₂ O, pH 7,0 (mit HCl)	

LBMM-Medium bzw. -Agar mit X-Gal und Ampicillin:

500 mL	LBMM-Medium add.
750 µL	Ampicillin-Stammlösung (100 mg/L)
1,6 mL	X-Gal-Stammlösung (100 mg/L)
2,5 mL	IPTG-Stammlösung (1 M/L)

LBMM-Medium bzw. -Agar mit X-Gal und Kanamycin:

500 mL	LBMM-Medium add.
750 µL	Kanamycin-Stammlösung (50 mg/L)
1,6 mL	X-Gal-Stammlösung (100 mg/L)

3.9 Medienzusätze

Kanamycin-Stammlösung 50 mg/mL: in 96 % Ethanol gelöst, sterilfiltriert,
Lagerung bei -20 °C

Ampicillin-Stammlösung 100 mg/L: in 96 % Ethanol gelöst, sterilfiltriert,
Lagerung bei -20 °C

X-Gal: Konzentration 100 mg/L, in
Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst,
sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C

IPTG (Isopropyl-D-thiogalactosid)-Stammlösung: Konzentration 0,1 M,
1,2 g IPTG in 50 mL H₂O gelöst,
sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C

3.10 Material zur Analyse feliner Caliciviren

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Groningen, NL
FBS (Fetales Kälberserum)	Invitrogen, Groningen, NL
Non-essential amino acids (10nM) pH 7,5	Invitrogen, Groningen, NL
Natriumbicarbonat	VWR
Formaldehyd 10%	VWR
Kristallviolett (1%ige wässrige Lösung)	VWR
PBS-Puffer pH 7,3 (ohne Calcium und Magnesium-Ionen)	Invitrogen, Groningen, NL
Trypsin-EDTA (10x) 0,5%, 5,3 mM EDTA	Invitrogen, Groningen, NL
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), pulverförmig	Invitrogen, Groningen, NL
Ultra Pure DNase/RNase free Distilled Water	Invitrogen, Groningen, NL

3.11 Medien zur Analyse feliner Caliciviren

Medium zur Kultivierung der Zelllinie CRFK

45 mL	DMEM-Medium
5,0 mL	FKS
0,5 mL	nicht essentielle Aminosäuren

Medium zur Viruspropagation (Maintenance-Medium)

45 mL	DMEM-Medium
1 mL	FKS
0,5 mL	nicht essentielle Aminosäuren

Medium für Plaque-Assay

DMEM (Pulver) als doppelt konzentrierte Lösung mit sterilem Wasser ansetzen und nach Herstellerangaben die entsprechende Menge Natriumbicarbonat hinzufügen. Anschließend wird dieses Medium steril filtriert, 1% essentielle Aminosäuren und 2% FKS werden hinzu pipettiert.

50 mL	DMEM doppelt konzentriert (vorgewärmt auf 37 °C)
50 mL	Agarose - Lösung (low-melt) 10 % steril (vorgewärmt auf 43 °C)

3.12 Puffer

10 mM MgSO ₄ :	2,4 g MgSO ₄ / 1000 mL H ₂ O
SM-Puffer:	5,8 g NaCl 2,4 g Tris-HCl 1,0 g CaCl ₂ 0,1 g Gelatine <u>2,0 g MgSO₄ * 7H₂O</u> add. 1.000 mL, pH 7,0 (mit HCl)
Auftragspuffer (6x, Fermentas):	10 mM Tris-HCl (pH 7,6) 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylencyanol 60 mM EDTA <u>60 % Glycerin</u> in 0,5x TBE

3.13 Testkits

BigDye Terminator Kit, Version 1.1	Applied Biosystems, Darmstadt
Gelatinefilter zur Luftkeimsammlung	Sartorius GmbH, Göttingen
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden

SuperScript III One-Step RT-PCR with Platinum- <i>Taq</i>	Invitrogen, Groningen, NL
TOPO TA Cloning Kit, Vektor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Invitrogen, Groningen, NL

3.14 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
Analysenwaage BP 160 P	Sartorius AG, Göttingen
BÄ•RO RLT-Anlage	BÄ.RO GmbH, Leichlingen
Block-Thermocycler TCV 5*9	Landgraf Laborgeräte, Langenhagen
Brutschrank (mit variabler Temperatureinstellung)	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Diana II Digital Image Analyzer mit Dunkelkammer	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
Feinwaage XP105 DR/M	Mettler Toledo GmbH, Greifensee, CH
Gelelektrophoresekammer	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Gradient Cycler TGradient 96	Biometra GmbH, Göttingen
Laminar Air Flow	Heraeus
Thermocell Cooling + Heating Block CHB-202	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Inkubator unimax 1000 mit Schüttler unimax 1010	Heidolph, Schwabach
Klima Messgerät mit Thermometer testo 445	Testo AG, Lenzkirch
Kolbenhubpipetten, verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg
LightCycler 1.2 und 2.0	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Luftfeuchtemessgerät testo 605-H1	Testo AG, Lenzkirch
Luftkeimsammler MD-8	Sartorius AG, Göttingen
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrowelle	AEG, Dormagen
PARI BOY Kompressor	PARI GmbH, Starnberg
PARI LC PLUS Turbo Vernebler	PARI GmbH, Starnberg
Personal Cycler	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter 766	Knick, Berlin
Photometer Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences,

	Piscataway, USA
Glaspasteurpipetten mit Absaugvorrichtung und Vakuumpumpe	VWR
Umkehrmikroskop	Motic
CO ₂ -Brutschrank (37 °C)	Binder
Gefrierschrank (-18 °C)	Bosch
Kühlschrank (4 °C)	Miele
Zentrifuge Heraeus	Thermo Hera Safe
Receiver Columns (Leersäulen für Chromatographie)	Macherey & Nagel, Düren
Rotor-Gene RG-3000	Corbett Research, Sydney, AUS
Steritube HVAC	Virobuster Technologies B.V., Enschede, NL
Strömungsmesssonde testo 405-V1	Testo AG, Lenzkirch
UV-VIS Radiometer RM-12	Dr. Gröbel UV-Elektrotechnik GmbH, Ettlingen
UVC-Strahler TUV 95W	Philips, Hamburg
Wasserbad 37 °C	Memmert
Zentrifugen 5417C, 5417 und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge 6-10, Rotor 11160, max. 4500 rpm	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Zentrifuge Rotaxa / RP, Rotor 5096, max. 4000 rpm	Hettich, Tuttlingen

3.15 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen 75cm ²	VWR
6-well Zellkulturplatten	VWR
Einwegpipetten 1 ml, 5 ml, 25 ml	VWR
Sterile Schottflaschen, autoklavierbar, 250 ml	VWR
Spritzenvorsatzfilter zum Sterilfiltrieren, 0,22 µm	VWR
Sterile Einweg-Zentrifugenröhrchen 15 ml	VWR
Sterile Einweg-Reagenzglasröhrchen 5 ml	VWR
Gelatine Filter Abscheiderate 3,0 µm	Sartorius

3.16 Software

ABI Prism 310 Collection

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
Software, Applied Biosystems,
Darmstadt

Diana Diana v1.6

Raytest Isotopenmessgeräte
GmbH, Straubenhardt

Oligo Primer Analysis 5.0

National Biosciences, Plymouth,
USA

Roche Molecular Biochemicals

Light-Cycler Software Version 3 und 4.0

Roche Diagnostics GmbH,
Mannheim

Rotor-Gene Analysis Software Versionen 6.0 und 6.1

Corbett Research, Sydney, AUS

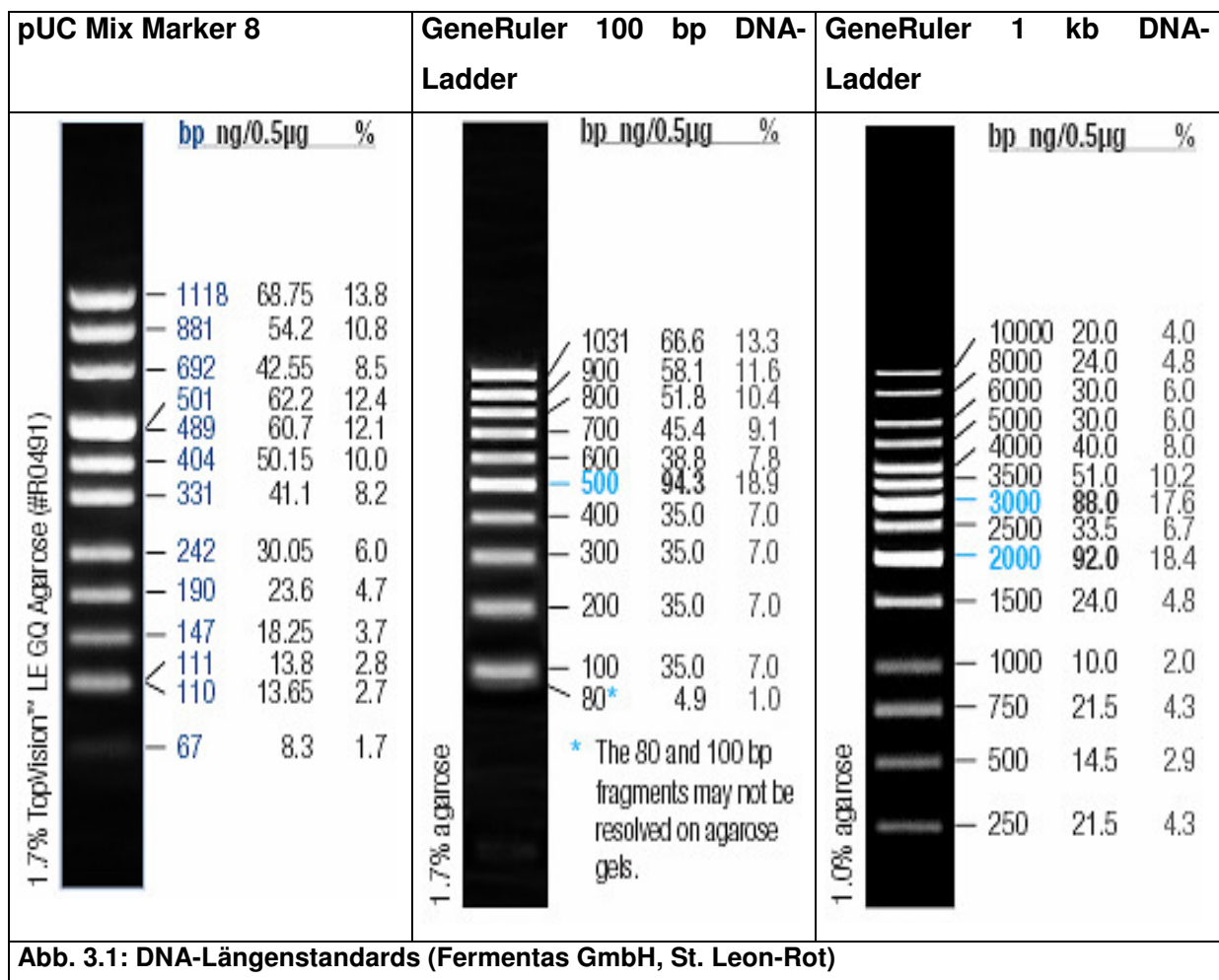
Steritube Steuerungssoftware

Virobuster Technologies B.V.,
Enschede, NL

TGradient Software Version 4.20

Biometra GmbH, Göttingen

3.17 DNA-Längenstandards



Gezeigt sind die jeweiligen Bandenmuster in Agarosegelen. Die Zahlen stehen für die Größe einer jeweiligen Bande in Basenpaaren. Alle drei Längenmarker wurden von der Fermentas GmbH, St. Leon-Rot bezogen.

3.17.1 Daten und Herstellerangaben zum Steritube HVAC (Viobuster, Enschede, NL)

Der Steritube wurde konzipiert, um in beliebiger Anzahl in Parallelschaltung im Luftstrom einer RLT-Anlage die Luft mit UVC-Strahlung zu desinfizieren. Bauartbedingt sind so die maximalen Entfernungen des Luftstroms zu einer UVC-Röhre klein gehalten. Die im

Steuerungsprogramm eingestellten Werte für die Ventilatorgeschwindigkeit entsprechen dem Luftdurchsatz in m^3/h . Die Herstellerangaben und eigenen Messwerte sind in Tab. 3.4 aufgeführt. Im Inneren der Bestrahlungsfläche ist eine UVC-Messsonde installiert, welche die UVC-Dosis erfasst und auf dem Programmdisplay anzeigt.

Tab. 3.4: Herstellerangaben bezüglich des Steritubes (Virobuster, Enschede, NL)	
Gesamtlänge	120 cm
Länge des Bestrahlungsbereichs	100 cm
Breite	22 cm
Höhe	22cm
Innendurchmesser	16 cm
Maximaler Luftdurchfluss	400 m^3/h
Herstellerangaben der UVC-Röhren TUV-95W (Philips, 2007)	
Strahlungsintensität in einem Meter Abstand	304 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

Das System wurde in den Experimenten mit einem Luftdurchsatz von $300 \text{ m}^3/\text{h}$ gefahren. Hier bei stellen sich Luftgeschwindigkeiten von $4,1 \text{ m/s}$ ein. Bei einer Bestückung mit zwei TUV 95W-Strahlern, die zentral in der Brennerkammer angeordnet sind ergibt sich eine UVC Strahlungsleistung von 64 Watt. Je nach Berücksichtigung der Bestrahlungstrecke ergeben sich hier UVC-Dosiswerte von etwa $5,4 \text{ mWs}/\text{cm}^2$. Durch Verwendung innenverspiegelter Oberflächen werden vom Hersteller allerdings weitaus höhere Dosiswerte angegeben. ($12,0 - 19,2 \text{ mWs}/\text{cm}^2$).

3.17.2 Daten und Herstellerangaben zum BÄ•RO UVC-Modul

Bei dem in die bereits beschriebene Modellanlage integriertem UVC Modul der Firma BÄ•RO handelt es sich um ein Bauteil mit den Außenmaßen $400\text{mm} \times 700\text{mm}$. Hierin sind zwanzig 95 Watt-Strahler peripher U-förmig im Wandungsbereich angeordnet, wobei im Deckelbereich keine Strahler zu finden sind. Die UVC-Strahlungsleistung liegt hier bei 640 W. Bei einem Luftvolumenstrom von $2000 \text{ m}^3/\text{h}$ ergibt sich eine UVC-Dosis von etwa $12,95 \text{ mWS}/\text{cm}^2$. Auch hier ist zu berücksichtigen, dass die Dosis nicht genau angegeben werden kann, wobei dieser Aspekt noch zu diskutieren ist.

4. Methoden

4.1 Kultivierung der Bakterien, Herstellung von Phagenlysaten durch konfluente Lyse sowie Titerung von Phagenlysaten und Gelatinefilterproben

4.1.1 Kultivierung der Bakterien und Aufbereitung zum Plattieren mit Phagen

Mit Hilfe einer Impföse wird eine Kolonie von der entsprechenden Stammplatte in 50 bis 100 mL LBMM-Medium überführt. Der Schüttelkolben wird bei 37 °C auf dem Temperaturinkubator (Inkubator unimax 1000 mit Schüttler unimax 1010) unter Schütteln bei 180 rpm inkubiert, bis eine OD_{600} von etwa 2 erreicht ist. Das entspricht etwa $1,6 \times 10^9$ Zellen pro mL (Maniatis *et al.*, 1989).

Die flüssige Bakterienkultur wird je nach Menge zu gleichen Teilen in 50 mL Reaktionsgefäße überführt und mindestens 5 min mit 4.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Rotaxa / RP, Rotor 5096). Nach Abgießen des Überstandes wird das Pellet aus Zellen in 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert. Ein Pellet aus 50 mL Kultur wird dabei in etwa 5 mL 10 mM $MgSO_4$ suspendiert. Dabei ist zu beachten, dass *E. coli* TOP10F' nicht zu stark auf- und abpipettiert bzw. auf dem Vortex-Mixer geschüttelt wird, da auftretende Scherkräfte und Erschütterungen die F-Pili der Zellen schädigen. Die so gewonnene Bakteriensuspension kann mehrere Tage bei 4 °C gelagert und zum Ausplattieren mit Phagen verwendet werden (Maniatis *et al.*, 1989).

4.1.2 Bestimmung des Phagentiters mittels TOP-Agar-Methode

Zum Plattieren von Bakterien mit Phagen werden pro Petrischale (Durchmesser 8 cm) mit LBMM-Agar 250 μ L der Bakteriensuspension einer OD_{600} von ca. 2 in einem 5 mL Reaktionsgefäß mit 100 μ L der entsprechenden Phagenlösung versetzt. Anschließend wird das Reaktionsgefäß auf niedrigster Stufe einmalig kurz mit dem Vortex-Mixer geschüttelt, so dass die Bakteriensuspension mit Phagen erkennbar in Drehbewegung versetzt wird. Anschließend erfolgt eine Inkubation der Reaktionsgefäße 15 min bei 37 °C im Brutschrank. Nach dieser Inkubation werden in jedes Reaktionsgefäß nacheinander je 4 mL LBMM-Weichagar gegeben und unmittelbar danach der Inhalt des Röhrchens auf die LBMM-Agar Petrischale gegossen. Durch leichtes Schwenken der Platte verteilt sich der Weichagar gleichmäßig auf der Agaroberfläche. Nach Erstarren des Weichagars können die

Petrischalen bei 37 °C über Nacht (ü. N.) im Brutschrank inkubiert werden. Am nächsten Tag können im Weichagar Löcher im Bakterienrasen, die sogenannten Plaques, beobachtet werden, wenn die Phagen infektiös waren.

4.1.3 Herstellung von Phagenlysaten durch konfluente Lyse

Es wird wie oben beschrieben ein Phagenlysat mit dem entsprechenden Wirtsstamm (Tab. 3.3) plattiert. Dabei ist ein Lysat oder eine Verdünnung zu benutzen, deren Titer hoch genug ist, um eine durchgehende, konfluente Lyse der Bakterien zu erzielen. Dabei sollten nach Inkubation bei 37 °C ü. N. keine einzelnen Plaques mehr zu erkennen sein. Nach der Inkubation wird jede Petrischale mit 5 mL SM-Puffer überschichtet, leicht geschwenkt und bei 4 °C mindestens für 4 h ruhig inkubiert. Dieser Schritt kann über mehrere Tage verlängert werden. In dieser Zeit diffundieren die Bakteriophagen aus dem Weichagar in den SM-Puffer.

Nach der Inkubationszeit wird das neu gewonnene Phagenlysat mit einer Pipette von den Petrischalen abgenommen und in 50 mL Reaktionsgefäßen gesammelt. Nach Zugabe von 2 bis 3 mL Chloroform wird das Lysat für 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, um die noch vorhandenen Bakterien abzutöten. Anschließend wird das Lysat zentrifugiert (4.000 rpm, 5 min, Zentrifuge 6-10, Rotor 11160), der Überstand (obere Phase ohne Zelltrümmer) in neue Reaktionsgefäße überführt und erneut mit 1 bis 2 mL Chloroform versetzt. Aus dem auf diese Weise aufgearbeiteten Phagenlysat kann der Titer mittels Top-Agar-Methode (4.1.4) bestimmt werden und das Lysat bei 4 °C über lange Zeit ohne Titerverlust gelagert werden (Clark, 1962; Ackermann *et al.*, 2004; Jepson & March, 2004; Dreier *et al.*, 2005; diese Arbeit).

4.1.4 Titerung eines Lysats

Um ein Lysat oder einen gelösten Filter zu titern, wird dieses / dieser 10^{-1} bis 10^{-x} in SM-Puffer verdünnt. Die jeweiligen Verdünnungsstufen werden plattiert (4.1.2) und der Titer nach der Anzahl der Plaques einer bestimmten Verdünnungsstufe hochgerechnet.

Wenn kein hoher Titer zu erwarten ist (z.B. bei mit UVC-Licht bestrahlten Lysaten), wird das Lysat unverdünnt und in der 10^{-1} Verdünnung mehrfach plattiert. Die ausgezählten PFU werden auf die plattierte Gesamtmenge des Lysats hochgerechnet und so der Ursprungstitel berechnet. Die Berechnung des Titers in PFU pro mL erfolgt nach der Formel:

$$\text{Titer} = \text{PFU} * 10 * 10^x$$

10^x repräsentiert die jeweilige Verdünnungsstufe einer Probe.

4.2 Vernebelung von Phagenlysaten und Luftprobennahme

4.2.1 Vernebelung von Phagenlysaten

Zur Vernebelung eines Phagenlysats werden Vernebelungskompressor PARI BOY und der über einen Schlauch mit dem Kompressor verbundenen Vernebler PARI LC PLUS Turbo auf eine Waage gestellt und diese austariert. Anschließend wird das zu vernebelnde Phagenlysate in den Vernebler eingefüllt und das Gewicht des Lysats notiert. Der Kompressor samt Vernebler wird von der Waage genommen und in die Nähe der Einlassöffnung der Modell-RLT-Anlage gestellt, damit der Vernebler mit seiner Öffnung mit Hilfe eines Stativs mittig im Ansaugstrom des RLT-Systemes, platziert werden kann. Der Ventilator der RLT-Anlage wird über die Steuerungssoftware eingeschaltet und auf die entsprechende Geschwindigkeit eingestellt. Hat der Ventilator seine Drehgeschwindigkeit erreicht, kann der Kompressor eingeschaltet werden. Das Phagenlysate wird im Vernebler durch Kollisionsvernebelung in den Luftstrom gebracht, indem Druckluft in den Vernebler geblasen wird. Die Dauer einer Vernebelung kann manuell durch Ein- und Ausschalten des Kompressors reguliert werden, ebenso wie die UVC-Röhren in der jeweiligen RLT-Anlage manuell über die Steuerungssoftware ein- und ausschaltbar sind. Nach Beendigung einer Vernebelung wird der Kompressor mit Vernebler erneut gewogen. Die Gewichts Differenz entspricht dem Gewicht des vernebelten Phagenlysats.

4.2.2 Luftprobennahme

Die Luftprobennahme erfolgt mit dem Luftprobennahmegerät MD-8 der Sartorius AG, Göttingen. Die Standardprobennahmezeit beträgt 10 min bei einer Saugleistung von $6 \text{ m}^3/\text{h}$. Zur Entnahme werden zertifizierte Gelatinefilter mit einer Porengröße von $3 \mu\text{m}$ verwendet, welche einen Durchmesser von 80 mm haben und in Einweeinheiten aus Kunststoff geliefert werden (Sartorius AG). Die Durchflussrate eines Filters für Luft beträgt unter diesen Bedingungen $2,7 \pm 0,5 \text{ L/min/cm}^3$ (Angabe des Herstellers).

4.2.2.1 Luftprobennahmebedingungen

Ist eine Vernebelung vorbereitet (4.2.1), wird am anderen Ende der RLT-Anlage mit Hilfe eines Stativs der Filteradapter mit Saugrüssel des Luftprobensammelgerätes mittig im Luftauslassstrom platziert. Vor dem Einschalten des Ventilators wird eine Gelatinefiltereinweeinheit aus ihrer Verpackung genommen und auf den Adapter vor dem Luftauslass gesetzt. Nach Einschalten des Ventilators wird die Vernebelung gestartet und unmittelbar danach das Luftprobensammelgerät aktiviert. Nach der eingestellten Sammlungsdauer schaltet sich das Luftprobensammelgerät eigenständig ab. Im Regelfall wurde zu diesem Zeitpunkt der Kompressor von Hand abgeschaltet, da dieser nicht über eine Zeitschaltuhr verfügt. Zur Weiterverarbeitung wird der Filter aus der Einweeinheit entnommen und in ein schon vorbereitetes 50 mL Reaktionsgefäß mit 10-20 mL SM-Puffer überführt. Die Reaktionsgefäße werden auf dem Thermoschüttler bei 37 °C und mäßiger Schüttelbewegung (ca. 120 rpm) so lange inkubiert, bis die Gelatine vollständig gelöst und der Puffer klar ist. Zur Abtötung von Bakterien werden 2 mL Chloroform supplementiert. Die so gewonnene Gelatinelösung kann zur Titerbestimmung (4.1.4) und zur Nukleinsäureextraktion (4.3) eingesetzt werden.

4.2.3 Desinfektion der RLT-Modellanlagen

Nach erfolgter Vernebelung eines Viruslysats wird die RLT-Modellanlage mit 99,6 % reinem Ethanol desinfiziert. Dazu wird zunächst mit einer Sprühflasche Ethanol in den mit einer Geschwindigkeit von 135 m³/h oder höher laufenden RLT-Anlage gesprüht, so dass das Ethanol angesaugt wird und sich im Steritube verteilt. Anschließend werden die Röhre vor der Ansaug- und Auslassöffnung abgenommen. Unter Zuhilfenahme eines Wischers aus Kunstfaserwolle werden die Innenflächen der Rohre sowie auch das Innere der RLT-Anlage bestmöglich mit Ethanol benetzt. Nach kurzer Einwirkzeit wird die RLT-Anlage wieder zusammengesetzt und für einige Minuten mit maximaler Ventilationsgeschwindigkeit betrieben, um durch den Luftzug das restliche Ethanol verdampfen zu lassen.

4.3 Nukleinsäureextraktion aus Phagenlysaten und Filtern

4.3.1 DNA-Extraktion

Die Gesamt-DNA aus den Lysaten und Filtern wurde mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert. Bei dieser Methode werden Zellen und Virenhüllen zunächst lysiert

und dann die DNA durch Zugabe von Ethanol gefällt. Die Reinigung der Nukleinsäure erfolgt mittels einer Säulen-Affinitätschromatographie. Bei diesem Verfahren binden unter speziellen Pufferbedingungen die Nukleinsäuren an den Silicaverbindungen der modifizierten Silikatoberfläche der Säule. Die Säule mit den daran gebundenen Nukleinsäuren wird zunächst mit mehreren Pufferlösungen gewaschen, die Elution der gebundenen Nukleinsäure geschieht durch Elutionspuffer oder Wasser. Die eluierte Nukleinsäure wird bei -20 °C gelagert.

4.3.1.1 Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll

Die DNA-Isolation erfolgte übereinstimmend mit dem Protokoll des Herstellers, wobei $400\text{ }\mu\text{L}$ Probenvolumen zur Isolierung eingesetzt wurden. Die Elution der DNA erfolgte in $80\text{ }\mu\text{L}$ Elutionspuffer.

- zu $400\text{ }\mu\text{L}$ Phagenlysat oder gelöstem Gelatinefilter $400\text{ }\mu\text{L}$ Lysispuffer und $40\text{ }\mu\text{L}$ Qiagen-Protease geben
- nach vorsichtigem Mischen mit der Pipette 15 min Inkubation bei 55 °C
- zur Probe $400\text{ }\mu\text{L}$ 99,6% Ethanol geben (zur DNA-Fällung)
- zwei Mal hintereinander ca. $640\text{ }\mu\text{L}$ der Probe auf die selbe QIAamp-Säule geben und zentrifugieren ($6.000 \times g$, 1 min), Durchfluss jeweils verwerfen
- $500\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer AW1 auf die Säule geben, zentrifugieren ($6.000 \times g$, 1 min), Durchfluss verwerfen
- $500\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer AW2 auf die Säule geben, zentrifugieren ($20.500 \times g$, 1 min), Durchfluss verwerfen
- Säule in ein neues Auffanggefäß setzen, zentrifugieren ($20.500 \times g$, 3 min)
- Säule in einem $1,5\text{ mL}$ Reaktionsgefäß platzieren
- zur Elution der DNA $80\text{ }\mu\text{L}$ Elutionspuffer (auf 55 bis 60 °C temperiert) auf die Säule geben, 5 min Inkubation bei RT, zentrifugieren bei $6.000 \times g$ für 1 min
- Säule verwerfen, Durchfluss (eluierte DNA) bei -20 °C lagern

4.3.2 RNA-Extraktion

Die Gesamt-RNA aus den Lysaten und Filtern wurde mit Hilfe des *QIAamp Viral RNA Kits* (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Reinigung der RNA erfolgt ebenfalls mittels einer Säulen-

Affinitätschromatographie. Nach zwei Waschschritten wird die RNA durch Zugabe von Elutionspuffer gelöst, die Lagerung erfolgt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2.1 Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll

Die Durchführung erfolgte übereinstimmend mit dem Protokoll des Herstellers für $140\text{ }\mu\text{L}$ Probenvolumen.

- zu $140\text{ }\mu\text{L}$ Lysat oder gelöstem Gelatinefilter $560\text{ }\mu\text{L}$ AVL-Carrier-RNA-Puffer geben
- Inkubation 10 min bei RT
- $560\text{ }\mu\text{L}$ 99,6 % Ethanol zugegeben (RNA-Fällung)
- zwei Mal hintereinander ca. $630\text{ }\mu\text{L}$ der Probe auf die selbe QIAamp Säule geben, zentrifugieren ($6.000 \times g$, 1 min), Durchfluss jeweils verwerfen
- $500\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer AW1 auf die Säule geben, zentrifugieren ($6.000 \times g$, 1 min), Durchfluss verwerfen
- $500\text{ }\mu\text{L}$ Waschpuffer AW2 auf die Säule geben, zentrifugieren ($20.500 \times g$, 1 min), Durchfluss verwerfen
- Säule in ein neues Auffanggefäß setzen, zentrifugieren ($20.500 \times g$, 3 min)
- Säule in einem $1,5\text{ mL}$ Reaktionsgefäß platzieren
- zur Elution der RNA $50\text{ }\mu\text{L}$ AVE-Elutionspuffer (auf RT inkubiert) auf die Säule geben, eine Minute bei RT inkubieren, zentrifugieren ($6.000 \times g$, 1 min)
- Säule verwerfen, Durchfluss (eluierte RNA) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

4.3.3 Plasmidisolierung aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden). Ihr liegt das Prinzip der alkalischen Zellyse zu Grunde (Birnboim & Doly, 1979).

4.3.3.1 Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll

- 10 mL einer ü. N.-Kultur ($\text{OD}_{600} = 2$) zentrifugieren ($17.900 \times g$, 5 min)
- Überstand abgießen, Pellet in $250\text{ }\mu\text{L}$ Puffer P1 (Lagerung bei 4°C) resuspendieren

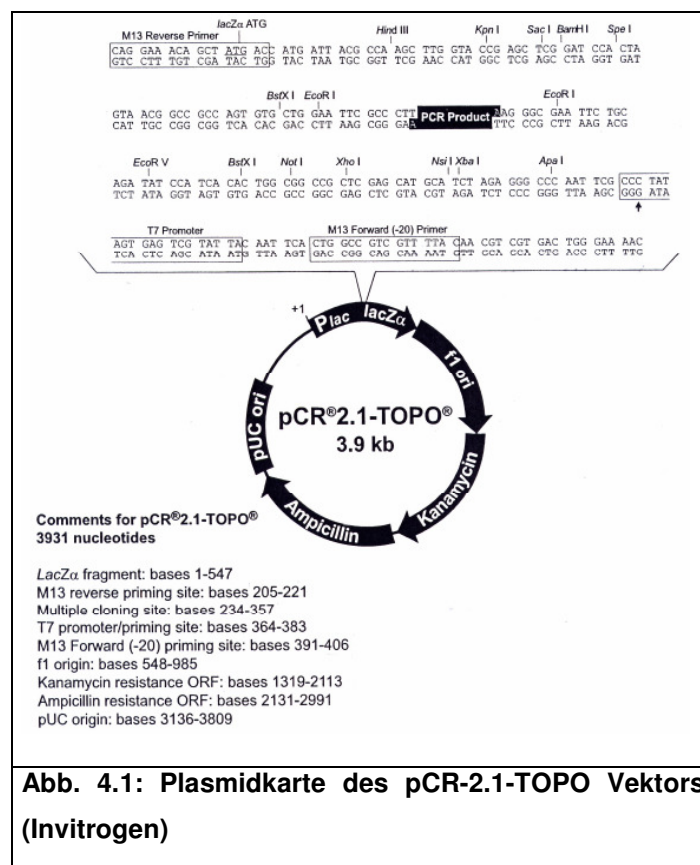
- 250 μL Puffer P2 dazugegeben, Reaktionsgefäß einige Male vorsichtig invertieren, bis Blaufärbung der Probe eintritt
- 350 μL Puffer N3 zugeben (zur Neutralisation), Reaktionsgefäß vorsichtig invertieren, bis Blauverfärbung verschwunden ist
- Probe zentrifugieren (20.500 x g , 10min)
- Überstand auf eine QIAprep Säule geben, zentrifugieren (6.000 x g , 1 min), Durchfluss verwerfen
- 500 μL Puffer PB auf die Säule geben, zentrifugieren (20.500 x g , 1 min), Durchfluss verwerfen
- 750 μL Puffer PE auf die Säule geben, zentrifugieren (20.500 x g , 1 min), Durchfluss verwerfen
- Säule in einen neues Auffanggefäß setzen, zentrifugieren (20.500 x g , 3 min)
- Säule in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß platzieren
- zur Elution der Plasmid-DNA 50 μL Puffer EB (RT) zugeben, 1 min bei RT inkubieren, zentrifugieren (6.000 x g , 1 min)
- Säule verwerfen, Durchfluss (eluierte Plasmid-DNA) bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern

4.4 Inserierung eines PCR-Produktes in den pCR-2.1-TOPO Vektor und Klonierung in *E. coli TOP 10 F'*

Zur Herstellung von Quantifizierungsstandards wurden PCR-Produkte von Phagen-DNA in den pCR-2.1-TOPO Vektor inseriert (Abb. 4.1, Invitrogen, Groningen, NL). Die Besonderheit dieses TOPO-Vektors ist eine mit dem offenen Vektor kovalent verknüpfte Topoisomerase, welche einen anderen DNA-Strang mit dem Vektor verbinden kann und dabei freigesetzt wird. Topoisomerasen dienen der Relaxation von DNA-Strängen, indem sie Phosphodiesterbindungen spalten und dabei eine kovalente Bindung mit der DNA ausbilden. Durch eine chemische Reaktion mit einer 5'-Hydroxylgruppe eines anderen freien DNA-Stranges wird die Topoisomerase vom Vektor freigesetzt, und verbindet die DNA-Stränge. Da die *Taq*-Polymerase eine templatespezifische terminale Transferaseaktivität besitzt, die ein einzelnes Didesoxyadenosin, den so genannten A-Überhang, an das 3' Ende des PCR-Produktes setzt, kann das PCR-Produkt effizient durch die Topoisomerase mit dem Vektor ligiert werden.

Der TOPO-Vektor codiert für Resistenzen gegen die Antibiotika Ampicillin und Kanamycin. Die Ligationsstelle hingegen liegt im Bereich des *LacZ α* -Gens auf dem Vektor. Ist der Vektor von den Bakterien erfolgreich aufgenommen, sind diese resistent gegen Ampicillin und Kanamycin und können auf ampicillin- oder kanamycinhaltigem Selektionsmedium wachsen

und Kolonien bilden. Ist das Selektionsmedium mit X-Gal (einem chemischen Analogon zu β -Galactose) versetzt, so wird X-Gal durch die β -Galactosidase, codiert durch das *LacZ*-Gen und vervollständigt durch $\alpha\omega$ -Komplementation, zu Galaktose und einem wasserunlöslichen Indoxyl hydrolysiert. Dieses Indoxyl oxidiert an der Luft zu einem Indigo-Farbstoff, wodurch eine Blauverfärbung der Kolonien auftritt. Wenn das PCR Produkt an der Ligationstelle in den Vektor inseriert wurde, ist das *LacZ α* -Gen unterbrochen. Somit kann das Substrat X-Gal nicht umgesetzt werden und die Zellen bleiben weiß.



4.4.1 Durchführung (nach dem Protokoll des Herstellers modifiziert)

- in 200 μ L PCR-Reaktionsgefäß 0,5 μ L TOPO-Vektor und 0,5 μ L Salzlösung (Invitrogen, Groningen, NL) geben, Tropfen sollten sich noch nicht mischen
- μ L des frischen PCR-Produktes dazugeben, vorsichtig mit Vektor und Salzlösung mischen
- Inkubation 60 min bei RT (zur Ligation)
- 25 μ L kompetente *E. coli* TOP 10F'-Zellen auf Eis auftauen, kompletten Ligationsansatz zu den Zellen geben

- Inkubation der Zellen 30 min auf Eis
- Hitzeschock im Wasserbad 30 s bei 42 °C
- Versetzen der Zellen mit 250 µL SOC Medium (RT), Inkubation für 60 min (bei Ampicillin 30 min) rotierend im Brutschrank bei 37 °C
- 50 µL Zellen auf einer Selektionsplatte (Kanamycin bzw. Ampicillin und X-Gal) ausplattieren
- 200 µL Zellen (Rest) zentrifugieren (20.500 x g, 1 min)
- 150 µL des Überstandes abnehmen, Bakterienpellet in den verbleibenden 50 µL Medium suspendieren
- Zellen auf einer weiteren Selektionsplatte ausplattieren
- Inkubation der Selektionsplatten ü. N. bei 37 °C

Am folgenden Tag sollten Kolonien gewachsen sein, von denen in der Regel solche mit einer weißen Färbung den Vektor mit dem korrekt inserierten PCR-Produkt oder einem Bruchstück aufgenommen haben sollten.

4.4.2 Überprüfung der erfolgreichen Klonierung durch M13-PCR

Die erfolgreiche Inserierung des Inserts in den TOPO-Vektor kann mittels einer PCR überprüft werden. Auf dem Vektor befinden sich je eine Bindestelle für den M13-Forward- und M13-Reverse-Primer. Diese Primerbindestellen sind auf dem Vektor so angeordnet, dass die Inserierungstelle umschlossen ist. In einer PCR mit M13-Primern erfolgt die Amplifikation der „Multiple Cloning Site“. Das Pipettierschema des Mastermixes ist in Tab. 4.1 dargestellt. Ohne inserierte DNA hat das entstehende PCR-Amplifikat eine Größe von 201 Basenpaaren. Bei erfolgreich in den Vektor inserierter DNA ist das entstehende Amplifikat um die entsprechende Länge des Inserts vergrößert. Die Größe des entstandenen Amplifikats wird mittels einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

4.4.2.1 Durchführung

Von einer inkubierten Selektionsplatte werden weiße Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher vorsichtig abgenommen und auf eine Sicherungsplatte mit ebenfalls X-Gal- und antibiotikahaltigem Medium gestrichen. Die Sicherungsplatte wird ü. N. bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Unmittelbar nach dem Ausstreichen wird die Spitze des Zahnstochers mit restlichen sich daran befindlichen Zellen in ein vorbereitetes, fertig nach Tab. 4.1 befülltes PCR-Reaktionsgefäß suspendiert.

Tab. 4.1: Pipettierschema für eine M13-PCR

Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		39,75 µL
React. Puffer (incl. MgCl ₂)	10x	5,00 µL
Primer M13-F	20 µM	0,50 µL
Primer M13-R	20 µM	0,50 µL
dNTPs (Incl. dUTP)	2,5 mM	4,00 µL
Hot Start <i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µL	0,25 µL
Summe		50,00 µL

Anschließend wird die PCR mit dem Temperaturprogramm aus Tabelle 4.2 gestartet.

Tab. 4.2: Temperaturprogramm einer M13-PCR

1x		40x			1x
Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation	
95 °C, 600 s	95 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 120 s	72 °C, 300 s	

Nach der PCR und gelelektrophoretischer Auftrennung des PCR Produktes parallel zu einem geeigneten Längenmarker (3.13) und nachfolgender EtBr-Gelfärbung kann im UV-Licht die Größe des entstandenen Amplifikats abgeschätzt werden.

Ein erfolgreich transformierter Klon wird von der Sicherungsplatte in antibiotikahaltiges Medium überführt und auf dem Schüttler bei 37 °C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wird die Kultur abzentrifugiert (17.900 x *g*, 5 min). Das Bakterienpellet kann zur Plasmidisolierung (4.3.3) eingesetzt werden.

4.4.3 Herstellung von PCR-Standards mit definierter Kopienzahl

4.4.3.1 DNA-Standards von Lambda, M 13 und Phi X174

Aus einem positiven Klon werden nach 4.3.3 Plasmide isoliert. Anschließend werden je zweimal 2 µL einer Plasmidprobe zu 98 µL H₂O gegeben. DNA besitzt aufgrund der aromatischen Ringe der Basen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm (Watson *et al.*, 2004). In einem Bereich der optischen Dichte von 0,1 bis 1,0 errechnet die

Software des Spektralphotometers aus den 1 : 50 Verdünnungen der Plasmidproben die Konzentrationen an DNA in ng/μL als Doppelbestimmung. Aus den erhaltenen Konzentrationen wird der Mittelwert zur Berechnung der Kopienzahl verwendet.

Das Molekulargewicht von Nukleinsäuren in g/mol wird mit Hilfe folgender Formeln berechnet:

Formel 4.1: Molekulargewicht ssRNA = (Länge in Nukleotiden * 320,5) + 159,0

Formel 4.2: Molekulargewicht dsDNA = (Länge in Nukleotiden * 607,4) + 157,9

Da die Länge des TOPO-Vektors mit dem inserierten PCR-Produkt bekannt ist, kann das Molekulargewicht nach Formel 4.2 berechnet werden. Ist das Molekulargewicht berechnet, kann aus der mit dem Photometer bestimmten Konzentration die Anzahl der Plasmide pro mL unter Verwendung der Avogadrozahl ermittelt werden.

Formel 4.3: $x \text{ ng}/\mu\text{L} = x * 10^{-7} \text{ g}/\mu\text{L} = x * 10^{-4} \text{ g/mL}$

4.4.3.2 RNA-Standards von MS2

RNA-Standards von MS2 wurden aus kommerziell erworbener RNA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) mit bekannter Konzentration verdünnt. Da die Größe des MS2 Genoms bekannt ist, erfolgt die Berechnung des Molekulargewichtes nach Formel 4.1.

4.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Negativ geladene DNA-Fragmente lassen sich in einer Gelmatrix aus Agarose im elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend auftrennen. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente von ihrer Größe und Eigenladung ab. Die Dichte der Gelmatrix wird durch die Agarosekonzentration bestimmt. Im Allgemeinen werden Agarosekonzentrationen zwischen 0,8 % und 3 % Agarose verwendet, wobei Gele mit niedriger Agarosekonzentration für große Fragmente und Gele mit höherer Agarosekonzentration für kleinere Fragmente benutzt werden. Mit steigender Konzentration steigt das Auftrennungsvermögen. Die Detektion der DNA geschieht mittels Ethidiumbromid (EtBr) – Färbung. EtBr interkaliert zwischen den Basen der Nukleinsäuren im Doppelstrang

und erzeugt auf einem UV-Transiluminator eine Fluoreszenz im sichtbaren Bereich. Diese Fluoreszenz kann mit einer Kamera aufgenommen werden.

4.5.1 Herstellung eines Agarosegels

Es wurden einprozentige Agarosegele für Fragmentlängen von etwa 2100 bp bis 1100 bp sowie zweieinhalbprozentige Agarosegele für Längen ab 1050 bp abwärts verwendet. Für ein einprozentiges Gel werden 10 g/L Agarose (bei zweieinhalbprozentigen Gelen 25 g/L) durch Aufkochen in 0,5 % TBE-Puffer gelöst. Pro 100 mL flüssiger Agaroselösung werden 4 µL einer EtBr-Stammlösung (37,5 mg/L EtBr) dazugegeben. Nach vorsichtigem Mischen durch Schwenken des Becherglases wird das Gel in die Gelkammern gegossen. Gelkämme zur Erzeugung von Taschen im Gel werden in den Halterungen der Gelkammern platziert und nach Polymerisation der Gele vorsichtig entfernt.

Zur Elektrophorese wird ein Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 0,5 % TBE-Puffer überschichtet. Es werden 10 µL Probe mit 2 µL Auftragspuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Nach Schließen der Kontakte durch Auflegen des Deckels erfolgt die elektrophoretische Auftrennung bei 100 V und 60 mA. Die Auftrennungsdauer wurde mit 0,7 h bei einprozentigen Gelen und 0,9 h bei zweieinhalbprozentigen Gelen variiert.

4.5.2 Größenbestimmung von DNA-Fragmenten

Um die Länge von DNA-Fragmenten in Basenpaaren zu ermitteln, wird parallel zur Probe bei der Agarose-Gelelektrophorese ein DNA-Längenstandard (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) mit aufgetragen. Der DNA-Längenstandard besteht aus DNA-Fragmenten mit bekannter Größe. Anhand des Bandenmusters lässt sich die Größe der Probenfragmente näherungsweise bestimmen (Abb. 3.1).

4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.6.1 Primersysteme

In allen PCRs wurden die Primer (Tab. 3.1) so kombiniert, damit verschieden lange Abschnitte der Phagengenome zu amplifizieren. In Abb. 4.2 sind exemplarisch die Primer und Amplifikate von MS2 mit der entsprechenden Längen und ihrer Lage auf dem

Phagengenom schematisch dargestellt. Die Kombination verschiedener Primer ergab Primersysteme, deren Bezeichnungen in Tab. 4.3 aufgeführt sind.

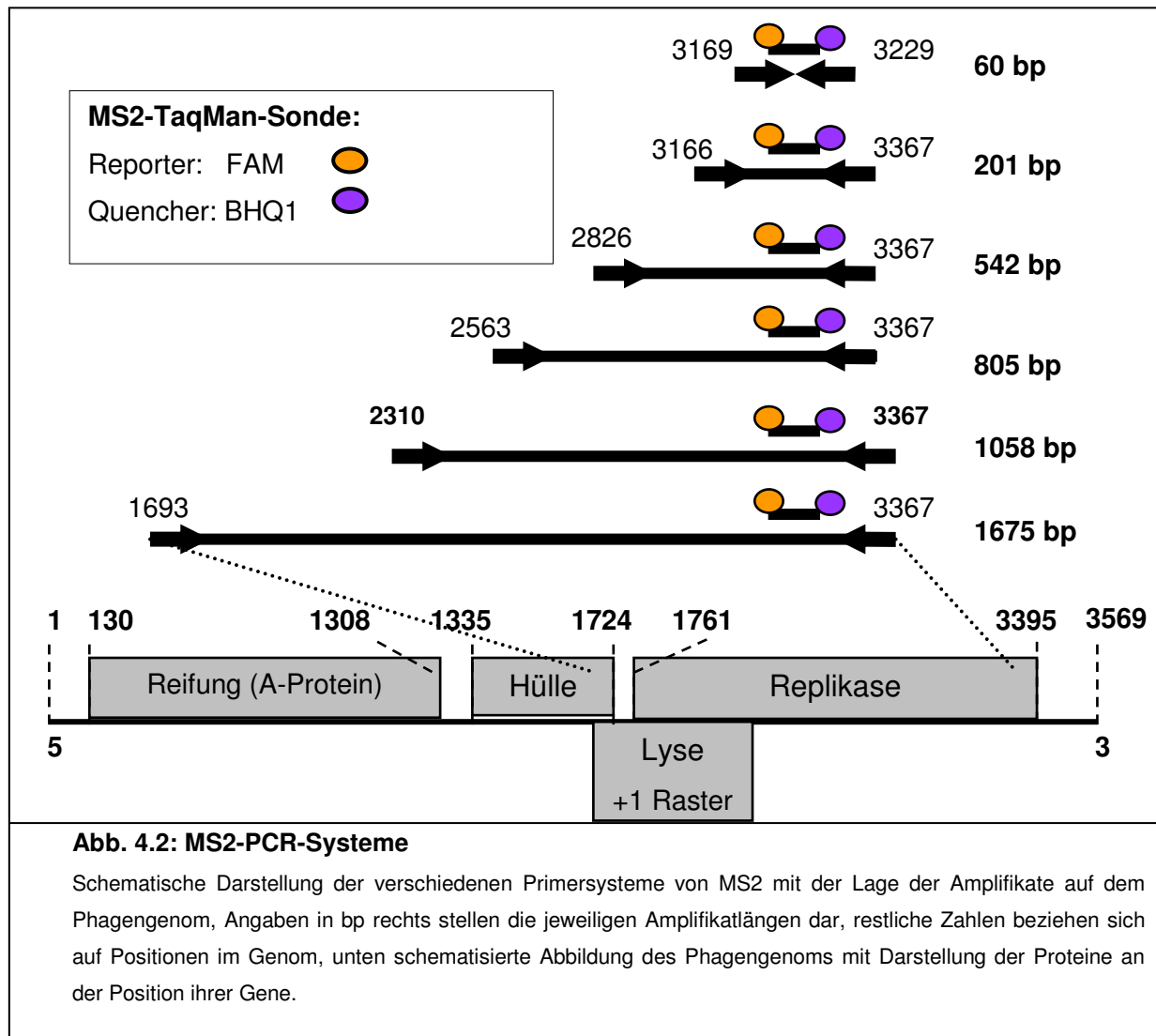


Abb. 4.2: MS2-PCR-Systeme

Schematische Darstellung der verschiedenen Primersysteme von MS2 mit der Lage der Amplifikate auf dem Phagengenom, Angaben in bp rechts stellen die jeweiligen Amplifikatlängen dar, restliche Zahlen beziehen sich auf Positionen im Genom, unten schematisierte Abbildung des Phagengenoms mit Darstellung der Proteine an der Position ihrer Gene.

Tab. 4.3: PCR-Primersysteme				
Phage	Forward Primer	Reverse Primer	Amplifikatlänge	Primersystem
MS2	MS2-TM2-F	MS2-TM2-R	60 bp	MS2-A
	MS2-TM3-F	MS2-TM3-R	201 bp	MS2-B
	MS2-2826-F	MS2-TM3-R	542 bp	MS2-C
	MS2-2563-F	MS2-TM3-R	805 bp	MS2-D
	MS2-2310-F	MS2-TM3-R	1058 bp	MS2-E
	MS2-1693-F	MS2-TM3-R	1675 bp	MS2-F
Phi X174	PhiX-2135-F	PhiX -2220-R	85 bp	ΦX-A
	PhiX-1819-F	PhiX -2220-R	402 bp	ΦX-B
	PhiX-1628-F	PhiX -2220-R	593 bp	ΦX-C
	PhiX-1171-F	PhiX -2220-R	1050 bp	ΦX-D
	PhiX-688-F	PhiX -2220-R	1533 bp	ΦX-E
Lambda	Lambda-F	Lambda-R	277 bp	Λ-A
	Lambda-1615-F	Lambda-R	877 bp	Λ-B
	Lambda-1415-F	Lambda-R	1077 bp	Λ-C
	Lambda-830-F	Lambda-R	1677 bp	Λ-D
	Lambda-487-F	Lambda-R	2005 bp	Λ-E
M13	M13-1414-F	M13-1530-R	116 bp	M13-A
	M13-1414-F	M13-2411-R	1017 bp	M13-B
	M13-1414-F	M13-2879-R	1486 bp	M13-C
Phi6	Phi6-2831-F	Phi6-2910-R	79 bp	Φ6
Phi13	Phi13-4825-F	Phi13-4935-R	110 bp	Φ13

4.6.2 PCR im Block-Thermocycler

Für konventionelle PCRs wurden entweder der Personal Cycler (Eppendorf AG, Hamburg) oder der Gradient Cycler (Biometra GmbH, Göttingen) verwendet. Diese Geräte bestehen aus einem Metallblock mit Vertiefungen für 200 µL PCR-Reaktionsgefäße (25 Vertiefungen im Personal Cycler, 96 im Gradient Cycler), einer Heiz- und Kühlvorrichtung für den Metallblock und einer Deckelheizung, welche bei allen PCRs auf 105 °C temperiert wurde,

um Kondensatbildung im Deckel des Reaktionsgefäßes zu verhindern. Im Gradient Cycler besteht weiterhin die Möglichkeit, den Metallblock in einen Temperaturgradienten einzuteilen, so dass zum Beispiel die optimale Annealingtemperatur eines Primers ermittelt werden kann.

Die PCR im Block-Thermocycler wurde zur Erzeugung von Produkten zur TOPO-Klonierung und zum Einsatz als Quantifizierungsstandards sowie zum Testen von Primern und deren optimalen Annealingtemperaturen verwendet. Im Anschluss wird zur Kontrolle der Amplifikation eine elektrophoretische Trennung in einem Agarosegel durchgeführt.

Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		27,75 µL
React. Puffer (incl. 25mM MgSO ₄)	10x	5,00 µL
Forward Primer	20 µM	1,50 µL
Reverse Primer	20 µM	1,50 µL
dNTPs (incl. dUTP)	2,5 mM	4,00 µL
Hot Start <i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µL	0,25 µL
DNA-Template		10,00 µL
Summe		50,00 µL

Die PCR-Reagenzien werden erst kurz vor Pipettierbeginn aufgetaut. Entsprechend der Anzahl der Proben wird nach Tabelle 4.4 ein Prämix hergestellt, welcher alle nötigen Komponenten mit Ausnahme der Proben-DNA enthält. Das Durchmischen des Prämixes erfolgt durch Auf- und Abpipettieren. In die entsprechende Anzahl vorgelegter Reaktionsgefäße werden je 40 µL des Prämixes gegeben, anschließend werden die Reaktionsgefäße mit 10 µL einer Probennukleinsäure versetzt.

1x		40x			1x
Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Terminale Elongation	
95 °C, 600 s	95 °C, 30 s	55 °C, 30 s	72 °C, 120 s	72 °C, 300 s	

4.6.3 Amplifikation in der Real-Time PCR am Rotor-Gene

Bei der Amplifikation in der Real-Time PCR wird die exponentielle Zunahme der PCR-Produkte durch Messung der Fluoreszenz „online“ verfolgt. In den PCR-Reaktionen dieser

Arbeit wurden ausschließlich TaqMan-Sonden eingesetzt. Die Real-Time PCRs erfolgten am RotorGene RG 3000 (Corbett Research, Sydney, AUS) und am LightCycler 1.2 sowie 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim).

Der Rotor-Gene und der LightCycler bestehen aus einer Reaktionskammer, in welcher sich ein Rotor für 36 Proben, eine Heiz- bzw. Kühlvorrichtung sowie einen Fluorimeter befinden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt am Ende des Amplifikationszyklus, wenn die maximale Freisetzung des Donor-Fluorophors stattgefunden hat. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt je nach System entweder durch eine lichtemittierende Diode (LED). Das Fluoreszenzsignal wird zum Computer übermittelt.

Die PCR-Reagenzien werden ebenfalls wie bei einer PCR am Block-Thermocycler erst kurz vor Pipettierbeginn aufgetaut. Entsprechend der Anzahl der Proben wird je nach der Tabelle 4.6, 4.7, 4.8 oder 4.9 ein Prämix hergestellt, welcher alle nötigen Komponenten mit Ausnahme der Proben-Nukleinsäure enthält. Das Durchmischen des Prämixes erfolgt durch Auf- und Abpipettieren. In einem speziellen Metallkühlblock (Corbett Research, auf 4 °C temperiert) werden entsprechend der Anzahl der geplanten Reaktionen 200 µL PCR-Reaktionsgefäße gesetzt und beschriftet. Anschließend werden in jedes Reaktionsgefäß 40 µL des Prämixes pipettiert. Nachdem der Prämix in jedem Reaktionsgefäß vorgelegt ist, werden je 10 µL der Proben-DNA in den Prämix gegeben.

4.6.3.1 Standardprotokolle für Real-Time PCR Reaktionen am Rotor-Gene:

Tab. 4.6: Standardprotokoll für eine PCR am Rotor-Gene ohne interne Kontrollreaktion		
Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		26,75 µL
React. Puffer (incl. 25 mM MgCl ₂)	10x	5,00 µL
Forward Primer	20 µM	1,50 µL
Reverse Primer	20 µM	1,50 µL
Sonde	20 µM	0,50 µL
dNTPs (Incl. dUTP)	2,5 mM	4,00 µL
UNG	1 U/µL	0,50 µL
Hot Start <i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µL	0,25 µL
DNA-Template		10,00 µL
Summe		50,00 µL

Bei Negativkontrollen werden anstelle des DNA-Templates 10 μL H_2O in den Prämix gegeben. Zusätzlich wurde aus dem eingesetzten Wasser und dem SM-Puffer parallel zu den eigentlichen Proben Nukleinsäure extrahiert, und diese ebenfalls als negative Kontrollen bei der PCR eingesetzt.

Bei kurzen PCR-Produkten (kleiner als 116 bp) wird die Hauptreaktion mit einer internen Kontrollreaktion (IC) versehen. Die IC wird in eine PCR gegeben, um mögliche Inhibitoren der PCR zu erkennen. So können eventuelle Inhibierungen der Polymerase ausgeschlossen werden und eine negative spezifische Nachweisreaktion eindeutig auf einen Mangel an Zielnukleinsäure zurückzuführen sein.

Bei der IC handelt es sich um Primer und Sonde für das humane $\beta 2$ -Mikroglobulin Gen (Watzinger *et al.*, 2004). Um eine größere Menge hDNA zu erhalten, wurden mehrere DNA-Aliquots gepoolt. In den PCR-Reaktionen wurde die hDNA in Konzentrationen eingesetzt, in denen der ct-Wert der IC zwischen dem 30 und dem 35 PCR-Zyklus lag. Die Sonde der internen Kontrolle ist mit dem JOE-Farbstoff markiert, die Sonde der spezifischen Nachweisreaktion (Phagen-DNA) ist mit FAM markiert.

Tab. 4.7: Standardprotokoll für eine PCR am Rotor-Gene mit interner Kontrolle

Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H_2O		22,50 μL
React. Puffer (incl. 25 mM MgCl_2)	10x	5,00 μL
Forward Primer	20 μM	1,50 μL
Reverse Primer	20 μM	1,50 μL
Sonde	20 μM	0,50 μL
Forward Primer (IC)	20 μM	0,50 μL
Reverse Primer (IC)	20 μM	0,50 μL
Sonde (IC)	20 μM	0,25 μL
hDNA		3,00 μL
dNTPs (Incl. dUTP)	2,5 mM	4,00 μL
UNG	1 U/ μL	0,50 μL
Hot Start <i>Taq</i> -Polymerase	5 U/ μL	0,25 μL
DNA-Template		10,00 μL
Summe		50,00 μL

Tab. 4.8: Standardprotokoll für eine RT-PCR am Rotor-Gene

Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		5,25 µL
2x Rxn-Reaction Mix (incl. 50 mM MgSO ₄)	2 x 6 mM	12,50 µL
Forward Primer	20 µM	0,75 µL
Reverse Primer	20 µM	0,75 µL
Sonde	20 µM	0,25 µL
Superscript III / Platinum <i>Taq</i> Enzymmix	5 U/µL	0,50 µL
RNA-Template		5,00 µL
Summe		25,00 µL

Tab. 4.9: Standardprotokoll für eine RT-PCR am Rotor-Gene mit interner Kontrollreaktion

Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		3,13 µL
2x Rxn-Reaction Mix (Incl. 50 mM MgSO ₄)	2 x 6 mM	12,50 µL
Forward Primer	20 µM	0,75 µL
Reverse Primer	20 µM	0,75 µL
Sonde	20 µM	0,25 µL
Forward Primer (IC)	20 µM	0,25 µL
Reverse Primer (IC)	20 µM	0,25 µL
Sonde (IC)	20 µM	0,13 µL
hDNA		1,50 µL
Superscript III / Platinum <i>Taq</i> Enzymmix	5 U/µL	0,50 µL
RNA-Template		5,00 µL
Summe		25,01 µL

Die RT-PCRs wurden wie bei DNA-Templates nur bei kurzen Amplifikaten von unter 100 bp mit einer internen Kontrollreaktion versetzt.

4.6.3.2 Temperaturprogramme der Real-Time PCR am Rotor-Gene für unterschiedliche Primersysteme (s. Tab. 4.3):

Tab. 4.10: Temperaturprogramm des Primersystems Φ X-A

1x	1x	50x		1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	63 °C, 45 s	37 °C, 15 s

Tab. 4.11: Temperaturprogramm der Primersysteme Φ X-B und Φ X-C

1x	1x	50x		1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	63 °C, 90 s	37 °C, 15 s

Tab. 4.12: Temperaturprogramm der Primersysteme Φ X-D und Φ X-E

1x	1x	50x			1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 30 s	63 °C, 30 s	72 °C, 80 s	37 °C, 15 s

Tab. 4.13: Temperaturprogramm des Primersystems MS2-A

1x	1x	50x		1x
Reverse Transkription	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
50 °C, 900 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	60 °C, 45 s	37 °C, 30 s

Tab. 4.14: Temperaturprogramm der Primersysteme MS2-B, MS2-C und MS2-D

1x	1x	50x		1x
Reverse Transkription	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
50 °C, 900 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	60 °C, 90 s	37 °C, 30 s

Tab. 4.15: Temperaturprogramm des Primersystems MS2- E

1x	1x	50x			1x
Reverse Transkription	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Kühlen
50 °C, 900 s	95 °C, 600 s	95 °C, 30 s	60 °C, 30 s	72 °C, 80 s	37 °C, 15 s

Tab. 4.16: Temperaturprogramm des Primersystems MS2- F

1x	1x	50x			1x
Reverse Transkription	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Kühlen
50 °C, 900 s	95 °C, 600 s	95 °C, 30 s	60 °C, 30 s	72 °C, 110s	37 °C, 30 s

Tab. 4.17: Temperaturprogramm des Primersystems Δ -A

1x	1x	50x		1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	60 °C, 90 s	37 °C, 15 s

Tab. 4.18: Temperaturprogramm der Primersysteme Δ -B und Δ -C

1x	1x	50x		1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	60 °C, 100 s	37 °C, 30 s

Tab. 4.19: Temperaturprogramm der Primersysteme Δ -D und Δ -E

1x	1x	50x			1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 30 s	60 °C, 30 s	72 °C, 110s	37 °C, 30 s

Tab. 4.20: Temperaturprogramm des Primersystems M13-A

1x	1x	50x		1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	60 °C, 55 s	37 °C, 15 s

Tab. 4.21: Temperaturprogramm des Primersystems M13-B

1x	1x	50x		1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
37 °C, 300 s	95 °C, 600 s	95 °C, 15 s	60 °C, 100 s	37 °C, 30 s

4.6.3.3 Absolute Quantifizierung der Kopienzahl mittels Real-Time PCR

Da in den PCRs nicht direkt die Ursprungslösungen wie gelöste Filter oder Lysate eingesetzt werden, sondern daraus isolierte Nukleinsäuren, muss das bei der Nukleinsäureisolation eingesetzte Probenvolumen mit berücksichtigt werden, um Aussagen über die Anzahl an Kopien pro mL Ursprungslösung treffen zu können. Außerdem können nur so die Standards mit einer definierten Anzahl an Kopien pro mL direkt mit den Proben verglichen werden.

Bei DNA wurden die von der Rotor-Gene Analysis Software errechneten Werte für die Kopienzahlen nach Formel 4.4 umgerechnet, um von der Menge an in der PCR eingesetzten Kopien auf die ursprünglichen Zahlen schließen zu können.

Formel 4.4: $(\text{DNA-Kopien pro PCR} / 100) * 8 * 2,5 = \text{DNA-Kopien pro mL Ursprungslösung}$

Bei RNA von MS2 wurde für eine PCR nach Tab. 4.8 folgende Formel benutzt:

Formel 4.5: $(\text{RNA-Kopien pro PCR} / 200) * 5 * 7,14 = \text{RNA-Kopien pro mL Ursprungslösung}$

4.6.4 Amplifikation in der Real-Time PCR am LightCycler

Die Real-Time PCR am LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim) funktioniert von ihrem Prinzip her ähnlich der Real-Time PCR am Rotor-Gene. Im Unterschied zum Rotor-Gene werden im LightCycler statt PCR-Reaktionsgefäßen Glaskapillaren mit einem maximalen Fassungsvermögen von 20 µL eingesetzt. Diese bieten den Vorteil einer höheren Wärmeleitfähigkeit und eines günstigen Volumen-Oberflächenverhältnisses. Aufgrund der besseren Wärmeleitfähigkeit und schnellerer Heiz- und Kühlraten des Gerätes läuft eine Real-Time PCR am LightCycler schneller als am Rotor-Gene ab.

Entsprechend der Anzahl der Einzelreaktionen werden LightCycler Glaskapillaren vorsichtig in dazugehörige LightCycler Kühlblock-Zentrifugenadapter gesteckt und je 15 µL Prämix in die Kapillaren pipettiert. Im FastStart DNA Master PLUS HP Mix (Roche Diagnostics, Mannheim) sind bereits DNA-Polymerase und dNTPs incl. dUTP enthalten. Danach werden je 5 µL Nukleinsäure-Template in die Kapillaren gegeben. Nach Verschließen der Kapillaren werden diese vorsichtig bei 1.000 x g für eine Minute in den Kühlblock-Zentrifugenadaptern zentrifugiert, so dass Prämix und Template die Kapillare ohne Luftblasen vollständig füllen. Die Glaskapillaren werden direkt in das Probenkarussell des LightCyclers gesetzt, der Deckel des Gerätes geschlossen und das entsprechende Programm gestartet.

In den Tab. 4.22 bis 4.25 sind die Protokolle und PCR-Programme für den LightCycler aufgelistet.

Tab. 4.22: Standardprotokoll für eine PCR am LightCycler ohne interne Kontrollreaktion		
Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		9,80 µL
FastStart DNA Master PLUS HP	5x	4,00 µL
Forward Primer	20 µM	0,40 µL
Reverse Primer	20 µM	0,40 µL
Sonde	20 µM	0,20 µL
UNG	1 U/µL	0,20 µL
DNA-Template		5,00 µL
Summe		20,00 µL

Tab. 4.23: Temperaturprogramm am Light-Cycler der Primersysteme ΦX-A, M13-A und Δ-A				
1x	1x	45x		1x
UNG	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
37 °C, 600 s	95 °C, 600 s	95 °C, 2 s	60 °C, 45 s	40 °C, 30 s

Tab. 4.24: Standardprotokoll für eine RT-PCR am LightCycler ohne interne Kontrollreaktion		
Reagenz	Konzentration	1x Vol.
H ₂ O		3,05 µL
React. Puffer (incl. 6mM MgCl ₂)	2x	10,00 µL
BSA	20 µg/µL	0,50 µL
Forward Primer	20 µM	0,40 µL
Reverse Primer	20 µM	0,30 µL
Sonde	20 µM	0,15 µL
Superscript III / Platinum Taq Enzymmix	5 U/µL	0,60 µL
RNA-Template		5,00 µL
Summe		20,00 µL

Tab. 4.25: Temperaturprogramm am LightCycler der Primersysteme Φ6 und Φ13				
1x	1x	45x		1x
Reverse Transkription	Denaturierung	Denaturierung	Annealing / Elongation	Kühlen
50 °C, 60 s; 48 °C, 900 s	95 °C, 120 s	95 °C, 2 s	60 °C, 45 s	40 °C, 30 s

4.7 DNA-Sequenzierung

4.7.1 Aufreinigung von PCR-Produkten mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen)

Zum Mechanismus der Aufreinigung von DNA unter Anwesenheit chaotroper Salze über Silicamembranen gibt es zwei Modelle. Zum einen könnten chaotrope Salze, welche die Hydrathülle der DNA destabilisieren, die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen der Silicaoberfläche der Membran und dem Phosphatrückrat der DNA ermöglichen. Zum anderen könnten positiv geladene Ionen chaotroper Salze die negativ geladenen Sauerstoffatome auf der Silicaoberfläche absättigen und so Kationen-Brücken zum Phosphatrückrat der DNA ausbilden, so dass die DNA-Fragmente an die Silicaoberfläche reversibel binden (Thiemann *et al.*, 2006). Die Adsorption an die Säule ist ebenfalls pH-Wert abhängig. Bei einem pH von $\leq 7,5$ beträgt die Adsorption der DNA an die Silicaoberfläche 95 %. Nach Waschvorgängen werden die Amplifikate mit Tris-Puffer oder Wasser eluiert.

4.7.1.1 Durchführung nach dem Qiagen-Protokoll:

- zu einem Volumenteil PCR-Produkt 5 Volumenteile PB-Puffer geben, vermischen
- QIAquick-Säule in 2 mL Auffanggefäß platzieren, Gemisch mittig auf die Säule geben
- zentrifugieren (6.000 x *g*, 1 min), Durchfluss verwerfen
- Säule mit 750 μ L PE-Puffer überschichten, zentrifugieren (20.500 x *g*, 1 min), Durchfluss verwerfen
- Säule zur absoluten Trocknung zentrifugieren (20.500 x *g*, 2 min)
- Säule in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß platzieren, 35 μ L EB-Puffer zugeben, Inkubation 5 min bei RT
- Säule zentrifugieren (6.000 x *g*, 1 min)
- Säule verwerfen, Durchfluss (gereinigtes PCR-Produkt) bei 4 °C lagern

4.7.2 DNA-Sequenzierung (Cycle Sequencing)

Die DNA-Sequenzierung basiert auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Bei der Methode des Cycle Sequencing wird die doppelsträngige DNA mit Hilfe eines spezifische Primers und eines Gemisches von dNTPs und Didesoxynukleotid-

Derivaten (ddNTPs) sequenziert. An jedes Didesoxynukleotid sind für die jeweilige Base spezifische Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt. Wird bei der Elongation durch die *Taq*-Polymerase ein ddNTP eingebaut, so bewirkt dies einen Kettenabbruch, weil die DNA aufgrund der fehlenden Hydroxylgruppe am 3' C-Atom der Didesoxyribose nicht mehr verlängert werden kann.

4.7.2.1 Sequenzierungsansatz mit dem „BigDye Terminator Kit“

Entsprechend nach Tabelle 4.26 wird für jede Probe ein Sequenzierungsansatz hergestellt und die PCR mit dem Temperaturprogramm (Tab. 4.27) im Block-Thermocycler durchgeführt.

Tab. 4.26: Standard-Sequenzierungsansatz			
Reagenz		1x Vol.	
BigDye v1.1 Prämix		4,00 µL	
BigDye Sequenzierpuffer (5x)		2,00 µL	
Primer (2 µM)		1,50 µL	
H ₂ O		7,50 µL	
Aufgereinigtes PCR-Produkt		5,00 µL	
Summe		20,00 µL	
Tab. 4.27: Temperaturprogramm des Sequenzierungsansatzes			
1x		30x	
Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation
95 °C, 120 s	95 °C, 10 s	55 °C, 5 s	60 °C, 240 s

4.7.3 Aufreinigung der Sequenzierreaktion über Sephadex-Säulen

In einer Sephadexmatrix können nach dem Prinzip der Gelfiltration Salze, einzelne Nukleotide und Farbstoffe zurückgehalten werden. Das beruht auf einer Durchlässigkeit der Sephadexkügelchen für Moleküle unterhalb einer bestimmten Größe. Kleine Moleküle passieren die Sephadexkügelchen und werden länger in der Matrix zurückgehalten als größere Moleküle, welche die Kügelchen umgehen. Die Porosität der Sephadex-Säule ist zum einen von der molaren Masse des verwendeten Dextrans und zum anderen von der Einführung Glycerylether-Einheiten, die die Hydroxygruppen der Kohlenhydratketten vernetzen, abhängig (Voet *et al.*, 1992).

4.7.3.1 Durchführung:

- eine Receiver Column (Macherey & Nagel, Düren) in einem 2 mL Auffanggefäß platzieren
- auf die Säule 800 µL Sephadex G-50-Suspension geben, zentrifugieren (1.000 x g, 3 min), Durchfluss verwerfen
- Säule zur Aufreinigung einer Sequenzierreaktion in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß setzen, Sequenzieransatz (20 µL) mittig auf die gepackte Sephadex-Säule geben
- zentrifugieren (1.000 x g, 4 min), Säule verwerfen, Durchfluss ist der aufgereinigte Sequenzieransatz

Der aufgereinigte Sequenzieransatz wird in 500 µL Reaktionsgefäße pipettiert und mit 20 µL H₂O vermischt. Eine Denaturierung zur Sicherstellung der kompletten Trennung der Stränge erfolgt bei 95 °C für 2 min im Block-Thermocycler oder im Heizblock.

4.7.4 Analyse der DNA-Sequenzierungsprodukte mittels Kapillarelektrophorese

Die Sequenzierprodukte werden am Kapillarsequenzier ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgetrennt und fluorimetrisch detektiert. Dabei können Einstellungen wie das Probenvolumen, die Laufzeit und die Injektionsspannung sowie die Injektionsdauer variiert werden. Die Injektionsdauer hängt von der Ausbeute an Amplifikaten ab.

Tab. 4.28: Standardeinstellungen der Kapillarelektrophorese zur Analyse von Sequenzierprodukten						
Modul	Matrix	Injektion		Elektrophorese		
		Zeit	Spannung	Zeit	Spannung	Temperatur
Seq POP6 Rapid	E	30 s	6 kV	35 min	15 kV	50 °C

In Tab. 4.28 sind die Standardeinstellungen für den Kapillarsequenzier gezeigt. Die von der ABI Prism 310 Collection Software (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer Software, Applied Biosystems, Darmstadt) ermittelte DNA-Sequenz wird in einem Fluoreszenzkurvendiagramm dargestellt.

4.8 Überprüfung des Rückhaltevermögens von F5- und F7-Filtern und Inaktivierungsexperimente mit Steritube UVC-Modulen

Zur Überprüfung des Rückhaltevermögens von F5- und F7-Filtern wurde eine standardisierte RLT-Anlage über eine Länge von 6 m mit einem Kanalquerschnitt 400 mm x 700 mm aufgebaut, die mit kommerziell erhältlichen Taschenfilterelementen ausgerüstet wurde. Neben den beiden Filterstufen waren ein Kühlelement sowie die Ventilorkammer und ein UVC-Modul mit Lichtfallen integriert. Die beaufschlagten Luftvolumina wurden entsprechend der Filterherstellerangaben über eine variable Ventilatorsteuerung eingestellt ($2000 \text{ m}^3 / \text{h}$). 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 Aerosolpartikel lag bei $3,8 \mu\text{m}$. 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.

Die Inaktivierungsexperimente wurden mit Steritube UVC-Modulen (TUV, UVC 2 x 95 W, Philips) der Firma Virobuster Technology, Niederlande durchgeführt, wobei die UVC-Strahler separat zuschaltbar waren. Jedes Modul hat eine Durchflusskapazität von maximal $400 \text{ m}^3/\text{h}$ und lässt sich in beliebiger Anzahl über einfache Steckverbindungen mit Adapteranschlüssen in RLT Anlagen integrieren.

4.9 Methode zur Analyse feliner Caliciviren

4.9.1 Zellanzucht

Es wurden ca. $5,0 \times 10^6$ CrFK-Zellen mit 20 mL Anzuchtmedium in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche unter sterilen Bedingungen ausgebracht. Dieser Ansatz wurde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 bebrütet. Nach 24 h war der Zellmonolayer auf Anhaftung und Wachstum unter dem Inversmikroskop zu kontrollieren. Nach 48 h wurde nach erneuter visueller Kontrolle der konfluente Zellrasen mittels Trypsinierung abgelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert und konnten in einer Umsatzrate von 1 : 4 bis 1 : 6 in neue Zellkulturflaschen überführt werden.

4.9.2 Viruspropagation

Zur Viruspropagation wurde wie unter „Zellanzucht“ beschrieben die Wirtszelle CrFK angezüchtet. Ein zu ca. 50 bis 70 % konfluenten Monolayer wurde mit Felinen Caliciviren beimpft. Zuvor wurde das Medium über den Zellen abgesaugt und FCV mit PBS versetzt auf den Monolayer gegeben, so dass dieser bedeckt war und nicht durch Austrocknung geschädigt werden konnte. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C für 90 min. Nach 45 min Inkubation war die Flasche leicht zu schwenken. Der Überstand mit den nicht angehafteten Viren wurde abgezogen und verworfen. Die Zellen wurden mit dem Maintenance-Medium (reduzierte FKS-Anteil) überschichtet. Es folgte eine erneute Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂. Nach 24 bis 48 h hatten sich die FCV ausreichend vermehrt. Die CrFK-Zellen wurden durch einen 2-fachen Gefrier-Tau-Prozess vollständig abgelöst und zerstört, so dass die Viren auch aus dem Zellinneren freigesetzt wurden. Die Zellfragmente wurden mit (450 x g, 5 min) abzentrifugiert. Die Viren befanden sich im Überstand. Der FCV-Titer wurde mittels Plaque-Assay bestimmt.

4.9.3 Durchführung der Titerbestimmung (Plaque Assay)

Die Titerbestimmung wurde nach Bidawid *et al.*, 2003 durchgeführt. Ca. $4,0 \times 10^5$ CrFK-Zellen wurden pro Kavität in 6-well Platten ausgesät. Jede Kavität wurde mit 4 mL Anzuchtmedium überschichtet. Die Platten wurden bei 37 °C und 5% CO₂ für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Zellrasen visuell unter dem Inversmikroskop kontrolliert. Der Zellrasen sollte zu 50 bis 70% konfluent sein. Nach Absaugen des Mediums wurde 1 mL der zu bestimmender FCV-Suspension auf den Zellmonolayer aufgebracht. Die 6-well Platten wurden für 90 min bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurde der Überstand abgesaugt und mit dem Medium für den Plaque-Assay überschichtet.

Nach dem Verfestigen des Mediums wurden die Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ mindestens 24 h inkubiert und anschließend zur Fixierung mit ca. 4 ml 10 %iger Formaldehyd-Lösung für 4 h überschichtet. Nach der Fixierung konnte die Agarose abgewaschen werden. Die zurückbleibende fixierte Zellschicht wurde mit 1% Kristallviolett-Lösung 20 min gefärbt und mit Leitungswasser gewaschen. Die Plaque-Forming Units (PFU; Lysehöfe im Zellrasen) wurden ausgezählt und der Titer berechnet.

4.9.4 Probennahme und Bestimmung des Virusgehaltes aus den Gelatine-Filtern

Die titrierte Feline Calicivirus-Suspension wurde vor der RLT-Anlage mittels Inhalator (10 min) vernebelt. Der Luftstrom der Anlage, der durch einen Ventilator erzeugt wird, zieht das Aerosol in den Innenraum der Anlage. In der Anlage können ggf. Filter eingesetzt und die UV-C-Strahlung zugeschaltet werden. Die Probenahme erfolgte mittels Gelatine-Membranfilter (Fa. Sartorius, Abscheiderate 3,0 µm). Die Ansauggeschwindigkeit der Abscheideapparatur betrug 6,0 m³/h. Die Dauer der Probenahme betrug 10 min. Die Bestimmung der Effizienz der Anlage wurde durch eine Vergleichsmessung durchgeführt.

Der Gelatine-Membranfilter wurde in 10 mL auf 37 °C vorgewärmten PBS-Puffer (pH 7,3) gelöst. Es wurden dezimale Verdünnungen der Ausgangssuspension angelegt. Jeweils 1 mL der FCV-Suspension wurde pro Kavität eingesetzt. Es erfolgten jeweils Doppelbestimmungen.

Folgende Parameter wurden berücksichtigt:

BÄ•RO Anlage: ohne Filter / ohne UV-C-Strahlung
 mit Filter / mit UV-C-Strahlung
 ohne Filter / mit UV-C-Strahlung

Seritube: ohne UV-C-Strahlung
 mit UV-C-Strahlung

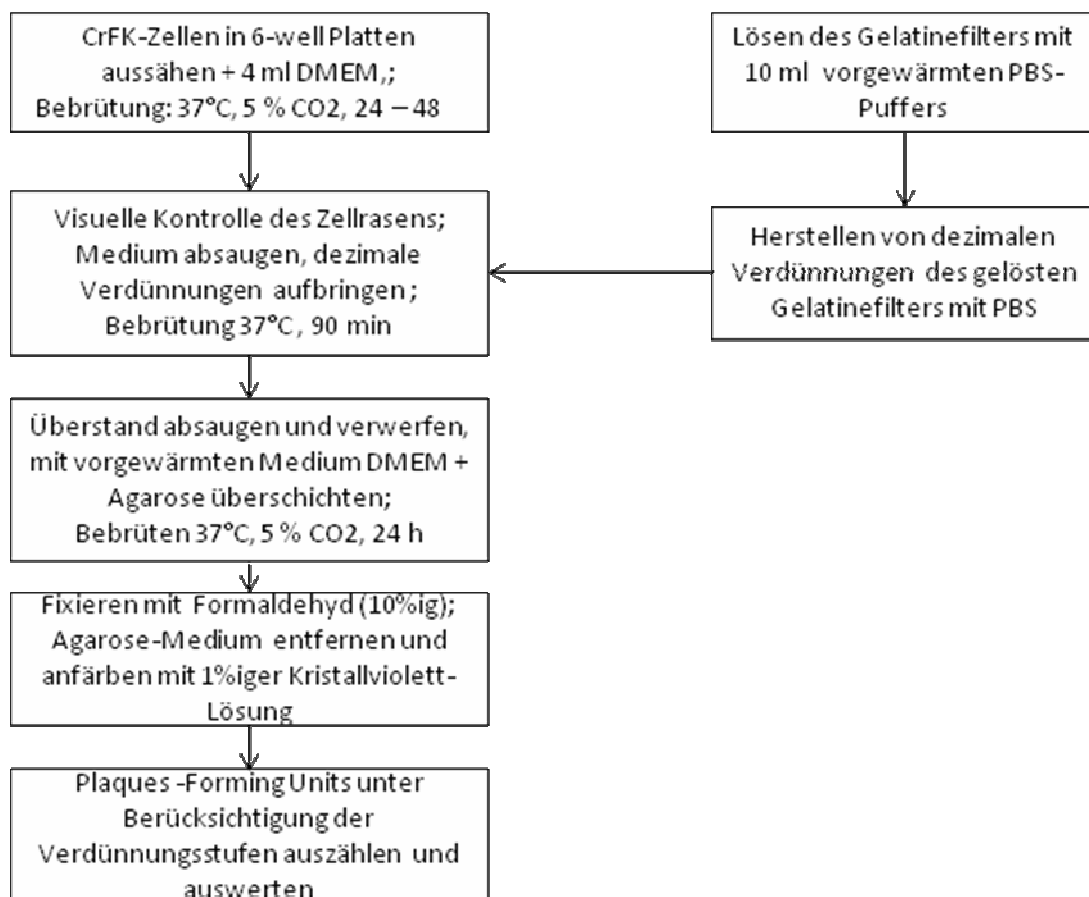


Abb. 4.3: Flußschema zur Bestimmung der Plaque-Forming Units von FCV

5. Ergebnisse

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts sollte die Transmission von Viren über RLT-Anlagen und deren Inaktivierung durch UVC-Bestrahlung im Luftstrom untersucht werden. Der Nachweis der Übertragung und Inaktivierung von Phagen sollte zum einen über die Messung der Infektiosität durch die Top-Agar-Methode (Maniatis *et al.*, 1989) erfolgen, zum anderen sollten UVC-Schäden der Nukleinsäuren molekulargenetisch untersucht werden (Abb. 5.0).

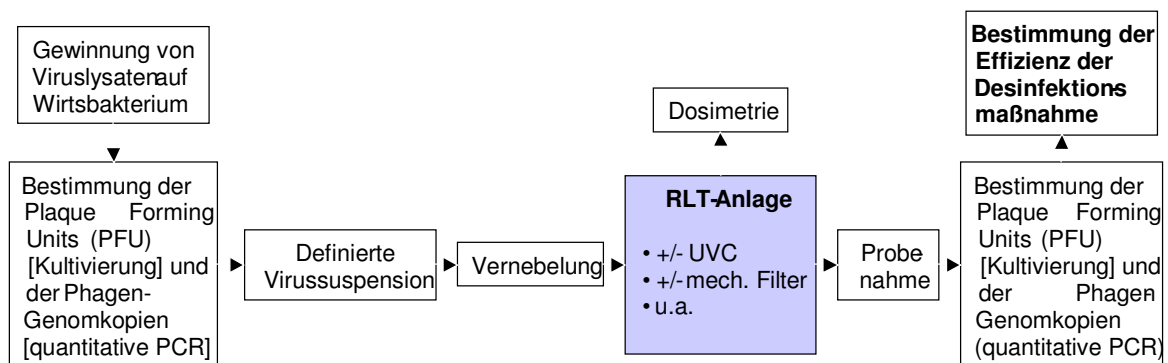


Abb. 5.0:

Flussschema der geplanten Arbeiten zur Untersuchung der Verbreitung von Viren über RLT-Anlagen

Für die Bestimmung der Gesamtkopienzahlen und Messung von Nukleinsäureschäden wurden verschiedene Real-Time PCR-Systeme etabliert, mit deren Hilfe unterschiedlich lange Bereiche der jeweiligen Phagen-Genome amplifiziert werden können (Abb. 4.2, Tab. 4.3). Über die in der quantitativen Real-Time PCR ermittelten ct-Werte, d.h. die von der PCR-Software errechneten Punkte in Zyklenzahlen, an denen die Fluoreszenz der abgebauten TaqMan-Sonden einen bestimmten Schwellenwert übersteigt, sowie Anzahlen an intakten und somit amplifizierbaren Genomkopien verschiedener Längen, soll eine Aussage über das Ausmaß von UVC-Schäden der Nukleinsäure und der verbliebenen Infektiosität nach Bestrahlung möglich sein, wenn parallel zur PCR die Infektiosität per Top-Agar-Methode bestimmt wird. Die Reihenfolge der Experimente wurde so gewählt, dass zunächst folgenden grundlegenden Fragestellungen nachgegangen wurde:

- Wie Effizient ist die Top-Agar-Methode im Nachweis von Phagen?
- Welche Primersysteme kommen zum Virennukleinsäure-Nachweis per PCR in Frage?
- Lassen sich mit UVC-bestrahlte Nukleinsäuren in einer PCR schlechter als vergleichbare unbestrahlte Nukleinsäuren amplifizieren?

Des Weiteren mussten für die PCRs eine interne Kontrollreaktion etabliert werden, um bei negativ verlaufenden spezifischen Nachweisreaktionen von Phagen-Nukleinsäure eine Aussage über mögliche Inhibierungen in der PCR treffen zu können und somit bei positiver interner Kontrollreaktion die PCR als eindeutig negativ für die spezifische Nachweisreaktion einordnen zu können.

Außerdem wurden für quantitative Real-Time PCRs Quantifizierungsstandards mit PCR-Produkten der entsprechenden Phagengenome erzeugt.

Nach Untersuchung dieser Fragestellungen wurde die Transmission von Phagenlysat-Aerosolen über ein Modellsystem einer RLT-Anlage untersucht (s. Abb. 5.0). Dabei wurden generelle Eigenschaften wie die Verweildauer von Phagen in RLT-Modellanlagen und die Verhältnisse von eingebrachten zu erhaltenen Phagentitern untersucht, bevor der Einfluss von UVC-Bestrahlung getestet wurde.

5.1 Ermittlung der Wiederfindungsrate und der unteren Nachweisgrenze der Phagentiterung durch die Top-Agar-Methode

Mit der Fragestellung, welcher Phagentiter in einem Gelatinefilter mit der in Kap. 4.1.4 beschriebenen Methode noch annähernd bestimmt werden können, wurden zwei Gelatinefilter in jeweils 20 mL SM-Puffer bei 37 °C auf dem Inkubator mit Schüttler gelöst. Anschließend wurden Lysate der Phagen MS2 und Phi X174 mit SM-Puffer auf Titer mit 10000, 5000, 2500, 1000, 500, 250, 100, 75, 50, 25 und 0 PFU pro mL verdünnt. Jeweils ein mL der Gelatinelösung wurde mit 50 µL einer Verdünnungsstufe versetzt, was einem mL auf 20 mL gelöstem Filter entsprach.

Nach Durchmischen der Phagenlysate mit der Gelatinelösung wurden 100 µL der Verdünnungsstufen von Phi X174 mit 10000 bis 500 PFU pro mL je fünf Mal, 250 und 100 PFU pro mL je drei Mal und 75 bis 0 PFU pro mL je vier Mal mit 250 µL *E. coli* DSM 13127 nach 4.1.2 plattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die einzelnen Plaques pro Platte gezählt und der Ursprungstiter pro Filter berechnet. Die Werte aus gleichen Verdünnungsstufen wurden gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

Tab. 5.1: Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Top-Agar-Methode für Phi X174

Eingesetzte PFU pro Filter	10000	5000	2500	1000	500	250	100	75	50	25	0
Ermittelte PFU/Filter (in 20 mL)	8880	4333	1143	800	360	267	67	50	0	0	0
	± 2287	± 641	± 640	± 616	± 167	± 115	± 115	± 100			

Die untere Nachweisgrenze für Phi X174 lag zwischen 100 und 50 PFU pro Gelatinefilter, da bei eingesetzten 100 PFU und 75 PFU von Phi X174 der Wert der ermittelten PFU pro Filter mit seiner Standardabweichung noch im Bereich des eingesetzten Wertes lag.

Die Verdünnungsstufen von MS2 wurden analog zu Phi X174 alle drei Mal mit 250 µL *E. coli* TOP 10F' nach 4.1.2 ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Tab. 5.2: Bestimmung der unteren Nachweisgrenze der Top-Agar-Methode für MS2

Eingesetzte PFU pro Filter	10000	5000	2500	1000	500	250	100	75	50	25	0
Ermittelte PFU/Filter (in 20 mL)	15000 ± 2307	8067 ± 1447	5866 ± 1553	1600 ± 529	867 ± 611	800 ± 346	267 ± 115	133 ± 115	67 ± 115	0	0

Die untere Nachweisgrenze für MS2 lag zwischen 50 und 25 PFU pro Gelatinefilter, da bei Gelatinefiltern, die mit einem MS2-Titer von 25 PFU versetzt wurden, keine Infektiosität mittels Top-Agar-Methode gemessen werden konnte, wobei die gemessene Infektiosität bei einem Filter versetzt mit 50 PFU MS2 mit der Standardabweichung noch im Bereich des eingesetzten Titers lag.

5.2 Etablierung von PCR-Systemen zum Nachweis UVC-bedingter Nukleinsäureschäden

5.2.1 Bestrahlung von Phagen-Nukleinsäuren

Um zu testen, ob UVC-Bestrahlung auf Nukleinsäuren zu Effekten führt, welche über eine PCR messbar sind, wurden Nukleinsäuren der Phagen Phi X174, Lambda und MS2 bestrahlt. Dazu wurden Verdünnungsreihen der Nukleinsäuren in H₂O angelegt. Es wurden jeweils 100 µL der Verdünnungen in zwei parallelen Probenreihen in 1,5 mL Reaktionsgefäße gefüllt und eine Probenreihe für 5 Minuten auf dem UV-Transilluminator bestrahlt, indem die Reaktionsgefäße direkt auf die Transilluminationsfläche gelegt wurden. Anschließend erfolgten PCRs mit Primersystemen (Tab. 4.3), die verschiedene Amplifikatlängen generierten.

5.2.1.1 Phi X174-DNA

Nach dem Pipettierschema aus Tab. 4.6 und dem Programm aus Tab. 4.12 wurde das 1533 bp Amplifikat des Phagen Phi X174 mit dem Primersystem Φ X-E (Tab. 4.3) im Rotor-Gene amplifiziert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte im FAM-Kanal.

Während bei den unbestrahlten Proben in allen Verdünnungsstufen ein Anstieg der Fluoreszenz detektiert wurde, ist dies bei den bestrahlten Proben nur bei der 10^{-1} und 10^{-2} Verdünnung der Fall. Die 10^{-2} Verdünnung der unbestrahlten Probe wies einen ct-Wert von 18,38 auf, die gleiche Verdünnung der mit UV-Licht bestrahlten Probe einen ct-Wert von 36,94.

Anschließend wurden die Proben auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch nach 4.5 aufgetrennt.

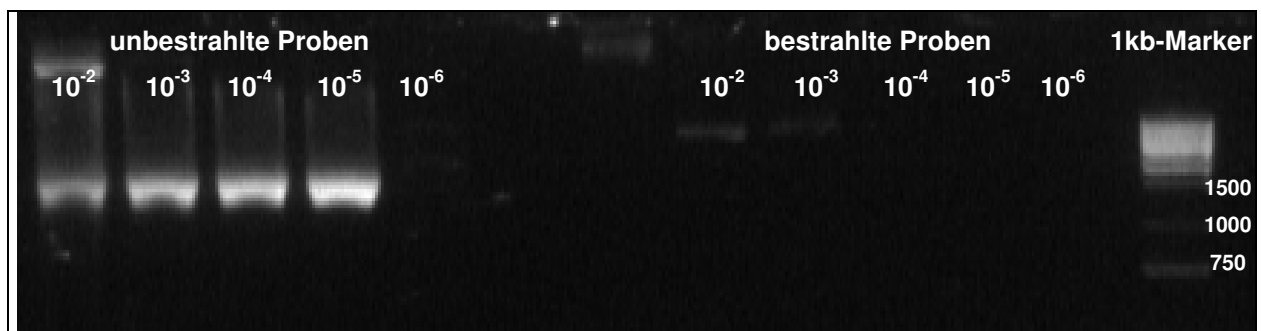


Abb. 5.1: Gelelektrophoretische Auftrennung von 1533 bp Amplifikaten des Phagen Phi X174

Zu erkennen ist das Bandenmuster verschiedener Verdünnungsstufen in einem einprozentigem Agarosegel nach EtBr-Färbung, Vergleich von UVC-bestrahlten Proben mit unbestrahlten Proben zur Bestimmung der Eignung einer konventionellen PCR zum Nachweis von Nukleinsäureschäden.

Wie in Abbildung 5.1 zu erkennen ist, war die Intensität der Banden bei den bestrahlten Proben im Vergleich zu den unbestrahlten Proben deutlich schwächer ausgeprägt, es ist bei den bestrahlten Proben weniger Amplifikat entstanden.

5.2.1.2 Lambda-DNA

Nach Tab. 4.21 und 4.22 wurde das 277 bp Amplifikat des Phagen Lambda mit dem Primersystem Λ -A (Tab. 4.3) am LightCycler hergestellt und der Fluoreszenzanstieg parallel verfolgt.

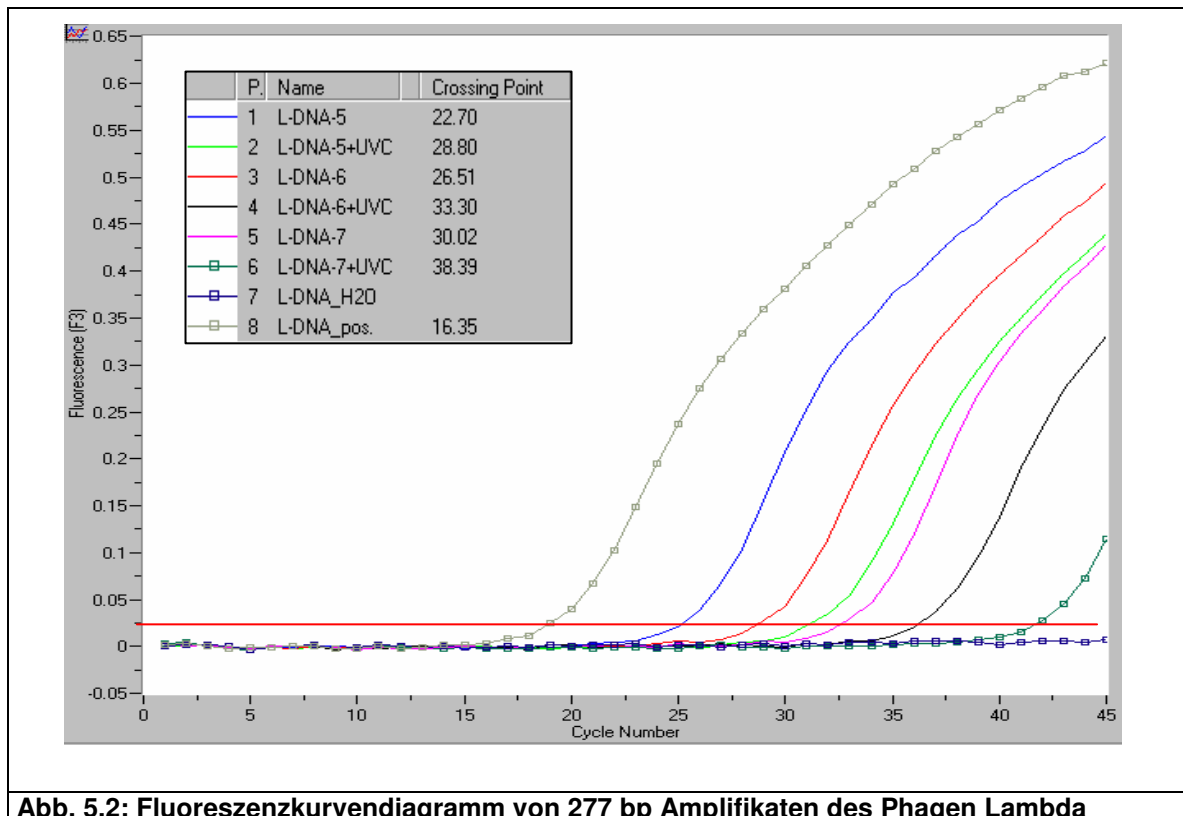


Abb. 5.2: Fluoreszenzkurviendiagramm von 277 bp Amplifikaten des Phagen Lambda

Real-Time PCR am LightCycler, zu erkennen sind Fluoreszenzkurven von 10^{-5} bis 10^{-7} Verdünnungen, bestrahlt und unbestrahlt, dazu Fluoreszenzkurven einer Positiv- und Negativkontrolle, die rote Linie unten im Diagramm entspricht dem Schwellenwert; auf der Ordinate des Diagramms ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse die PCR-Zyklenzahlen angegeben, im Feld links sind die ct-Werte (Crossing Point) der Fluoreszenzkurven angegeben.

Die ct-Werte der bestrahlten Verdünnungsstufen lagen um etwa acht Zyklen hinter den Werten der unbestrahlten Verdünnungsstufen. Da eine Differenz der ct-Werte in der Real-Time PCR von 3,5 Zyklen in der absoluten Kopienzahl etwa einer logarithmischen Stufe (log-Stufe) entspricht, wurde das 277 bp Amplifikat von Lambda um mindestens zwei log-Stufen durch UVC-Bestrahlung reduziert.

5.2.1.3 MS2-RNA

Nach Tab. 4.7 und 4.13 wurde am Rotor-Gene das 805 bp Amplifikat des Phagen MS2 mit dem Primersystem MS2-D (Tab. 4.3) hergestellt. Anschließend wurden die Proben auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen.

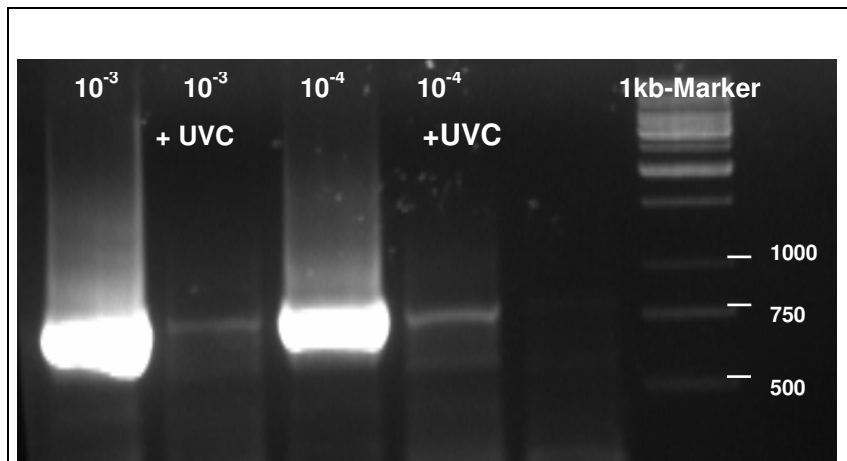


Abb. 5.3: Gelelektrophoretische Auftrennung von 805 bp Amplifikaten des Phagen MS2

Zu erkennen ist das Bandenmuster von 805 bp Amplifikaten in verschiedenen Verdünnungsstufen in einem einprozentigen Agarosegel nach anschließender EtBr-Färbung, Vergleich von UVC-bestrahlten Proben mit unbestrahlten Proben.

Bei der bestrahlten RNA entstand deutlich weniger Amplifikat als bei den Kontrollproben, was in Abb. 5.3 in den Intensitäten der Banden zu erkennen ist. Somit konnte gezeigt werden, dass auch RNA durch UVC-Bestrahlung Schaden nimmt, welcher in einer RT-PCR nachgewiesen werden kann.

5.2.1.4 Phi6-RNA und Phi13-RNA

Für den Nachweis von Phi6- und Phi13-RNA aus Gelatinefiltern mittels Real-Time PCR wurden ein 79 bp Amplifikat von Phi6 und ein 110 bp Amplifikat von Phi13 nach Tab. 4.23 und Kap. 4.24 mit den Primersystemen $\Phi 6$ bzw. $\Phi 13$ (Tab. 4.3) am LightCycler hergestellt. Dabei wurde die entsprechende RNA aus Lysaten nach Kap. 4.3.2 isoliert und in verschiedenen Verdünnungsstufen in der PCR eingesetzt. In den Abb. 5.4 und 5.5 sind die entsprechenden Fluoreszenzkurven mit den ct-Werten der Verdünnungen und der Negativkontrolle gezeigt.

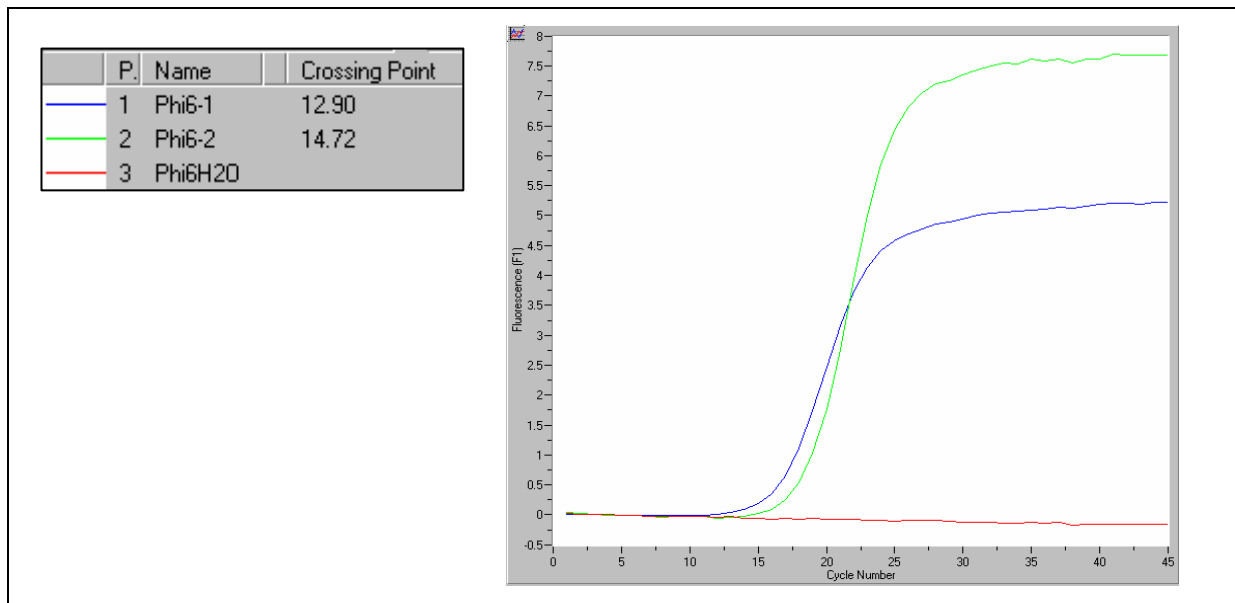


Abb. 5.4: Fluoreszenzkurvendiagramm von 79 bp Amplifikaten des Phagen Phi6

Real-Time PCR am LightCycler mit Proben in 10^{-1} und 10^{-2} Verdünnung; auf der Ordinate des Diagramms ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse die PCR-Zyklenzahlen angegeben, im Feld links sind die ct-Werte (Crossing Point) der Fluoreszenzkurven angegeben.

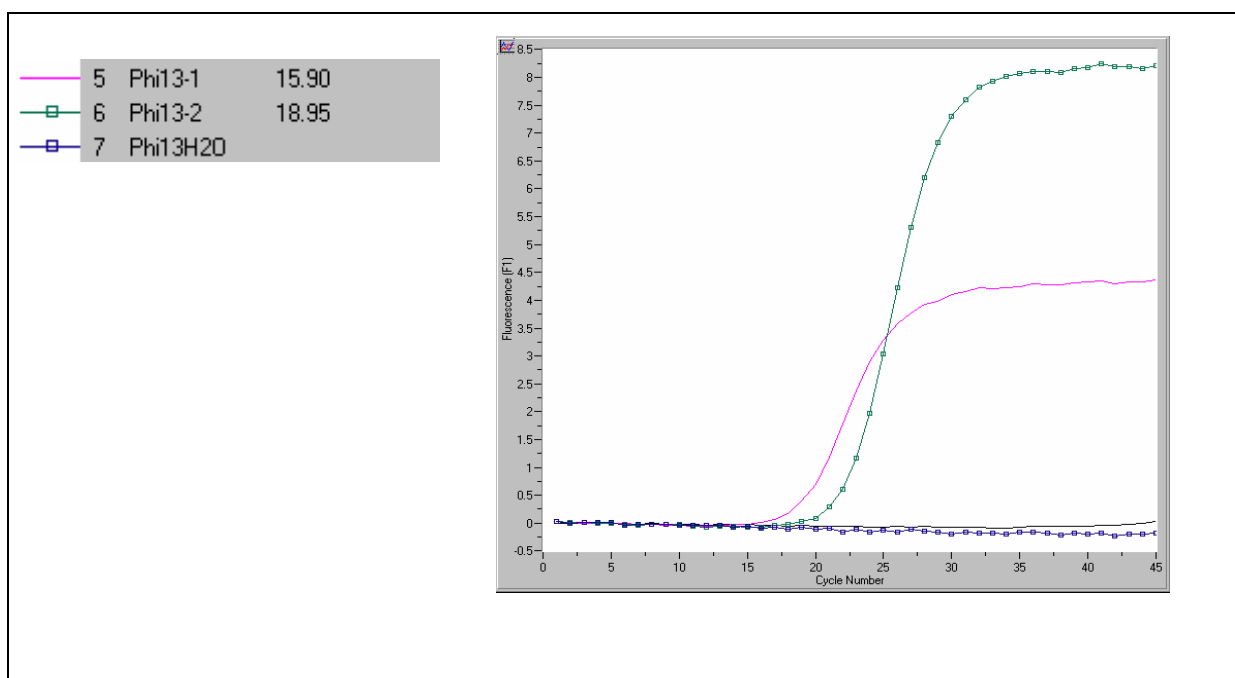


Abb. 5.5: Fluoreszenzkurvendiagramm von 110 bp Amplifikaten des Phagen Phi13

Real-Time PCR am LightCycler mit Proben in 10^{-1} und 10^{-2} Verdünnung; auf der Ordinate des Diagramms ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse die PCR-Zyklenzahlen angegeben, im Feld links sind die ct-Werte (Crossing Point) der Fluoreszenzkurven dargestellt.

Die Primersysteme $\Phi 6$ und $\Phi 13$ können mit den verwendeten PCR-Programmen zum Nachweis von Phi13- und Phi6-RNA verwendet werden. Da sich in Vorversuchen zeigte,

dass diese beiden umhüllten Viren sehr instabil sind und eine niedrige Tenazität aufweisen, wurden keine Verneblungsexperimente in RLT-Anlagen mit diesen Viren durchgeführt. Für andere umhüllte Viren konnte ebenfalls eine niedrige Tenazität demonstriert werden. Für Inflenzaviren konnte eine Infektiosität lediglich für max. 1-2 Tage auf inerten Oberflächen in Abhängigkeit von Temperatur und Feuchtigkeit belegt werden, wobei eine Stabilisierung durch organisches Material erfolgen kann. Dabei sind humane Inflenzaviren für 2-8 h stabil.

5.2.2 Entwicklung einer internen Kontrollreaktion

Um bei negativen PCR-Ergebnissen eine mögliche Inhibition der Reaktion ausschließen zu können, wird eine interne Kontrollreaktion durchgeführt. Dabei sollte die spezifische Nachweisreaktion im FAM-Kanal und die IC im JOE-Kanal detektiert werden. Für die IC wurden Primer und Sonde für humanes Beta-2-Mikroglobulin (β 2-MG) ausgewählt (Primer s. Tab. 3.1, Sonde s. Tab. 3.2), wobei ein Amplifikat von 82 bp entsteht.

Zunächst wurde am Rotor-Gene nach Tab. 4.5 und 4.9 β 2-MG mit humaner DNA (hDNA) in verschiedenen Verdünnungsstufen amplifiziert, um eine geeignete Verdünnung von hDNA für eine IC in einer PCR zu ermitteln. Der ct-Wert einer geeigneten hDNA-Verdünnung sollte einen ct-Wert im Bereich zwischen dem 30 und dem 35 PCR-Zyklus aufweisen.

Im nächsten Schritt wurde B2-MG mit dem 85 bp Amplifikat von Phi X174 am Rotor-Gene getestet (Tab. 4.5 und 4.9).

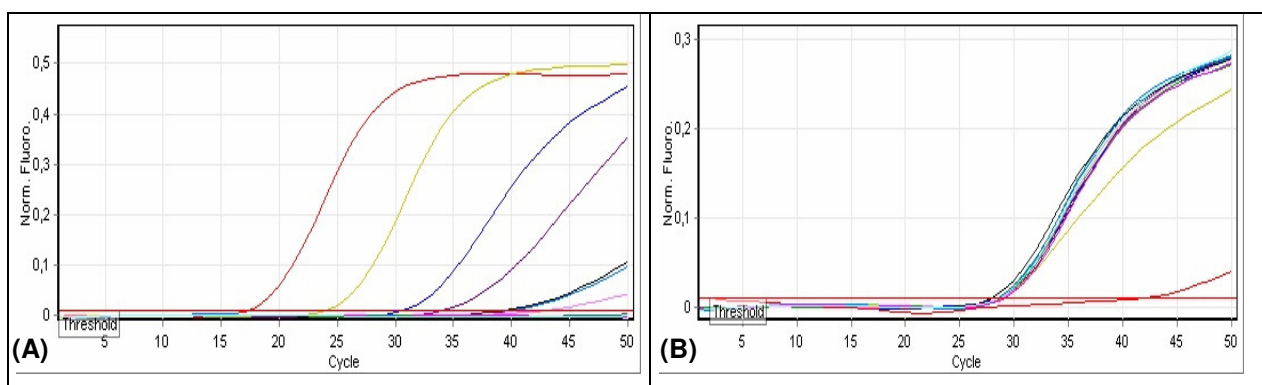


Abb. 5.6: Fluoreszenzkurven der spezifischen Nachweisreaktion für Phi X174 DNA und der IC

(A): Spezifische Nachweisreaktion, gemessen im FAM-Kanal; (B): IC, gemessen im JOE-Kanal; auf den Ordinaten der Diagramme sind jeweils die Fluoreszenzen, auf den Abszissen die PCR-Zyklenzahlen angegeben, zu erkennen sind die gleichmäßig abgestuft ansteigenden Fluoreszenzkurven der spezifischen Nachweisreaktion im linken Bild sowie die Fluoreszenzkurven der IC im rechten Bild, welche fast alle einen nahezu identischen ct-Wert aufweisen; gleiche Kurvenfarben in beiden Abbildungen stehen für die selben im FAM- und JOE-Kanal gemessenen Probenfluoreszenzen.

Während die Fluoreszenzkurven der Hauptreaktion gemäß der Verdünnungsstufen der DNA abgestuft anstiegen, besaßen die Fluoreszenzkurven der IC alle etwa den gleichen ct-Wert. Eine Ausnahme stellte der ct-Wert der IC für die 10^{-1} Verdünnung der Phi X174-DNA in der spezifischen Nachweisreaktion dar (rote Kurve), da eine in der Hauptreaktion stark positive Reaktion die IC inhibierte (Abb. 5.6).

5.2.3 Konstruktion von PCR-Standards

Um bei den Real-Time PCRs Aussagen über die jeweilige Anzahl an intakten Phagen-Genomkopien treffen zu können, wurden nach Tab. 4.3 und 4.4 PCR-Produkte der Phagen Phi X174 (1050 bp, Primersystem Φ X-D), Lambda (2005 bp, Primersystem Λ -E) und M13 (1486 bp, Primersystem M13-C) erzeugt (Tab. 4.3). Diese PCR-Produkte wurden nach 4.4 in den TOPO-Vektor inseriert und in *E. coli* kloniert. Nach Konzentrationsbestimmung (4.4.2) wurden von allen drei Plasmiden Standards mit 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 und 10^2 Kopien pro mL mit H_2O verdünnt. Aus MS2-RNA wurden Standards mit 10^{10} bis 10^2 Kopien pro mL verdünnt.

Diese Standards wurden in den Real-Time PCRs am Rotor-Gene als Template eingesetzt. Die Gerätesoftware berechnete anhand der ct-Werte der Standards eine Regressionsgerade und so die absolute Zahl der jeweiligen Probenkopien pro Milliliter (Abb. 5.7 und 5.8). Die berechneten Werte wurden jeweils in einer Tabelle angezeigt, aus denen sie nach den Formeln 4.4 und 4.5 auf die ursprünglichen Lösungen umgerechnet werden konnten.

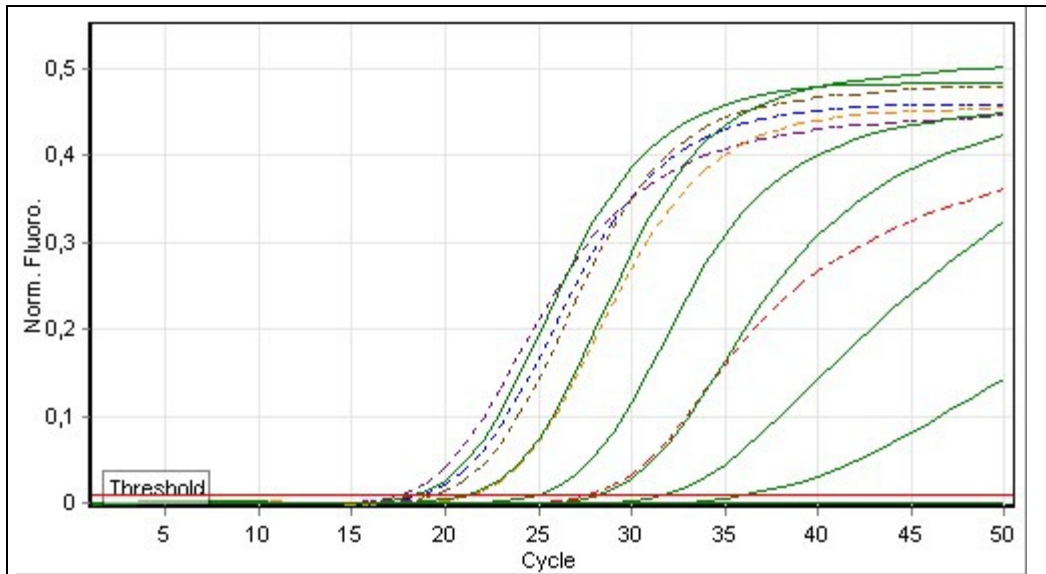


Abb. 5.7: Fluoreszenzkurvendigramm einer quantitativen PCR am Rotor-Gene

Auf der Ordinate ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse die PCR-Zyklen angegeben, durchgängig gezeichnete Kurven gehören zu den Quantifizierungsstandards, gestrichelt gezeichnete Kurven stellen den Fluoreszenzverlauf von PCR-Proben mit Phagennukleinsäure dar, die rote Linie repräsentiert den Schwellenwert (Threshold).

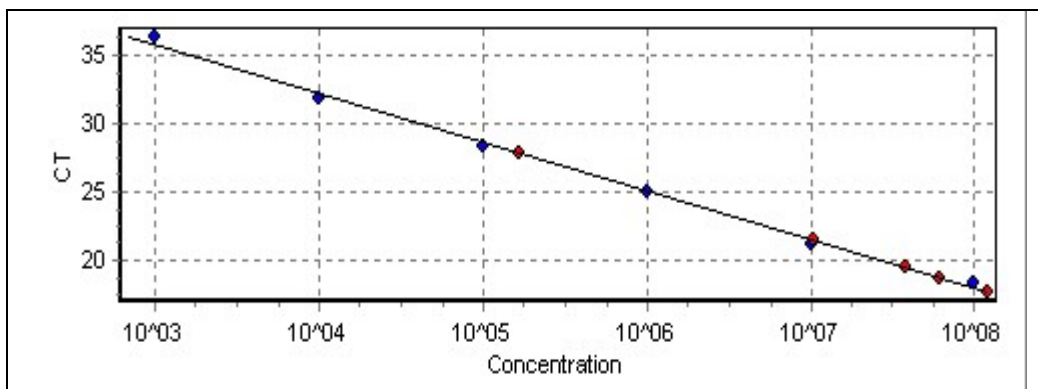


Abb. 5.8: Von der Rotor-Gene Software berechnete Regressionsgerade

Auf der Ordinate sind die ct-Werte, auf der Abszisse ist die Konzentration (Kopien pro mL) angegeben, blaue Punkte stehen für Quantifizierungsstandards, rote Punkte für zu quantifizierende Nukleinsäureproben.

5.3 Temperaturabhängige Stabilität des Phagen M13

Um exemplarisch die Lagerfähigkeit eines Phagen bei 4 °C und bei -20 °C zu untersuchen und die Resultate mit den Literaturwerten dieses und anderer Phagen zu vergleichen

(Clark, 1962; Ackermann *et al.*, 2004; Jepson *et al.*, 2004; Dreier *et al.*, 2005), wurde ein Lysat von M13 mit einem Titer von $4,70 \times 10^{12}$ PFU pro mL aufgeteilt, wobei eine Hälfte bei 4 °C, die andere Hälfte bei -20 °C gelagert wurde. Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde aus beiden Lysaten mittels Top-Agar-Methode (Kap. 4.1.2) der Titer bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass übereinstimmend mit den Literaturwerten kein signifikanter Titerverlust eingetreten war (Tab. 5.4).

Lagerungsdauer in Tagen	Ermittelter Titer bei 4 °C in PFU pro mL	Ermittelter Titer bei -20 °C in PFU pro mL
1	$2,00 \times 10^{12}$	$2,26 \times 10^{12}$
2	$2,88 \times 10^{12}$	$2,80 \times 10^{12}$
3	$3,48 \times 10^{12}$	$3,08 \times 10^{12}$
5	$1,12 \times 10^{12}$	$3,31 \times 10^{11}$
6	$2,14 \times 10^{12}$	$4,56 \times 10^{11}$
7	$3,34 \times 10^{12}$	$1,10 \times 10^{12}$

Aufgrund dieses Ergebnisses können Phagenlysate hergestellt und für weitere Vernebelungsexperimente länger bei 4 °C gelagert werden.

5.4 Vernebelungsexperimente am Steritube

5.4.1 Auswirkung der Vernebelungsdauer auf die im Gelatinefilter gemessenen Phagentiter und Genomkopien

Zur Ermittlung der Vernebelungsdauer von Phagenlysaten in die RLT-Anlage Steritube (Kap. 2.6) wurde eine geeignete Zeit ermittelt, über die eine Vernebelung durch den Steritube sinnvoll ist, um eine maximale Ausbeute an Phagentiter und Genomkopien bei möglichst geringem Verbrauch an Phagenlysate zu erzielen. Dazu wurden Phagenlysate von Phi X174 mit $1,65 \times 10^8$ PFU pro mL sowie von MS2 mit $4,70 \times 10^{10}$ PFU pro mL eingesetzt. Diese Lysate wurden für jeweils 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten hintereinander vernebelt und parallel zum Zeitraum der Vernebelung aus dem Luftstrom nach 4.2.2 Luftproben genommen. Die Gelatinefilter wurden wie beschrieben (Kap. 4.2.2.1) in SM-Puffer gelöst. Aus den gelösten Gelatinefiltern wurde der Titer bestimmt (Kap. 4.1.4) sowie DNA (Phi X174) bzw. RNA (MS2) jeweils zwei Mal pro Filter isoliert (Kap. 4.3). Die isolierte DNA von Phi X174 wurde in einer

quantitativen Real-Time PCR nach Tab. 4.7 und 4.10 und die isolierte RNA von MS2 in einer quantitativen Real-Time PCR nach Tab. 4.9 und 4.13 eingesetzt. Dabei wurden mit den Primersystemen Φ X-A und MS2-A (Tab. 4.3) jeweils die kleinsten Amplifikate hergestellt (85 bp bei Phi X174, 60 bp bei MS2), welche ein annäherndes Maß für die gesamte Anzahl an Genomkopien sein sollten. Es wurden jeweils die Verhältnisse von gemessener Infektiosität in PFU pro Filter mit der Zahl an ermittelten Genomkopien pro Filter verglichen. Da zur Auswertung aller Vernebelungsexperimente Phagentiter in PFU pro mL direkt mit solchen in PFU pro Filter und vernebelten Gramm Phagenlysate verglichen werden, wurde mittels gravimetrischer Kontrollen und Vergleich mit Wasser festgestellt, dass sich Phagenlysate und Wasser in ihrem Gewicht nicht signifikant unterscheiden.

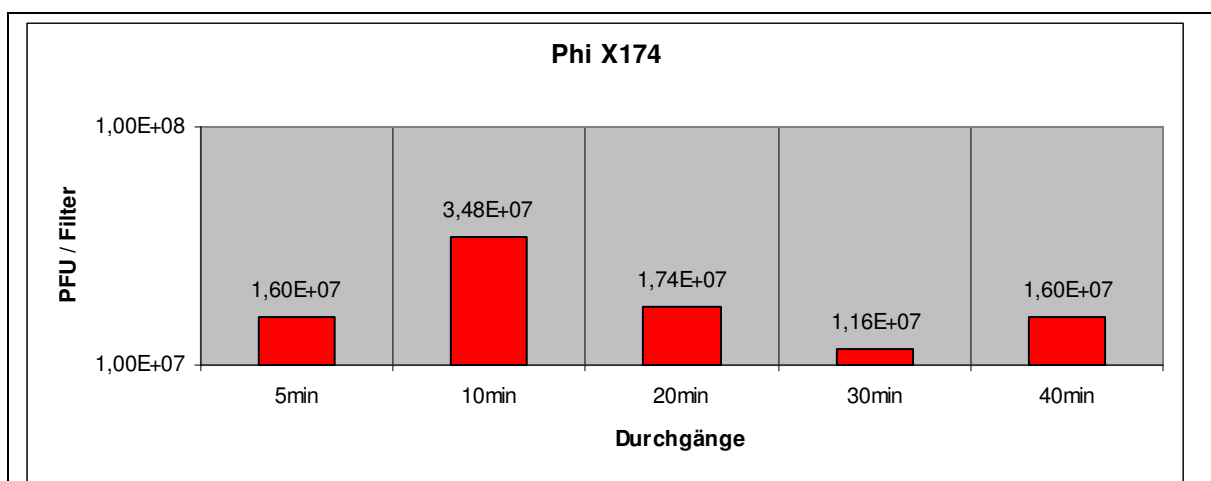


Abb. 5.9: PFU pro Filter von Phi X174

Darstellung der im Filter gemessene Phagentiter (PFU pro Filter) von Phi X174 in verschiedenen Vernebelungsexperimenten (Durchgänge) mit unterschiedlichen Vernebelungszeiten.

In Abb. 5.9 ist zu erkennen, dass der Filter bereits nach 5 minütiger Vernebelungszeit bei der Luftkeimsammlung sehr viele Phagen aufgenommen hatte, diese Zahl verdoppelt sich noch bis 10 Minuten Vernebelungszeit. Mit weiter zunehmender Vernebelungszeit stieg der Phagentiter nicht weiter an, sondern lag im Schwankungsbereich.

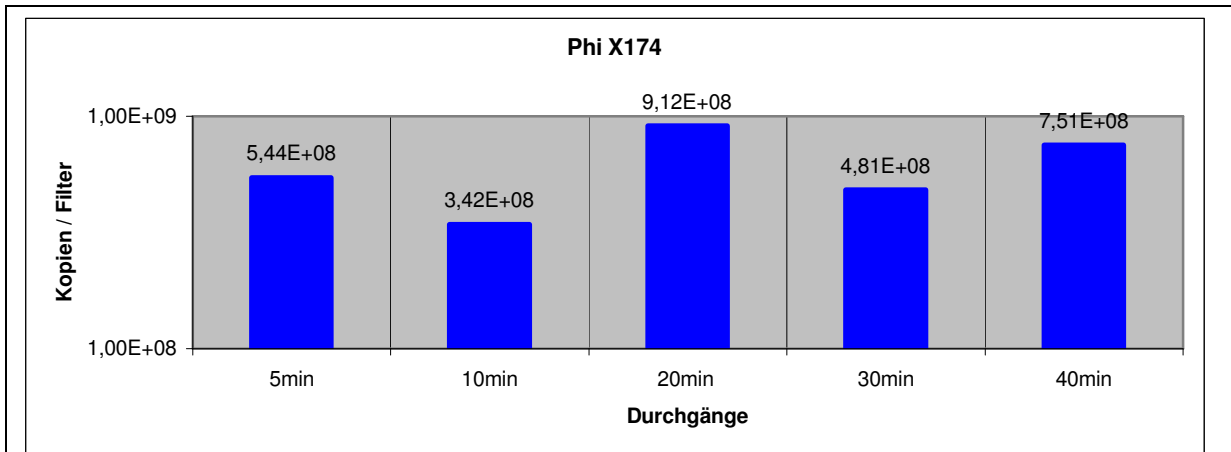


Abb. 5.10: Nukleinsäurequantifizierung anhand eines 85 bp Amplifikats von Phi X174

Darstellung der Gesamtzahlen an mittels quantitativer Real-Time PCR und Generierung eines 85 bp Amplifikats quantifizierten Phi X174-Genomkopien pro Filter in verschiedenen Vernebelungsexperimenten (Durchgänge) mit unterschiedlichen Vernebelungszeiten.

Der Filter war bereits nach 5 minütiger Vernebelungszeit mit Phagen-Genomkopien gesättigt (Abb. 5.10). Die bei längeren Vernebelungszeiten ermittelten Werte schwankten im Rahmen der PCR-Nachweisgenauigkeit, nahmen aber nicht deutlich zu.

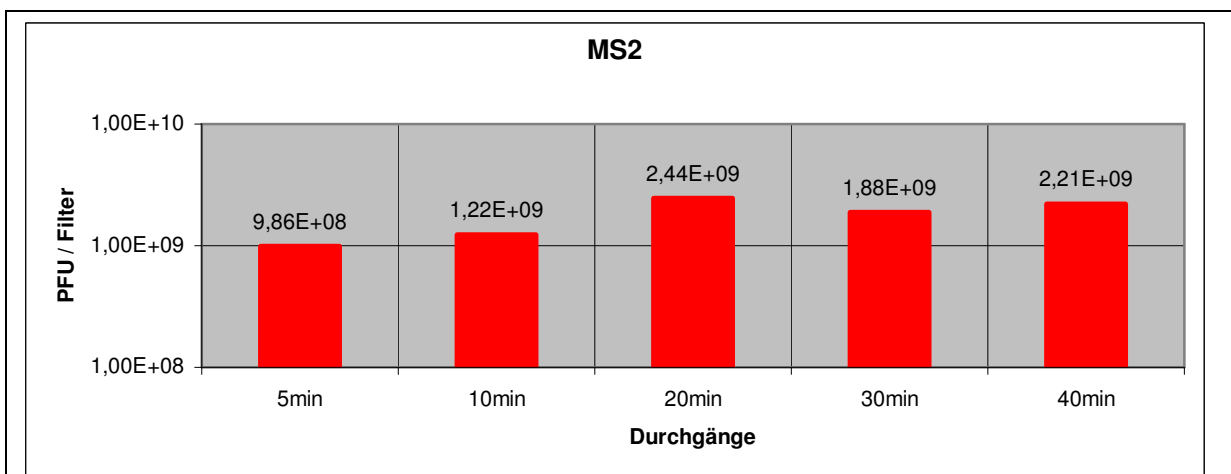


Abb. 5.11: PFU pro Filter von MS2

Darstellung der im Filter gemessene Phagentiter (PFU pro Filter) von MS2 in verschiedenen Vernebelungsexperimenten (Durchgänge) mit unterschiedlichen Vernebelungszeiten.

In Abb. 5.11 ist die gemessene Infektiosität von MS2 gezeigt. Die absoluten Werte der Infektiosität nahmen noch bis 20 Minuten Vernebelungsdauer zu, der Filter hatte aber schon nach 10 Minuten fast gleich viele Phagen gesammelt wie beispielsweise nach 30 Minuten, da die Anzahl der PFU bei MS2 ebenfalls schwankten.

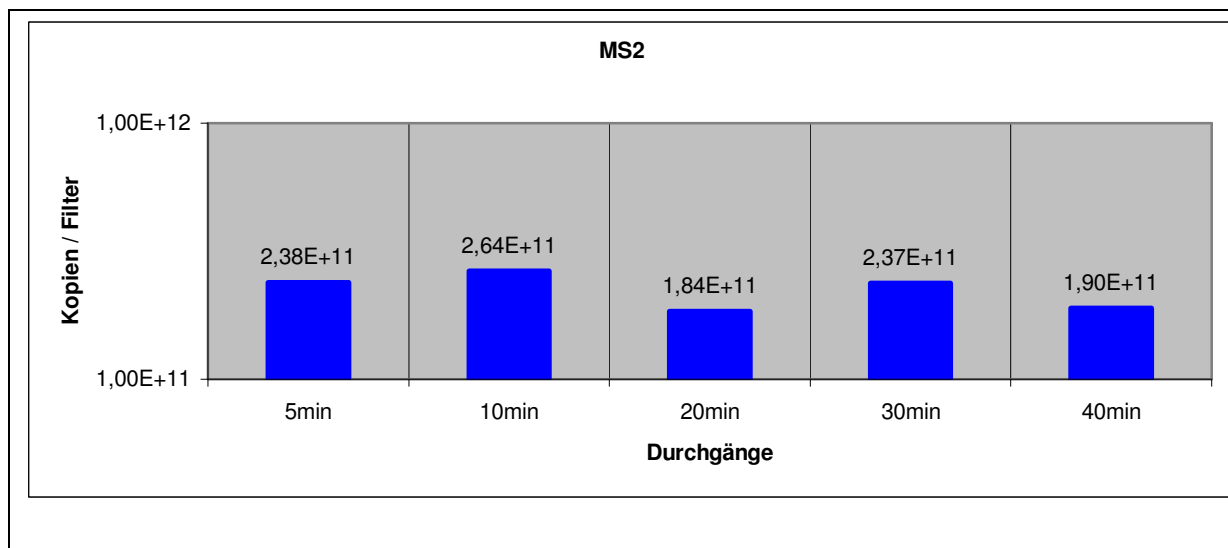


Abb. 5.12: Nukleinsäurequantifizierung anhand eines 60 bp Amplifikats von Phi X174

Darstellung der Gesamtzahlen an mittels quantitativer Real-Time PCR und Generierung eines 60 bp Amplifikats quantifizierten MS2-Genomkopien pro Filter in verschiedenen Vernebelungsexperimenten (Durchgänge) mit unterschiedlichen Vernebelungszeiten.

Bei MS2 war der Filter ebenfalls nach 5 Minuten Vernebeln mit Phagen-Genomkopien gesättigt (Abb. 5.12). Bei längerer Vernebelungszeit konnte keine deutliche Zunahme beobachtet werden.

Basierend auf diesen Daten wurde die standardisierte Vernebelungszeit auf 10 Minuten festgelegt, um ein angemessenes Verhältnis zwischen dem Verbrauch an Lysat zu der Ausbeute bei der Luftprobennahme zu erhalten.

5.4.2 Vernebelungsbedingter Verlust des Phagentiters

Während des Vergleichs der bei Vernebelungsexperimenten eingesetzten Phagentiter zu den in den Luftprobenfiltern bestimmten Phagentiter nach Vernebelung durch den Steritube konnte beobachtet werden, dass der eingebrachte Phagentiter nicht dem ermittelten Titer im Filter nach einer Luftprobennahme entsprach. Um diesen vernebelungsbedingten Verlust im Steritube und eventuelle Gesetzmäßigkeiten im Verhältnis von eingebrachtem zu erhaltenem Phagentiter sowie per quantitativer Real-Time PCR ermittelten Anzahlen an Phagen-Genomkopien zu untersuchen, wurden Phagenlysate von Phi X174 und MS2 in verschiedenen Verdünnungen mit definiertem Titer als Eichreihe vom niedrigen zum hohen Titer für jeweils zehn Minuten in den Steritube vernebelt. Die Luftprobennahme erfolgte jeweils parallel zu den Vernebelungen.

Von einem MS2-Lysat wurden durch Verdünnung mit SM-Puffer Lösungen mit in Zehnerpotenzen aufsteigendem Titer von $5,00 \times 10^2$ bis $5,00 \times 10^9$ PFU pro mL hergestellt

und in den Steritube vernebelt. Die Gelatinefilter wurden nach der Vernebelung in SM-Puffer gelöst (4.2). Es wurde der Titer der Filter bestimmt (4.1.4) und mittels quantitativer Real-Time PCR nach Tab. 4.9 und 4.13 mit dem Primersystem MS2-A (Amplifikatgröße 60 bp, Tab. 4.3) die Anzahl der Gesamt-Genomkopien ermittelt.

Von einem Phi X174-Lysat wurden ebenfalls Verdünnungen mit SM-Puffer hergestellt. Diese Verdünnungen mit 10^3 bis 10^8 PFU pro mL wurden in den Steritube vernebelt (Kap. 4.2). Die Titerbestimmung erfolgte nach Kap. 4.1.4, während die Bestimmung Anzahl der Gesamt-Genomkopien nach Tab. 4.7 und 4.10 mit dem Primersystem Φ X-A (Amplifikatgröße 85 bp, Tab. 4.3) erfolgte.

Die Auswertung der Ergebnisse dieses Versuches zeigte, dass ein lineares Verhältnis zwischen vernebeltem Phagentiter und ermitteltem Titer aus dem Luftprobenfilter ab 5×10^5 PFU/mL zu beobachten ist (Abb. 5.13). Der MS2-Titer aus dem Filter lag um 1,8 bis 2,4 log-Stufen unter dem vernebelten Titer. Das Verhältnis zwischen PFU und Kopien eines Filters blieb ebenfalls ab etwa $5,00 \times 10^5$ PFU pro mL konstant. Der aus den Filtern ermittelte Titer in PFU pro mL lag um etwa 3 log-Stufen unterhalb der Gesamt-Genomkopienzahl. Die Kopienzahl bei $5,00 \times 10^6$ PFU wich etwas vom zu erwartenden linearen Verhältnis ab.

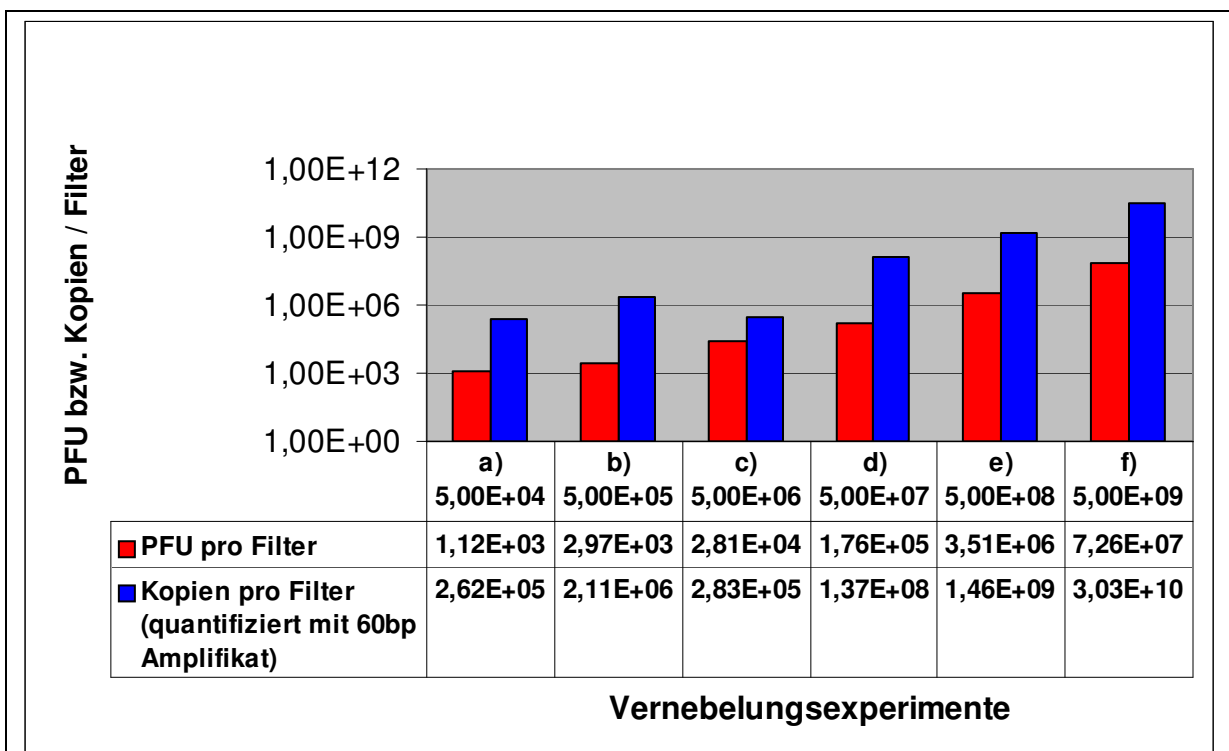


Abb. 5.13: MS2-Eichreihe

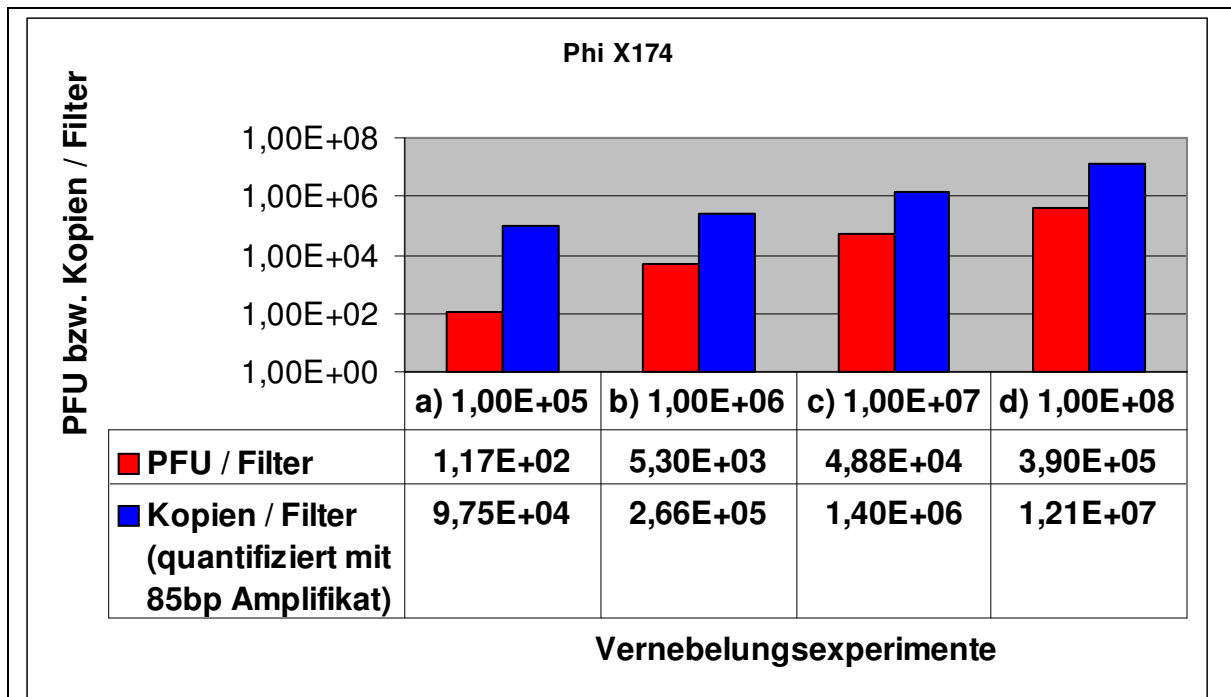
Darstellung der ermittelten Phagentiter (rote Säulen) und der mittels dem Primersystem MS2-A (Amplifikatgröße 60 bp) bestimmten Kopienzahlen pro Filter (blaue Säulen) verschiedener Vernebelungsexperimente; die Säulenpaare a) bis f) stellen die Ergebnisse aus den einzelnen Vernebelungsexperimenten mit vernebelten Phagentitern von $5,00E+04$ bis $5,00E+09$ PFU/mL dar.

Werden die absoluten Zahlen der eingebrachten und erhaltenen PFU ab $5,00 \times 10^5$ PFU verglichen, zeigt sich, dass durch den Steritube im Mittel $99,27 \pm 0,42$ % an PFU nach Vernebelung nicht detektierbar waren (Tab. 5.4).

Tab. 5.4: Auswertung der nach Vernebelungsexperimenten detektierten Titer von MS2

vernebelter Phagentiter	PFU im Filter nach Luftprobennahme gemessen	Differenz vernebelter Phagentiter zu PFU im Filter	Prozent an nicht detektiertem Titer	Mittelwert 5×10^5 bis 5×10^9 PFU vernebeltem Titer	Standardabweichung
5,00E+04	1,12E+03	4,89E+04	97,76		
5,00E+05	2,97E+03	4,97E+05	99,41	99,27	0,42
5,00E+06	2,81E+04	4,97E+06	99,44		
5,00E+07	1,76E+05	4,98E+07	99,65		
5,00E+08	3,51E+06	4,96E+08	99,30		
5,00E+09	7,26E+07	4,93E+09	98,55		

Bei Phi X174 ergab sich ein ähnliches Bild. Wie in Abb. 5.14 zu erkennen ist, blieb das Verhältnis zwischen vernebeltem Phi X174-Titer und ermitteltem Titer aus dem Filter ab einem vernebelten Titer von 10^5 PFU/mL konstant, der ermittelte Filtertiter lag um 2,5 bis 3 log-Stufen unter dem Vernebelungstiter. Der Titer in PFU pro Filter lag ab einem vernebelten Phagentiter von $1,00 \times 10^5$ PFU/mL um 1,7 bis 2,8 log-Stufen unterhalb der ermittelten Phi X174-Genomkopienzahl.

**Abb. 5.14: Phi X174-Eichreihe**

Darstellung der ermittelten Phagentiter (rote Säulen) und der mittels dem Primersystem Φ X-A (Amplifikatgröße 85 bp) bestimmten Kopienzahlen pro Filter (blaue Säulen) verschiedener Vernebelungsexperimente; die Säulenpaare a) bis d) stellen die Ergebnisse aus den einzelnen Vernebelungsexperimenten mit vernebelten von $1,00E+05$ bis $1,00E+08$ PFU/mL dar.

Werden die absoluten Zahlen der PFU vor und nach Vernebeln miteinander verglichen, wurden $99,62 \pm 0,19$ % der eingebrachten PFU im Steritube nach einer Vernebelung nicht detektiert (Tab. 5.5).

Tab. 5.5: Auswertung der nach Vernebelungsexperimenten detektierten Titer von Phi X174

vernebelter Phagentiter	PFU im Filter nach Luftprobennahme gemessen	Differenz vernebelter Phagentiter zu PFU im Filter	Prozent an nicht detektiertem Titer	Mittelwert 5×10^5 bis 5×10^8 PFU vernebeltem Titer	Standardabweichung
$1,00E+03$	≤ 100				
$1,00E+04$	≤ 100				
$1,00E+05$	$1,17E+02$	$9,99E+04$	99,88	99,62	0,19
$1,00E+06$	$5,30E+03$	$9,95E+05$	99,47		
$1,00E+07$	$4,88E+04$	$9,95E+06$	99,51		
$1,00E+08$	$3,90E+05$	$9,96E+07$	99,61		

Die ermittelten Daten belegen, dass über 99 % eines vernebelten Phagentiters per paralleler Luftprobennahme nicht wieder aufgefangen werden. Somit könnten Phagen entweder im Steritube durch Haftung an feuchten Oberflächen und Komponenten zurückgehalten oder durch z.B. Austrocknung inaktiviert werden.

5.4.3 Verweildauer von Phagen in RLT-Anlagenkomponenten

Aufgrund den unter 5.4.2 gewonnenen Erkenntnisse, dass über 99 % eines Phagentiters nach Vernebelung am Steritube nicht mehr nachweisbar sind, sollte analysiert werden, wie lange sich die Phagen MS2 und Phi X174 nach einer einmalig erfolgten Vernebelung noch im Luftstrom nachweisen lassen, wenn der Steritube nach der Vernebelung mit konstanter Geschwindigkeit weiter betrieben wird. Dieses ist insbesondere für die Abschätzung der längerfristigen Infektionsgefahren durch RLT-Anlagen interessant. Tröpfchen eines in die Luft vernebelten Virenlysats, besonders mit kleinem Durchmesser von 1 bis 3,3 μm , wie sie z.B. durch Niesen entstehen, konnten auch nach 24 Stunden noch in der Luft nachgewiesen werden (Ijaz *et al.*, 1987).

Für dieses Experiment wurden Lysate von MS2 mit $4,68 \times 10^{10}$ PFU pro mL und Phi X174 mit $1,85 \times 10^9$ PFU pro mL einmalig für zehn Minuten in den Steritube vernebelt. Die zeitgleiche Luftprobennahme stellte den Zeitpunkt t_0 dar. Anschließend wurde der Steritube mit gleicher Leistung (Luftdurchsatz 300 m^3/h) weiter betrieben und zu den Zeitpunkten t_{60} (60 Minuten nach dem Beginn der Vernebelung), t_{120} , t_{150} , t_{180} , t_{210} , t_{240} , t_{270} und t_{300} eine zehninütige Luftprobennahme am Luftauslass des Steritubes durchgeführt. Die Gelatinefilter der Probennahmen wurden in SM-Puffer gelöst (Kap. 4.2.2) und der Titer bestimmt (Kap. 4.1.4). Parallel dazu wurde DNA (Phi X174) bzw. RNA (MS2) zwei Mal pro Filter isoliert (Kap. 4.3). In quantitativen Real-Time PCRs wurden nach Tab. 4.7 und 4.10 mit dem Primersystem $\Phi\text{X-A}$ (Amplifikatgröße 85 bp, Tab. 4.3) sowie nach Tab. 4.9 und 4.13 mit dem Primersystem MS2-A (Amplifikatgröße 60 bp, Tab. 4.3) die kurzen Amplifikate von Phi X174 und MS2 als Maß für die Gesamt-Genomkopienzahl hergestellt.

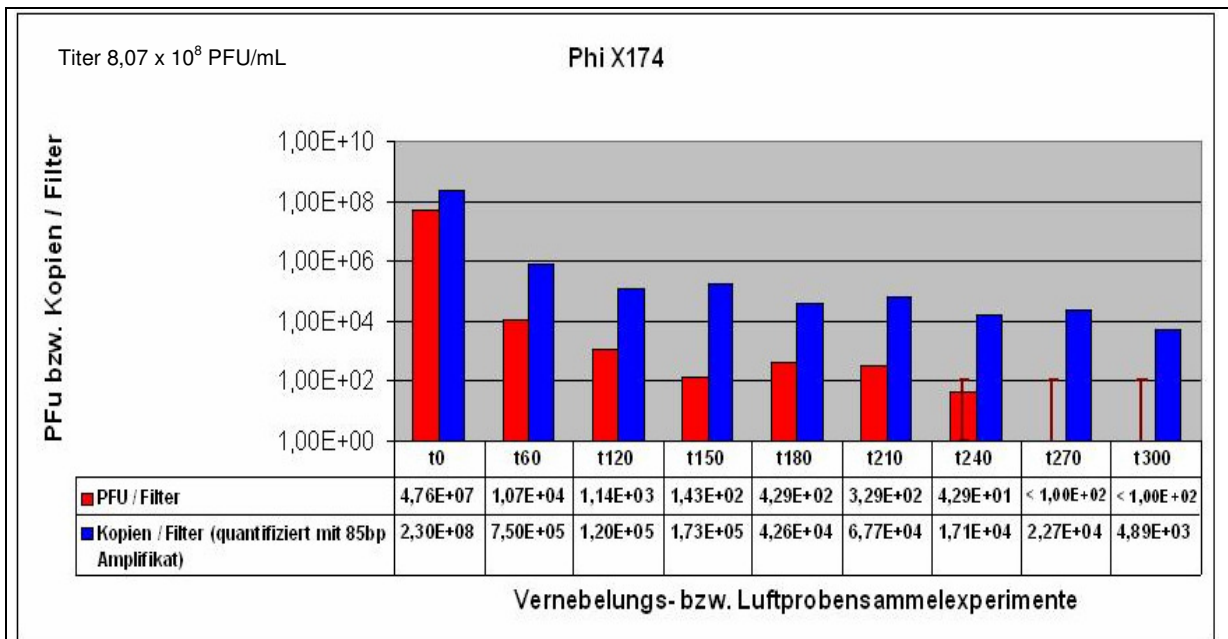


Abb. 5.15: Phi X174 – Verweildauer im Steritube

Darstellung der ermittelten Phagentiter (rote Säulen) und der mittels dem Primersystem Φ X-A (Amplifikatgröße 85 bp) bestimmten Kopienzahlen pro Filter (blaue Säulen); nach Luftprobennahmen zum Zeitpunkt t_0 parallel zu einer Vernebelung sowie zu den Zeitpunkten t_{60} bis t_{300} ohne erneute Vernebelung; die T-förmigen Linien bei t_{240} , t_{270} und t_{300} repräsentieren die untere Nachweisgrenze der PFU-Bestimmung; oben links ist der einmalig zum Zeitpunkt t_0 vernebelte Phi X174-Phagentiter angegeben

In Abb. 5.15 ist dargestellt, dass nach 270 Minuten keine infektiösen Phi X174-Phagen mehr im Luftstrom detektiert werden konnten. Der molekulargenetische Nachweis zeigt jedoch, dass Phi X174-DNA noch nach 300 Minuten nachweisbar war. Die Abnahme an Genomkopien erfolgte nicht kontinuierlich, zwischenzeitlich nahm die in der PCR gemessene Gesamtzahl der Genomkopien im Vergleich zur vorherigen Sammlung leicht zu. Ein zweiter identischer Durchgang bestätigte dieses Ergebnis.

Wird der Phagentiter in absoluten Zahlen betrachtet, so zeigt sich, dass in dem bei der Luftprobennahme parallel zur Vernebelung eingesetzten Gelatinefilter mittels Top-Agar-Methode (Kap. 4.1.2) noch 9,82 % des vernebelten Phi X174-Titers wiedergefunden werden konnten. In dem zum Sammelzeitpunkt t_{60} eingesetzten Filter wurden noch 0,01 % des vernebelten Phi X174-Titers wiedergefunden. Dieses Verhältnis wurde immer geringer, bis zu den Zeitpunkten t_{270} und t_{300} die untere Nachweisgrenze der PFU-Bestimmung erreicht wurde.

Die Daten von MS2 sind mit denen von Phi X174 vergleichbar. In Abb. 5.16 ist zu erkennen, dass infektiöse MS2-Phagen nach 300 Minuten nicht mehr im Luftstrom nachweisbar waren.

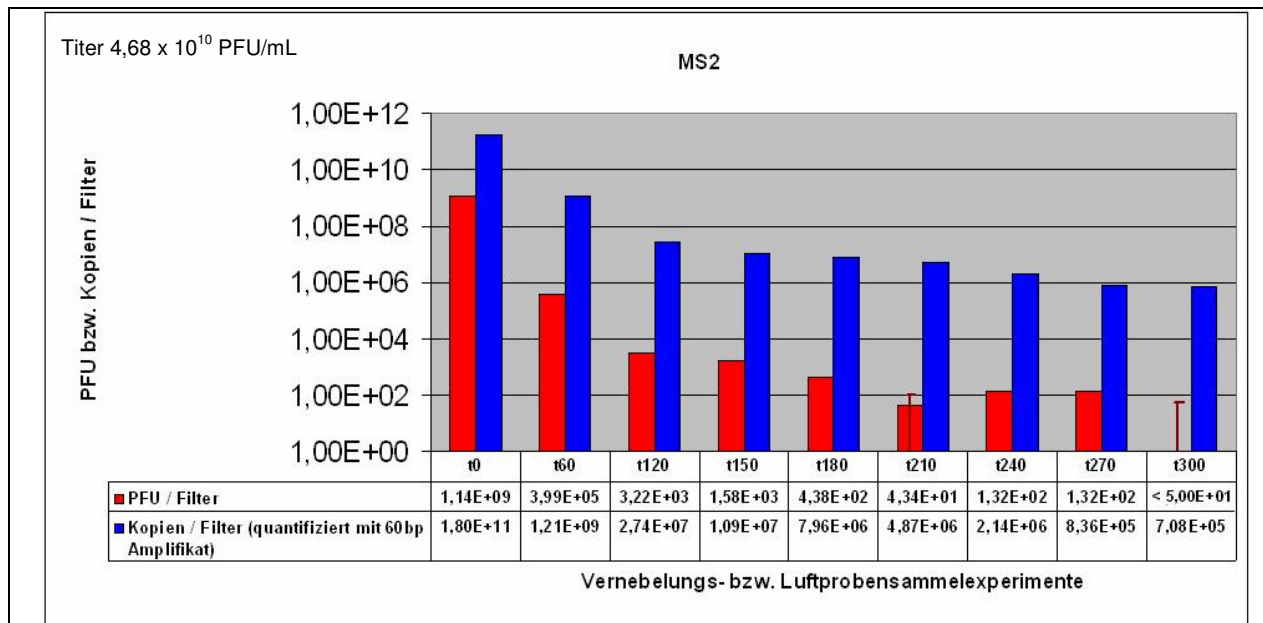


Abb. 5.16: MS2 – Verweildauer im Steritube

Darstellung der ermittelten Phagentiter (rote Säulen) und mittels dem Primersystem MS2-A (Amplifikatgröße 60 bp) bestimmten Kopienzahlen pro Filter (blaue Säulen); nach Luftprobennahmen zum Zeitpunkt t_0 parallel zu einer Vernebelung sowie zu den Zeitpunkten t_{60} bis t_{300} ohne erneute Vernebelung; die T-förmigen Linien bei t_{210} und t_{300} repräsentieren die untere Nachweisgrenze der PFU-Bestimmung; oben links ist der einmalig zum Zeitpunkt t_0 vernebelte MS2-Phagentiter angegeben.

Demnach dauerte es unter den gewählten Bedingungen ca. fünf Stunden, bis nach Vernebelung eines Phagenlysats mit hohem Titer keine infektiösen Phagen mehr nachzuweisen waren. Wenn ein Lysat mit einem niedrigeren Titer vernebelt würde, wäre vermutlich eine kürzere messbare Verweildauer zu erwarten.

5.5 Einfluss von UVC-Bestrahlung des Luftstroms auf die Transmission von Viren

Der Steritube wurde konstruiert, um im Luftstrom einer RLT-Anlage befindliche infektiöse Mikroorganismen und Viren mittels ultravioletter Strahlung zu inaktivieren. Um die Wirksamkeit von den im Steritube installierten UVC-Röhren auf die Inaktivierung von Viren zu testen, wurden Phagenlysate von Phi X174, MS2, Lambda und M13 mit unterschiedlichen Titern durch den Steritube vernebelt. Die unter Kap. 5.4 gewonnenen Erkenntnisse über das Verhalten eines Virenlysats im Aerosol konnten in die Versuchsplanungen mit einfließen. Die UVC-Röhren wurden eingeschaltet, um die Wirkung der UVC-Strahlung auf die Phagentiter

und die ermittelten Kopienzahlen (quantifiziert mit verschiedenen Primersystemen und Amplifikatlängen) Anzahlen amplifizierbarer PCR-Produkte mit verschiedenen Längen aus der Phagen-Nukleinsäure im Aerosol nach Passage des Steritubes zu messen. Zur Kontrolle wurden die UVC-Röhren während der Vernebelungen zum einen mit Aluminiumfolie abgedeckt, so dass kein UVC-Licht, aber die von den Röhren erzeugte Abwärme nach außen drang. Zum anderen wurden die UVC-Röhren während der Vernebelungen ausgeschaltet. Die erhaltenen Werte für die Infektiositäten und die Anzahl der jeweils intakten Genomkopien einer bestimmten Länge wurden miteinander verglichen, um die Effizienz der Desinfektion durch UVC-Licht zu bestimmen. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Vernebelungsexperimente mit den verschiedenen Phagen dargestellt.

5.5.1 Wirkung von UVC-Strahlung auf Phi X174

Es wurden mehrere Lysate von Phi X174 in den Steritube vernebelt und nach Passage der RLT-Anlage aus dem Luftstrom Proben genommen (Kap. 4.2). Die Gelatinefilter wurden in SM-Puffer gelöst und der Titer bestimmt (Kap. 4.1). Parallel wurde je zwei Mal pro Filter DNA isoliert (Kap. 4.3.1). Die DNA wurde in quantitativen Real-Time PCRs nach Tab. 4.6 und 4.7 sowie Tab. 4.10, 4.11 und 4.12 mit den Primersystemen Φ X-A, Φ X-B, Φ X-C und Φ X-D (Amplifikatlängen 85 bp, 402 bp, 593 bp und 1050 bp, Tab. 4.3) eingesetzt. Jede DNA-Probe wurde im Doppelansatz analysiert. Die beiden Werte für die Kopienzahlen einer Probe wurden gemittelt.

Bei der Titerbestimmung zeigte sich, dass die Infektiosität von Phi X174 im Luftstrom während einer Vernebelung mit eingeschalteten UVC-Röhren bei allen Experimenten nahezu vollständig bis unter die Nachweisgrenze reduziert wurde. In Abb. 5.17 ist der Vergleich des Phagentiters mit den intakten Kopienzahlen, welche anhand der 85 bp sowie 1050 bp Amplifikate quantifiziert wurden, gezeigt. Die Einzeldaten der Abbildung stammen je aus einem Vernebelungsexperiment.

Die Differenz zwischen den Gesamtkopienzahlen, welche anhand der 85 bp Amplifikate quantifiziert wurden, war bei bestrahlten und unbestrahlten Proben kleiner als vergleichbare Differenzen intakter Kopienzahlen, die mit dem Primersystem Φ X-D (Amplifikatgröße 1050 bp) bestimmt wurden.

Damit stellen die verwendeten PCR-Systeme geeignete Methoden zur Messung von UVC-Schäden im Phagengenom dar.

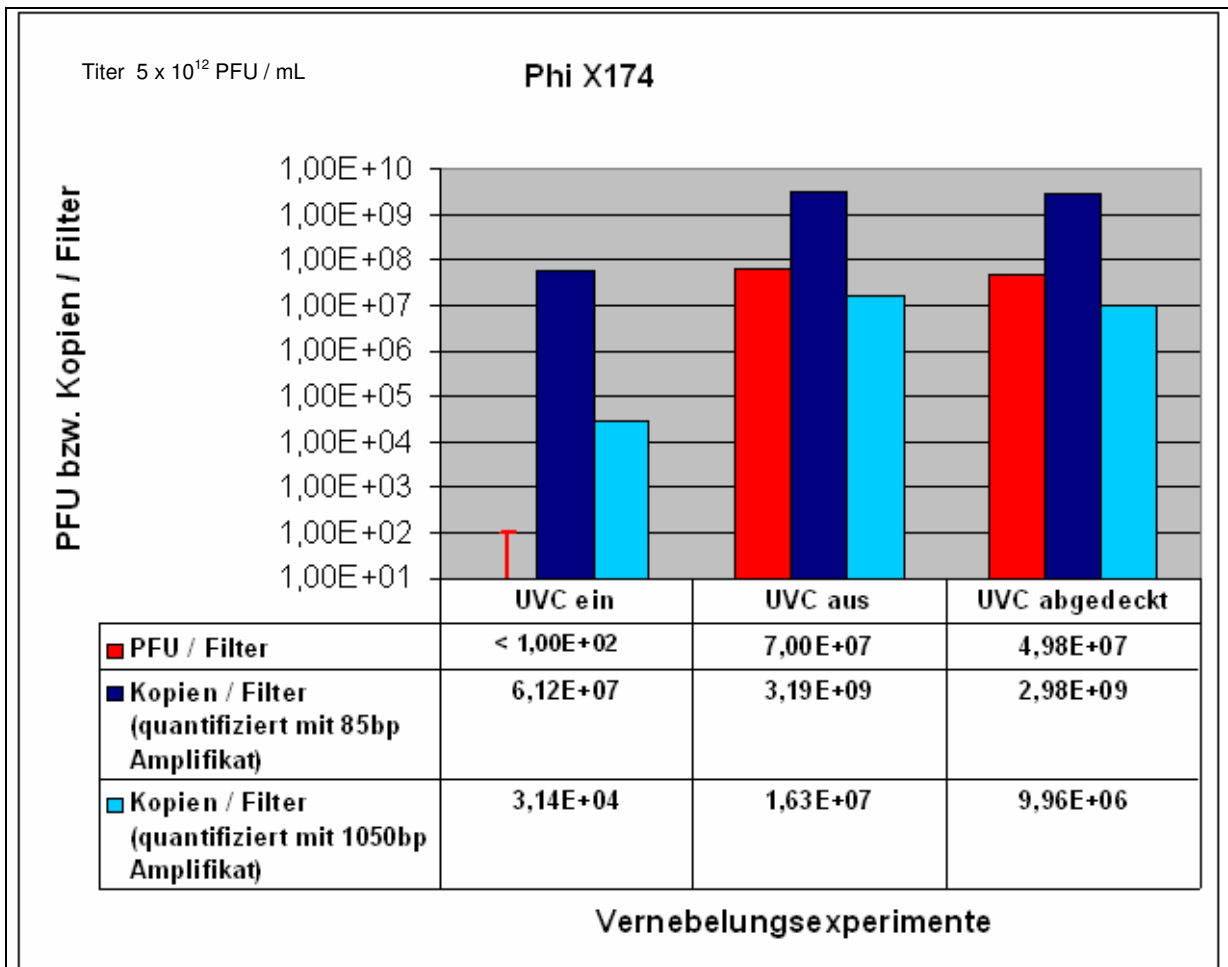


Abb. 5.17: Wirkung von UVC-Strahlung auf die Transmission von Phi X174

Darstellung der ermittelten Phi X174-Phagentiter (rote Säulen) und mittels den Primersystemen Φ X-A (Amplifikatgröße 85 bp, dunkelblaue Säulen) und Φ X-D (Amplifikatgröße 1050 bp, hellblaue Säulen) bestimmten Kopienzahlen pro Filter von nach verschiedenen Vernebelungsexperimenten mit und ohne UVC-Bestrahlung des Luftstroms sowie eingeschalteten, abgedeckten UVC-Röhren; die T-förmige Linie repräsentiert die untere Nachweisgrenze der PFU-Bestimmung, oben links ist der vernebelte Phi X174-Phagentiter angegeben.

In einer weiteren Vernebelung von Phi X174 wurden vergleichbare Daten gewonnen. Es wurde Lysat mit einem Titer von $3,00 \times 10^8$ PFU / mL vernebelt. In Abb. 5.18 sind die gemessenen Fluoreszenzkurven einer Real-Time PCR am Rotor-Gene mit dem Primersystem Φ X-A (Amplifikatgröße 85 bp, Tab. 4.3) gezeigt (Legende s. Tab. 5.6). Während die DNA-Proben der unbestrahlten Proben keine signifikanten Unterschiede im ct-Wert aufwiesen, lagen die ct-Werte der bestrahlten Proben deutlich hinter den unbestrahlten Proben. Es wurde jeweils durch einen grünen Pfeil die Punkte des Schwellenübertritts für unbestrahlte Proben gekennzeichnet, während bestrahlte Proben jeweils durch einen roten Pfeil kenntlich gemacht wurden.

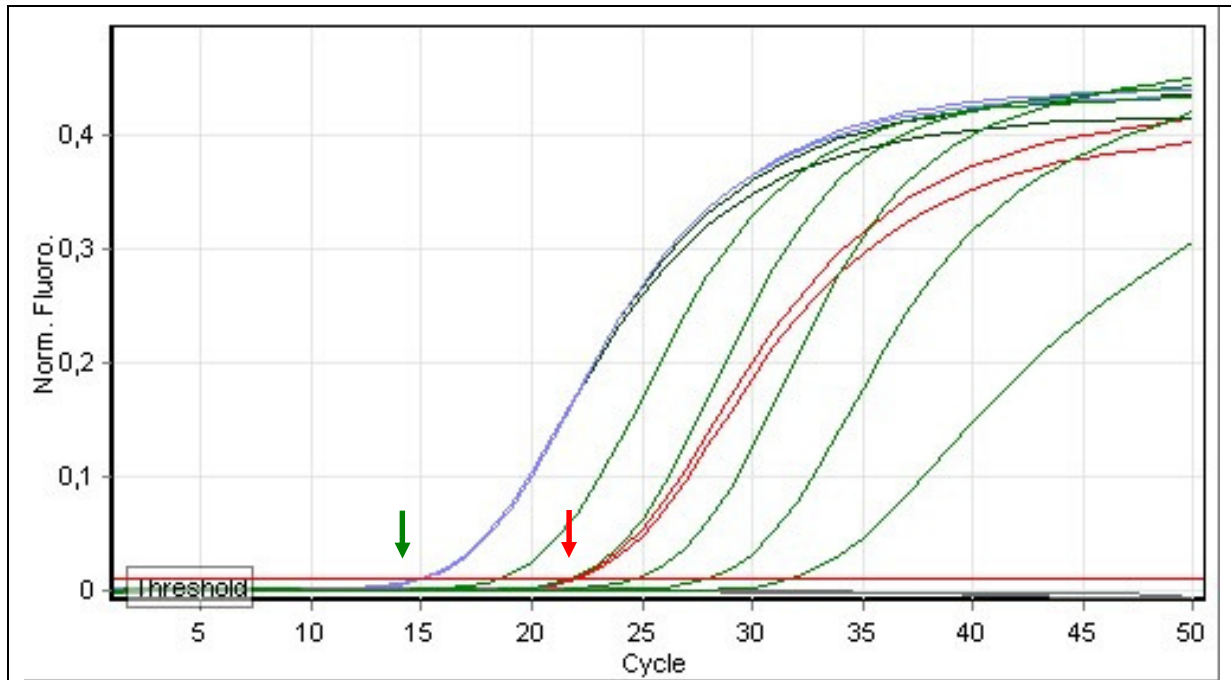


Abb. 5.18: Fluoreszenzkurvendiagramm einer Phi X174-PCR (85 bp Amplifikatlänge)

Fluoreszenzkurvendiagramm einer quantitativen Real-Time PCR mit dem Primersystem Φ X-A (85 bp Amplifikatlänge) am Rotor-Gene, gemessen im FAM-Kanal; auf der Ordinate ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse sind die PCR-Zyklen angegeben, der grüne Pfeil markiert die Punkte des Schwellenübertritts (ct-Werte) der unbestrahlten Proben, der rote Pfeil markiert die ct-Werte der mit UVC bestrahlten Proben, Probenreihenfolge s. Tab. 5.6; zu erkennen sind außerdem die in ihren ct-Werten abgestuft gleichmäßig positiv werdenden Kurven der Standards mit 10^8 bis 10^4 Kopien pro mL und die nicht positiven Negativkontrollen.

Tab. 5.6: Probenreihenfolge der Fluoreszenzkurven in Abb. 5.18, gemessen im FAM-Kanal

Nr.	Farbe	Proben des 85 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL	Nr.	Farbe	Proben des 85 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL
1	■	UVC eingeschaltet a)	21,90	$8,97 \times 10^6$	8	■	Negativkontrolle H ₂ O b)	> 50	$< 1,00 \times 10^4$
2	■	UVC eingeschaltet b)	22,20	$7,28 \times 10^6$	9	■	Standard – 10^8 Kopien pro mL	18,60	$9,04 \times 10^7$
3	■	UVC ausgeschaltet a)	15,15	$1,01 \times 10^9$	10	■	Standard – 10^7 Kopien pro mL	21,77	$9,79 \times 10^6$
4	■	UVC ausgeschaltet b)	15,13	$1,03 \times 10^9$	11	■	Standard – 10^6 Kopien pro mL	24,80	$1,17 \times 10^6$
5	■	UVC nur Wärmeeffekt a)	15,23	$9,57 \times 10^8$	12	■	Standard – 10^5 Kopien pro mL	28,10	$1,16 \times 10^5$
6	■	UVC nur Wärmeeffekt b)	15,02	$1,12 \times 10^9$	13	■	Standard – 10^4 Kopien pro mL	31,87	$8,30 \times 10^3$
7	■	Negativkontrolle H ₂ O a)	> 50	$< 1,00 \times 10^4$					

Die anhand des 85 bp Amplifikats quantifizierten Kopienzahlen pro mL wurden anhand der Standards von der Rotor-Gene Software berechnet. Dabei wird eine Regressionsgerade (Kap. 5.2.3) erzeugt; zu Abb. 5.18 ist diese in Abb. 5.19 gezeigt.

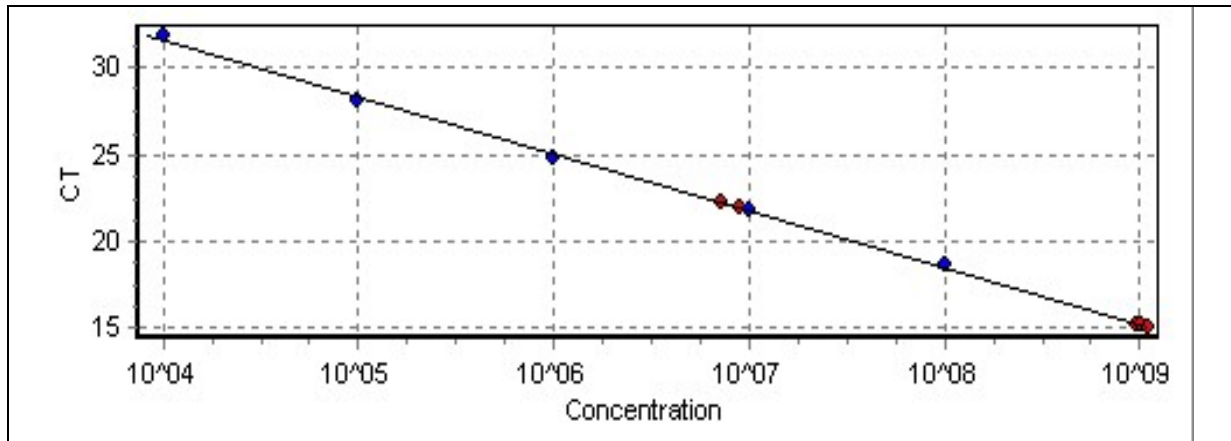


Abb. 5.19: Regressionsgerade einer quantitativen Real-Time PCR

Von der Rotor-Gene Software berechnete Regressionsgerade der quantitativen Real-Time PCR in Abb. 5.18, Tab. 5.6, auf der Ordinate sind die ct-Werte, auf der Abszisse ist die Konzentration (Kopien / mL) angegeben, die blauen Punkte stellen die eingesetzten Standards dar, die roten Punkte die zu quantifizierenden Proben der Phi X174-DNA

Diese PCR wurde, da das kurze Amplifikat von Phi X174 generiert wurde, mit einer IC versehen. Die IC wird zur Erkennung von PCR-Inhibitoren verwendet, sie wird im selben Reaktionsgefäß neben den spezifischen Produkten koamplifiziert (Kap. 5.2.2). Die IC wurde im JOE-Kanal gemessen. In Abb. 5.20 ist zu erkennen, dass das Amplifikat der IC-Reaktion entstand, da alle Proben, insbesondere auch die im FAM-Kanal nicht positiven Negativkontrollen, einen im JOE-Kanal detektierten Fluoreszenzanstieg und somit einen ct-Wert aufwiesen. Als Legende dient Tab. 5.6.

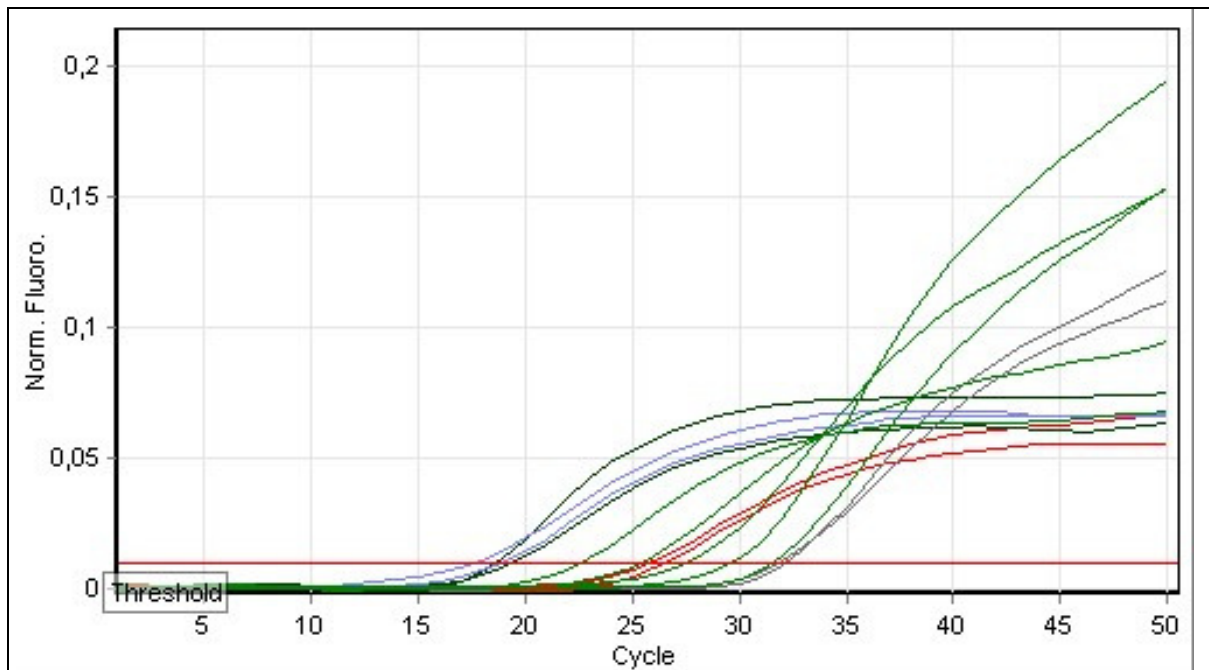


Abb. 5.20: Fluoreszenzkurvendiagramm einer IC-Reaktion in einer PCR

Fluoreszenzkurvendiagramm der IC-Reaktion der spezifischen Nachweisreaktion aus der quantitativen Real-Time PCR (Abb. 5.18, Tab. 5.6) mit dem Primersystem der IC (Amplifikatgröße 82 bp, Watzinger *et al.*, 2004) am Rotor-Gene, gemessen im JOE-Kanal; auf der Ordinate ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse sind die PCR-Zyklen angegeben, alle Fluoreszenzkurven steigen über den Schwellenwert (Threshold, rote Linie), Probenreihenfolge s. Tab. 5.6.

Die ermittelten PFU pro Filter lagen bei abgedeckten UV-Röhren bei $3,90 \times 10^6$, bei ausgeschalteten UV-Röhren bei $1,45 \times 10^7$ sowie bei eingeschalteten UV-Röhren unterhalb der Nachweisgrenze.

Neben dem kurzen 85 bp Amplifikat wurde das lange 1050 bp Amplifikat mit den gleichen DNA-Proben wie in Abb. 5.18 und dem Primersystem Φ X-D nach Tab. 4.6 und 4.12 am Rotor-Gene generiert. Das 1050 bp Amplifikat war das längste Amplifikat von Phi X174-DNA, welches in einer quantitativen Real-Time PCR generiert werden konnte, da in die Plasmide der Standards das identische Produkt von 1050 bp Länge inseriert worden war (Kap. 5.2.3). In Abb. 5.21 sind die erhaltenen Fluoreszenzkurven des 1050 bp Produktes in einer Real-Time PCR am Rotor-Gene gezeigt (Legende s. Tab. 5.7). Zu erkennen sind in Abb. 5.21 neben den Kurven der Standards die sich in ihren ct-Werten kaum unterscheidenden Fluoreszenzkurven der ausgeschalteten und abgedeckten UVC-Röhren.

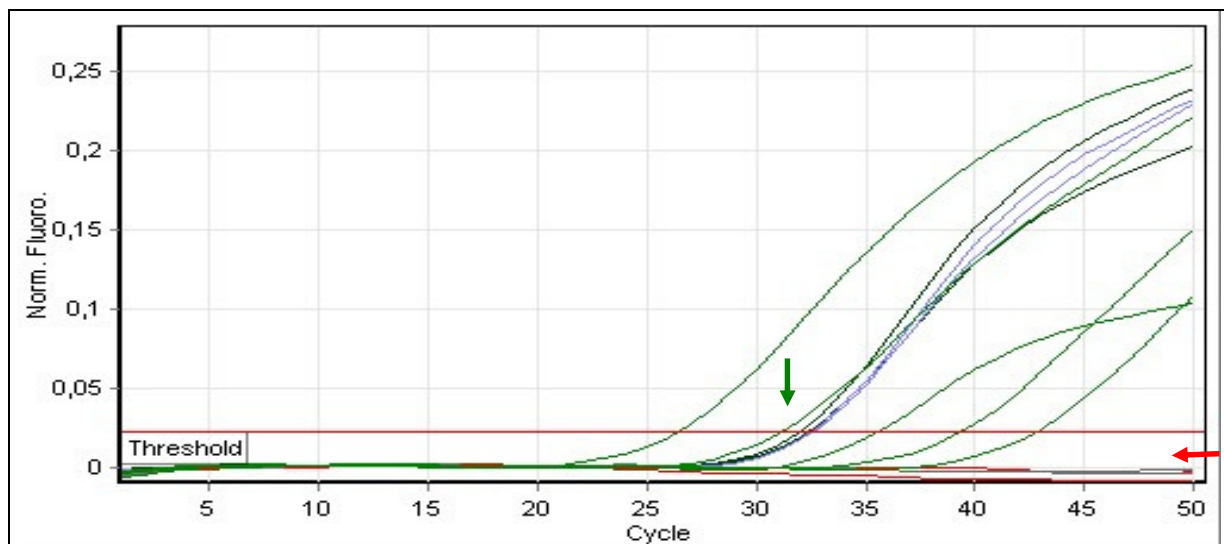


Abb. 5.21: Fluoreszenzkurvendigramm einer Phi X174-PCR (1050 bp Amplifikatlänge)

Fluoreszenzkurvendigramm einer quantitativen Real-Time PCR mit dem Primersystem Φ X-D (1050 bp Amplifikatlänge) am Rotor-Gene, gemessen im FAM-Kanal; auf der Ordinate ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse sind die PCR-Zyklen angegeben, der grüne Pfeil markiert die Punkte des Schwellenübertritts (ct-Werte) der unbestrahlten Proben, der rote Pfeil verweist auf die nicht den Schwellenwert (Threshold, rote Linie) übersteigenden Fluoreszenzkurven der mit UVC bestrahlten Proben, Probenreihenfolge s. Tab. 5.7.

Tab. 5.7: Probenreihenfolge der Fluoreszenzkurven in Abb. 5.21, gemessen im FAM-Kanal

Nr.	Farbe	Proben des 1050 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL	Nr.	Farbe	Proben des 1050 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL
1	■	UVC eingeschaltet a)	> 50	$< 1,00 \times 10^4$	8	■	Negativkontrolle H ₂ O b)	> 50	$< 1,00 \times 10^4$
2	■	UVC eingeschaltet b)	> 50	$< 1,00 \times 10^4$	9	■	Standard – 10^8 Kopien pro mL	26,49	$1,26 \times 10^8$
3	■	UVC ausgeschaltet a)	32,00	$5,64 \times 10^6$	10	■	Standard – 10^7 Kopien pro mL	31,14	$9,13 \times 10^6$
4	■	UVC ausgeschaltet b)	32,35	$4,63 \times 10^6$	11	■	Standard – 10^6 Kopien pro mL	35,53	$7,68 \times 10^5$
5	■	UVC nur Wärmeeffekt a)	32,49	$4,26 \times 10^6$	12	■	Standard – 10^5 Kopien pro mL	39,38	$8,77 \times 10^4$
6	■	UVC nur Wärmeeffekt b)	32,58	$4,04 \times 10^6$	13	■	Standard – 10^4 Kopien pro mL	42,77	$1,29 \times 10^4$
7	■	Negativkontrolle H ₂ O a)	> 50	$< 1,00 \times 10^4$					

Aus den gezeigten Daten der Vernebelungsexperimente konnte entnommen werden, dass der Wärmeeffekt der UVC-Röhren keinen Einfluss auf die Infektiosität und die

Genomkopienzahlen hat. Somit konnten die erhaltenen Werte der ausgeschalteten UVC-Röhren mit denen der eingeschalteten UVC-Röhren direkt verglichen werden.

Um zu testen, ob bei einer längeren Vernebelung mit paralleler Luftprobensammlung unter UVC-Bestrahlung im Steritube ein Phagentiter nachzuweisen ist, wurde in einem weiteren Experiment Phi X174-Lysat mit $3,00 \times 10^8$ PFU pro mL für zehn und für zwanzig Minuten bei eingeschalteten UVC-Röhren in den Steritube vernebelt und parallel zur Vernebelung Luftproben genommen. Es zeigte sich, dass in keinem Filter von Luftprobennahmen mit eingeschalteten UVC-Röhren infektiöse Phagen nachgewiesen werden konnten, während mittels quantitativer Real-Time PCR am Rotor-Gene Phi X174-DNA nur mit Hilfe des kurzen Amplifikats (85 bp Länge) quantifiziert werden konnte. Die ermittelten Kopienzahlen betragen für das zehnminütige Vernebelungsexperiment mit UVC-Bestrahlung $1,05 \times 10^7$ Kopien pro Filter und für das zwanzigminütige Vernebelungsexperiment mit UVC-Bestrahlung $1,36 \times 10^7$ Kopien pro Filter. Dieses Ergebnis entspricht den unter 5.5.2 ermittelten Wiederfindungsraten (Abb. 5.14) ohne UVC-Bestrahlung, was eine Bestätigung für die Eignung kurzer Amplifikate zum Nachweis eines gesamten Nukleinsäuregehalts ist. Es zeigte sich, dass auch bei verdoppelter Vernebelungsdauer nur wenig mehr intakte Genomkopien unter Verwendung des 85 bp Amplifikats im Luftprobenfilter quantifizierbar waren.

In Tab. 5.9 sind die mittleren Reduktionen an PFU ($n = 3$) und der Genomkopien quantifiziert durch PCR mit Amplifikatlängen von 85 bp ($n = 5$), 402 bp ($n = 3$), 592 bp ($n = 3$) und 1050 bp ($n = 5$) in Prozent gegenüber unbestrahlten Proben gezeigt. Die doppelt bestimmten Kopienzahlen aus einer PCR wurden dazu gemittelt. Die Anzahl n bezieht sich auf die Anzahl der PCRs.

Tab. 5.8: Phi X174 mittlere Reduktion des Titers und der Genomkopien (quantifiziert mit verschiedenen Amplifikatlängen)	
Titer bzw. Kopien / Filter	Mittlere Reduktionen
PFU / Filter	100,00 ± 0,00 %
Kopien quant. mit 85 bp Amplifikat	96,95 ± 2,14 %
Kopien quant. mit 402 bp Amplifikat	99,98 ± 0,03 %
Kopien quant. mit 593 bp Amplifikat	99,98 ± 0,02 %
Kopien quant. mit 1050 bp Amplifikat	99,96 ± 0,08 %

Mittlere Reduktion des Titers und der Anzahlen an molekulargenetisch nachweisbaren intakten Genomkopien von Phi X174 durch UVC-Bestrahlung im Steritube in Prozent, quantifiziert mittels verschiedener Primersysteme, welche Amplifikate der angegebenen Längen generieren, ausgehend von den Mittelwerten der jeweiligen Vergleichswerte aus Vernebelungsexperimenten ohne Einsatz von UVC-Licht, die Standardabweichungen wurden mit angegeben .

Die Infektiosität von Phi X174 wurde durch UVC-Strahlung im Steritube während der Vernebelungsexperimente mit UVC-Bestrahlung vollständig unter die Nachweisgrenze reduziert. Die Reduktion der Genomkopien durch UVC-Bestrahlung nahm mit steigender Amplifikatlänge zu (Tab. 5.8), was mit potentiell entstandenen Nukleinsäureschäden korreliert, da die Auftretungswahrscheinlichkeit von UVC-Schäden mit steigender Länge eines Nukleinsäureabschnitts zunimmt. Aus den gewonnenen Daten geht hervor, dass die Infektiosität von DNA-Phagen wie Phi X174 durch UVC-Bestrahlung des Luftstroms signifikant reduziert wird, und dass die Phagen-Inaktivierung mit den anhand der verwendeten Primersysteme quantifizierten Genomkopienzahlen korreliert.

5.5.2 Wirkung von UVC-Strahlung auf MS2

Es wurde in zwei Vernebelungsexperimenten MS2-Lysat mit $5,00 \times 10^{10}$ PFU pro mL in den Steritube vernebelt und aus dem Luftstrom Luftproben genommen (Kap. 4.2). Die Gelatinefilter wurden aufgearbeitet und der Titer bestimmt (Kap. 4.1). Vor Beginn der Phagenvernebelung wurde reiner SM-Puffer als Leerkontrolle vernebelt, um eventuell im Steritube vorhandene Nukleinsäure aus vorangegangenen Durchgängen zu detektieren. Parallel wurde je zwei Mal pro Filter RNA isoliert (Kap. 4.3.2). Die RNA wurde in quantitativen Real-Time RT-PCRs nach Tab. 4.8 und 4.9 sowie Tab. 4.13, 4.14, 4.15 und 4.16 mit den Primersystemen MS2-A bis MS2-F (Amplifikatlängen 60, 201, 542, 805, 1058 und 1675 bp, Tab. 4.3) im Doppelansatz analysiert. Die beiden für die Genomkopienzahlen erhaltenen Werte wurden gemittelt.

Es zeigte sich, dass mit Hilfe der RNA, welche aus dem Filter der Leerkontrolle isoliert wurde, nur noch die kurzen 60 bp Produkte amplifizierbar waren (Abb. 5.22). Die berechnete Kopienzahl pro Gelatinefilter der Leerkontrolle war mit $1,30 \times 10^5$ Kopien pro mL im Vergleich zu der Anzahl an amplifizierbaren Genomkopien (quantifiziert mittels 60 bp Amplifikaten) pro Filter nach Vernebelung von MS2 (mit ausgeschalteten UVC-Röhren im gleichen Experiment) mit $3,28 \times 10^{11}$ Kopien pro mL so gering, dass die aus vorherigen Vernebelungen noch im Steritube vorhandene Nukleinsäure vernachlässigbar war. Die quantitativen Real-Time RT-PCRs der längeren Produkte verliefen für die Proben der Leerkontrolle alle negativ (d. h. ohne Fluoreszenzanstieg), außerdem konnten im Filter der Leerkontrolle keine infektiösen MS2-Phagen nachgewiesen werden.

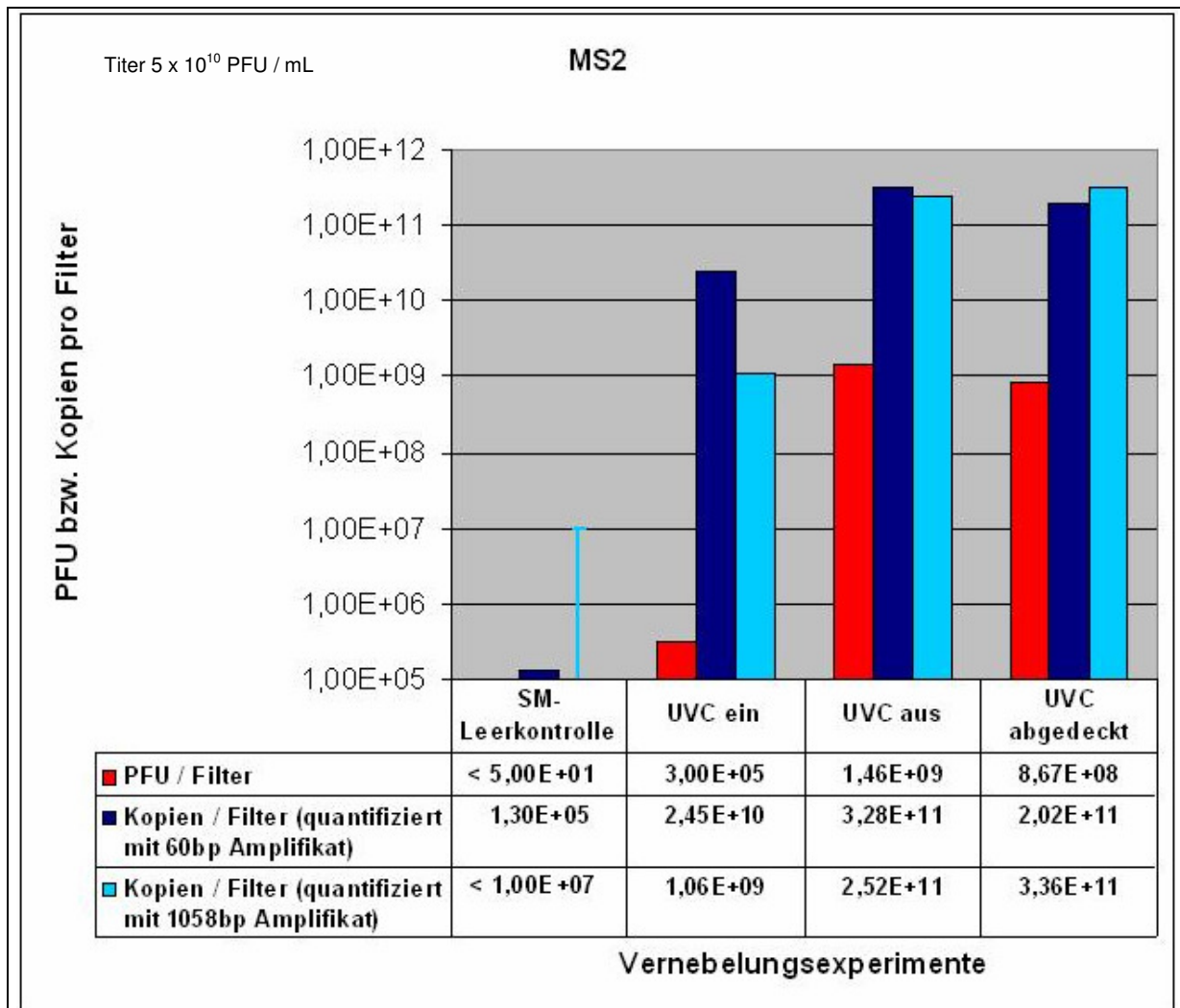


Abb. 5.22: Wirkung von UVC-Strahlung auf die Transmission von MS2

Darstellung der ermittelten Phagentiter (rote Säulen) und mittels den Primersystemen MS2-A (Amplifikatgröße 60 bp, dunkelblaue Säulen) und MS2-D (Amplifikatgröße 1058 bp, hellblaue Säulen) bestimmten Kopienzahlen pro Filter nach verschiedenen Vernebelungsexperimenten mit und ohne UVC-Bestrahlung des Luftstroms sowie eingeschalteten, abgedeckten UVC-Röhren; die T-förmige hellblaue Linie repräsentiert die untere Nachweisgrenze der quantitativen Real-Time PCR, oben links ist der vernebelte MS2-Phagentiter angegeben.

Im Gegensatz zu Phi X174 wurde der Titer von MS2 durch UVC-Bestrahlung in allen Vernebelungsexperimenten nicht unter die Nachweisgrenze reduziert. In Abb. 5.22 ist der ermittelte Phagentiter pro Filter im Vergleich zu den über den molekulargenetischen Nachweis bestimmten Genomkopienzahlen pro Filter unter Zuhilfenahme von Amplifikaten mit 60 bp und 1058 bp Länge dargestellt. Die Einzeldaten stammen je aus einem Vernebelungsexperiment. Während sich die Infektiositäten und Kopienzahlen aus den Vernebelungen mit ausgeschalteten und abgedeckten UVC-Röhren nicht deutlich voneinander unterschieden, waren die ermittelte Infektiosität und die Kopienzahlen aus der bestrahlten Probe deutlich reduziert. Die Differenz zwischen Genomkopienzahlen,

quantifiziert mit einem 60 bp Amplifikat, bei der bestrahlten und den unbestrahlten Proben war geringer als die Differenz zwischen den Genomkopienzahlen, welche mittels Generierung 1058 bp großer Amplifikate bestimmt wurden.

Die aus den Filtern dieses Vernebelungsexperimentes isolierte RNA wurde auch auf Amplifizierbarkeit des 1675 bp Produktes getestet (Primersystem MS2-F, Tab. 4.3). Es stellte sich heraus, dass dieses Amplifikat mit RNA aus den im Steritube vernebelten und bestrahlten MS2-Lysaten nicht herzustellen war. Aus den aus unbestrahlte vernebelten Lysaten isolierten RNA-Proben konnten mit diesem Amplifikat hohe Kopienzahlen von $2,46 \times 10^{12}$ und $2,53 \times 10^{12}$ Kopien pro mL ermittelt werden. Die Daten sind in Tab. 5.9 dargestellt.

Tab. 5.9: Vergleich ermittelter MS2-Titer und Genomkopien quantifiziert anhand des 1675 bp Amplifikats aus drei Vernebelungsexperimenten			
	UVC eingeschaltet	UVC ausgeschaltet	UVC abgedeckt
Ermittelte PFU pro Filter	$3,00 \times 10^5$	$1,46 \times 10^9$	$8,67 \times 10^8$
Kopienzahl pro Filter bestimmt mittels 1675bp Amplifikaten	$< 1,00 \times 10^7$	$2,46 \times 10^{12}$	$2,53 \times 10^{12}$

Die UVC-Wirkung auf die Amplifizierbarkeit der mit den Primersystemen MS2-B und MS2-C (Tab. 4.3) amplifizierbaren Produkte (201 und 542 bp Länge) ist in Abb. 5.23 und Abb. 5.24 dargestellt. Als Legende dienen Tab. 5.10 und Tab. 5.11. In den Abbildungen sind die Fluoreszenzkurven der sich in ihren ct-Werten kaum unterscheidenden Proben der ausgeschalteten und abgedeckten UVC-Röhren, die später ansteigenden Fluoreszenzkurven der Proben bestrahlter RNA sowie die gleichmäßig abgestuft ansteigenden Fluoreszenzkurven der Standards zu erkennen. Es wurde jeweils durch einen grünen Pfeil die Punkte des Schwellenübertritts für unbestrahlte Proben gekennzeichnet, während bestrahlte Proben jeweils durch einen roten Pfeil kenntlich gemacht wurden.

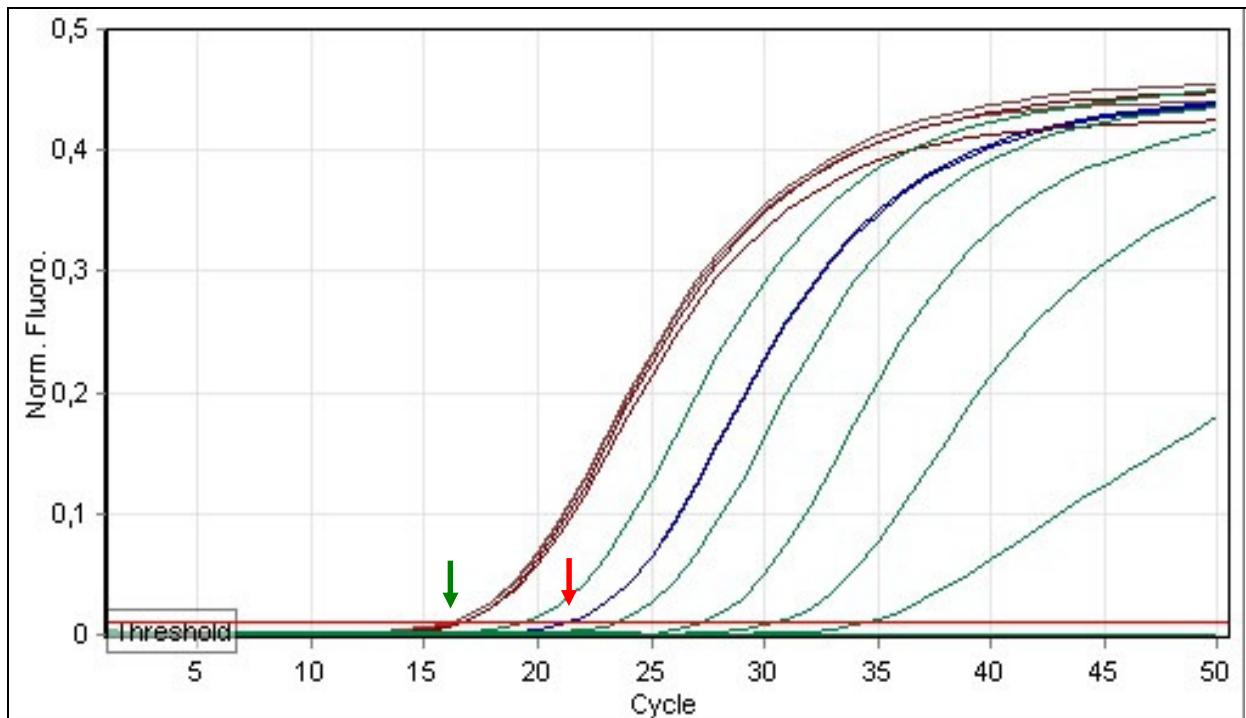


Abb. 5.23: Fluoreszenzkurvendiagramm einer MS2-PCR (201 bp Amplifikatlänge)

Fluoreszenzkurvendiagramm einer quantitativen Real-Time PCR mit dem Primersystem MS2-B (201 bp Amplifikatlänge) am Rotor-Gene, gemessen im FAM-Kanal; auf der Ordinate ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse sind die PCR-Zyklen angegeben, der grüne Pfeil markiert die Punkte des Schwellenübertritts (ct-Werte) der unbestrahlten Proben, der rote Pfeil markiert die ct-Werte der mit UVC bestrahlten Proben, Probenreihenfolge s. Tab. 5.10; zu erkennen sind außerdem die in ihren ct-Werten abgestuft gleichmäßig positiv werdenden Kurven der Standards mit 10^{10} bis 10^5 Kopien pro mL und die nicht positiven Negativkontrollen.

Tab. 5.10: Probenreihenfolge der Fluoreszenzkurven in Abb. 5.23, gemessen im FAM-Kanal

Nr.	Farbe	Proben des 201 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL	Nr.	Farbe	Proben des 201 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL
1	■	UVC ausgeschaltet a)	16,30	$8,03 \times 10^{10}$	8	■	Negativkontrolle H ₂ O b)	> 50	$< 1,00 \times 10^6$
2	■	UVC ausgeschaltet b)	16,28	$8,13 \times 10^{10}$	9	■	Standard - 10^{10} Kopien pro mL	19,52	$1,11 \times 10^{10}$
3	■	UVC eingeschaltet a)	21,44	$3,38 \times 10^9$	10	■	Standard - 10^9 Kopien pro mL	23,56	$9,17 \times 10^8$
4	■	UVC eingeschaltet b)	21,44	$3,39 \times 10^9$	11	■	Standard - 10^8 Kopien pro mL	27,39	$8,71 \times 10^7$
5	■	UVC nur Wärmeeffekt a)	16,74	$6,11 \times 10^{10}$	12	■	Standard - 10^7 Kopien pro mL	30,70	$1,13 \times 10^7$
6	■	UVC nur Wärmeeffekt b)	16,73	$6,15 \times 10^{10}$	13	■	Standard - 10^6 Kopien pro mL	34,65	$9,96 \times 10^5$
7	■	Negativkontrolle H ₂ O a)	> 50	$< 1,00 \times 10^6$	14	■	Standard - 10^5 Kopien pro mL	> 50	$< 1,00 \times 10^6$

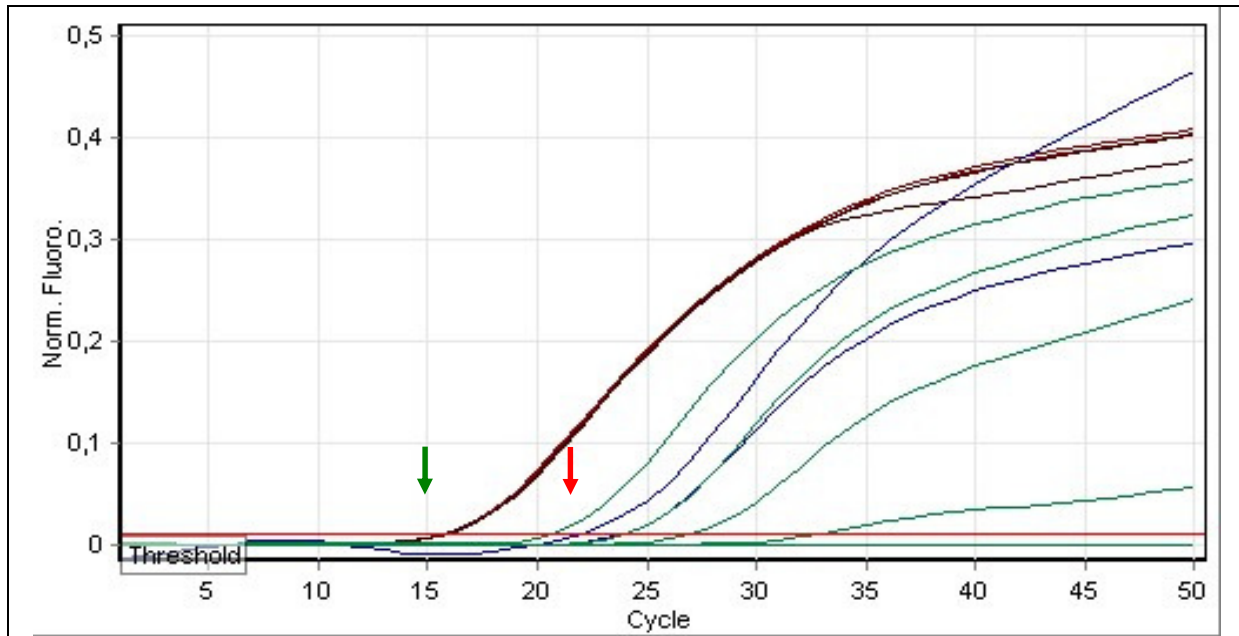


Abb. 5.24: Fluoreszenz kurvendiagramm einer MS2-PCR (542 bp Amplifikatlänge)

Fluoreszenz kurvendiagramm einer quantitativen Real-Time PCR mit dem Primersystem MS2-C (542 bp Amplifikatlänge) am Rotor-Gene, gemessen im FAM-Kanal; auf der Ordinate ist die Fluoreszenz, auf der Abszisse sind die PCR-Zyklen angegeben, der grüne Pfeil markiert die Punkte des Schwellenübertritts (ct-Werte) der unbestrahlten Proben, der rote Pfeil markiert die ct-Werte der mit UVC bestrahlten Proben, Probenreihenfolge s. Tab. 5.11.

Tab. 5.11: Probenreihenfolge der Fluoreszenzkurven in Abb. 5.24, gemessen im FAM-Kanal

Nr.	Farbe	Proben des 542 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL	Nr.	Farbe	Proben des 542 bp Amplifikats	ct-Wert	Berechnete Kopienzahl pro mL
1	■	UVC ausgeschaltet a)	15,72	$1,39 \times 10^{11}$	8	■	Negativkontrolle H ₂ O b)	> 50	$< 1,00 \times 10^7$
2	■	UVC ausgeschaltet b)	15,65	$1,44 \times 10^{11}$	9	■	Standard - 10^{10} Kopien pro mL	20,68	$7,62 \times 10^9$
3	■	UVC eingeschaltet a)	23,90	$1,15 \times 10^9$	10	■	Standard - 10^9 Kopien pro mL	24,00	$1,09 \times 10^9$
4	■	UVC eingeschaltet b)	21,88	$3,78 \times 10^9$	11	■	Standard - 10^8 Kopien pro mL	26,97	$1,91 \times 10^8$
5	■	UVC nur Wärmeeffekt a)	15,87	$1,27 \times 10^{11}$	12	■	Standard - 10^7 Kopien pro mL	32,80	$6,31 \times 10^6$
6	■	UVC nur Wärmeeffekt b)	15,75	$1,36 \times 10^{11}$	13	■	Standard - 10^6 Kopien pro mL	> 50	$< 1,00 \times 10^7$
7	■	Negativkontrolle H ₂ O a)	> 50	$< 1,00 \times 10^7$	14	■	Standard - 10^5 Kopien pro mL	> 50	$< 1,00 \times 10^7$

Insgesamt betrachtet konnten deutliche Wirkungen der UVC-Bestrahlung festgestellt werden. Die mittlere Reduktion des MS2-Titers im Vergleich zu unbestrahlten Proben betrug $99,97 \pm 0,01 \%$ ($n = 2$). Die bestimmten Genomkopienzahlen nahmen mit steigender Amplifikatlänge, mit deren sie quantifiziert wurden, kontinuierlich ab. Die Reduktionsraten sind in Tab. 5.12 und graphisch in Abb. 5.25 dargestellt.

Tab. 5.12: MS2 mittlere Reduktionen des Titers und der Genomkopien (quantifiziert mit verschiedenen Amplifikatlängen)

Titer bzw. Kopien / Filter	Mittlere Reduktionen
PFU / Filter	$99,97 \pm 0,01 \%$
Kopien quant. mit 60 bp Amplifikat	$92,57 \pm 2,12 \%$
Kopien quant. mit 201 bp Amplifikat	$97,34 \pm 1,86 \%$
Kopien quant. mit 542 bp Amplifikat	$99,36 \pm 0,60 \%$
Kopien quant. mit 1058 bp Amplifikat	$99,86 \pm 0,20 \%$
Kopien quant. mit 1675 bp Amplifikat	$100,00 \pm 0,00 \%$

Mittlere Reduktion des Titers und der Anzahlen an molekulargenetisch nachweisbaren intakten Genomkopien von MS2 durch UVC-Bestrahlung im Steritube in Prozent, quantifiziert mittels verschiedener Primersysteme, welche Amplifikate der angegebenen Längen generieren, ausgehend von den Mittelwerten der jeweiligen Vergleichswerte aus Vernebelungsexperimenten ohne Einsatz von UVC-Licht, die Standardabweichungen wurden mit angegeben.

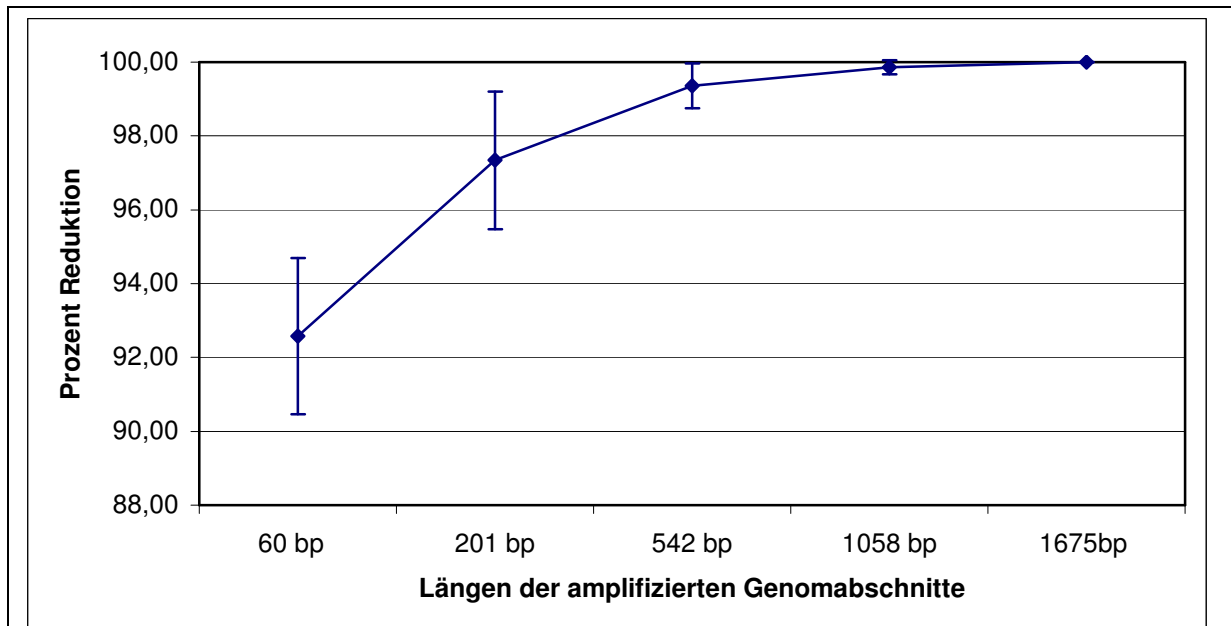


Abb. 5.25: Größenabhängige Reduktion der Amplifizierbarkeit von MS2-Genomabschnitten nach UVC-Bestrahlung in Prozent

Graphische Darstellung der mittleren Reduktionen der Kopienzahlen von mittels Amplifikaten der Längen von 60, 201, 542, 1058 und 1675 bp quantifizierten MS2-Genomkopien durch UVC-Bestrahlung im Steritube in Prozent, ausgehend von den Mittelwerten der jeweiligen Vergleichswerte aus Vernebelungsexperimenten ohne Einsatz von UVC-Licht, die T-förmigen Linien stellen die Standardabweichungen dar (Daten s. Tab. 5.12).

Aus den gewonnenen Daten geht hervor, dass auch die Infektiosität von RNA-Phagen wie MS2 durch UVC-Bestrahlung des Luftstroms signifikant reduziert wird, und dass sich die Phagen-Inaktivierung in den mittels der verwendeten Primersysteme quantifizierten Genomkopienzahlen widerspiegelt.

5.5.3 Wirkung von UVC-Strahlung auf Lambda

Da sich die kleinen und kompakt (Durchmesser < 30 nm) aufgebauten Phagen Phi X174 und MS2 gut über den Steritube übertragen ließen und deutliche UVC-bedingte Inaktivierungen gemessen werden konnten (Kap. 5.5.1 und 5.5.2), wurde das Augenmerk auf komplexer aufgebaute Phagen gerichtet. Der Phage Lambda ist mit seiner Kopf-Schwanz-Struktur deutlich anfälliger gegenüber Scherkräften, wie sie bei dem Vorgang der Kollisionsvernebelung auftreten könnten. Hierbei war insbesondere die Fragestellung interessant, ob sich bei Vernebelung von komplexer aufgebauten Phagen in den Steritube deren Infektiosität überhaupt erhalten lässt.

In insgesamt drei Experimenten wurden Lysate von Lambda mit $3,20 \times 10^8$, $4,40 \times 10^8$ und $2,65 \times 10^6$ PFU pro mL in den Steritube (Kap. 2.6) vernebelt und parallel Luftproben genommen (Kap. 4.2). Zu Beginn wurde SM-Puffer als Leerkontrolle in den Steritube vernebelt. Die Vernebelungen der Lysate erfolgten bei ein- und ausgeschalteten UVC-Röhren. Anschließend wurden die Gelatinefilter in SM-Puffer gelöst und der Titer bestimmt (Kap. 4.1). Pro Filter wurde je zwei Mal DNA isoliert (Kap. 4.3.1), welche in quantitativen Real-Time PCRs am Rotor-Gene nach Tab. 4.6 und 4.7 sowie Tab. 4.17, 4.18 und 4.19 mit den Primersystemen Λ -A bis Λ -D (Amplifikatlängen 277, 877, 1077 und 1677 bp, Tab. 4.3) eingesetzt wurde. Jede DNA-Probe wurde im Doppelansatz analysiert, wobei die beiden für die Genomkopienzahlen erhaltenen Werte gemittelt wurden.

Die Infektiosität von Lambda ließ sich durch UVC-Bestrahlung im Steritube während eines Vernebelungsexperimentes nahezu vollständig unter die Nachweisgrenze reduzieren. In zwei Experimenten konnten in den Filtern aus Luftprobensammlungen mit bestrahlten Lambda-Phagen keine infektiösen Phagen nachgewiesen werden. Aus vergleichbaren unbestrahlten Kontrollen konnten Lambda-Titer von $2,04 \times 10^5$ und $1,28 \times 10^5$ PFU pro Filter ermittelt werden. In einem Fall lag der ermittelte Titer einer Filterprobe von bestrahltem Lambda-Aerosol bei $2,00 \times 10^3$ PFU pro Filter, der erhaltene Titer der vergleichbaren unbestrahlten Probe des selben Lysats lag bei $3,38 \times 10^7$ PFU pro Filter (Tab. 5.13).

Es zeigte sich, dass auch der komplexer aufgebaute Phage Lambda mit ähnlicher Effizienz über den Steritube übertragen wurde wie die kleineren und kompakteren Phagen Phi X174 und MS2.

Aus der DNA, welche aus dem Luftprobenfilter der SM-Puffer-Leerkontrolle isoliert wurde (Kap. 4.3), konnte in der Lambda-spezifischen Real-Time PCR nur das 277 bp Produkt amplifiziert werden. Die von der Rotor-Gene Software berechneten Kopienzahlen lagen jedoch um mehrere Zehnerpotenzen unter denen der Proben, so dass die Kontamination des Steritubes mit Lambda-DNA aus vorhergehenden Vernebelungen vernachlässigt werden konnte.

Tab. 5.13: Ermittelter Lambda-Titer in PFU pro Filter aus drei Paaren von Vernebelungsexperimenten (1. bis 3.)		
Experimentpaare	UVC ausgeschaltet PFU / Filter	UVC eingeschaltet PFU / Filter
1.	$2,04 \times 10^5$	$< 1,00 \times 10^2$
2.	$1,28 \times 10^5$	$< 1,00 \times 10^2$
3.	$3,38 \times 10^7$	$2,00 \times 10^3$

Von isolierter Lambda-DNA aus bestrahlten Proben konnte nur das 277 bp Produkt generiert werden, während Amplifikate mit 877, 1077 und 1661 bp lediglich aus DNA von unbestrahlten Proben erzeugt werden konnten. In Abb. 5.26 sind aus diesem Grund der bestimmte Phagentiter nur mit den per quantitativer Real-Time PCR am Rotor-Gene ermittelten Lambda-Genomkopienzahlen, welche anhand der Primersysteme Λ -A und Λ -B (Amplifikatlängen 277 bp und 877 bp) aus einem Paar von zwei Vernebelungsexperimenten mit unterschiedlichen UVC-Bedingungen quantifiziert wurden, zur Verdeutlichung der UVC-Wirkung verglichen.

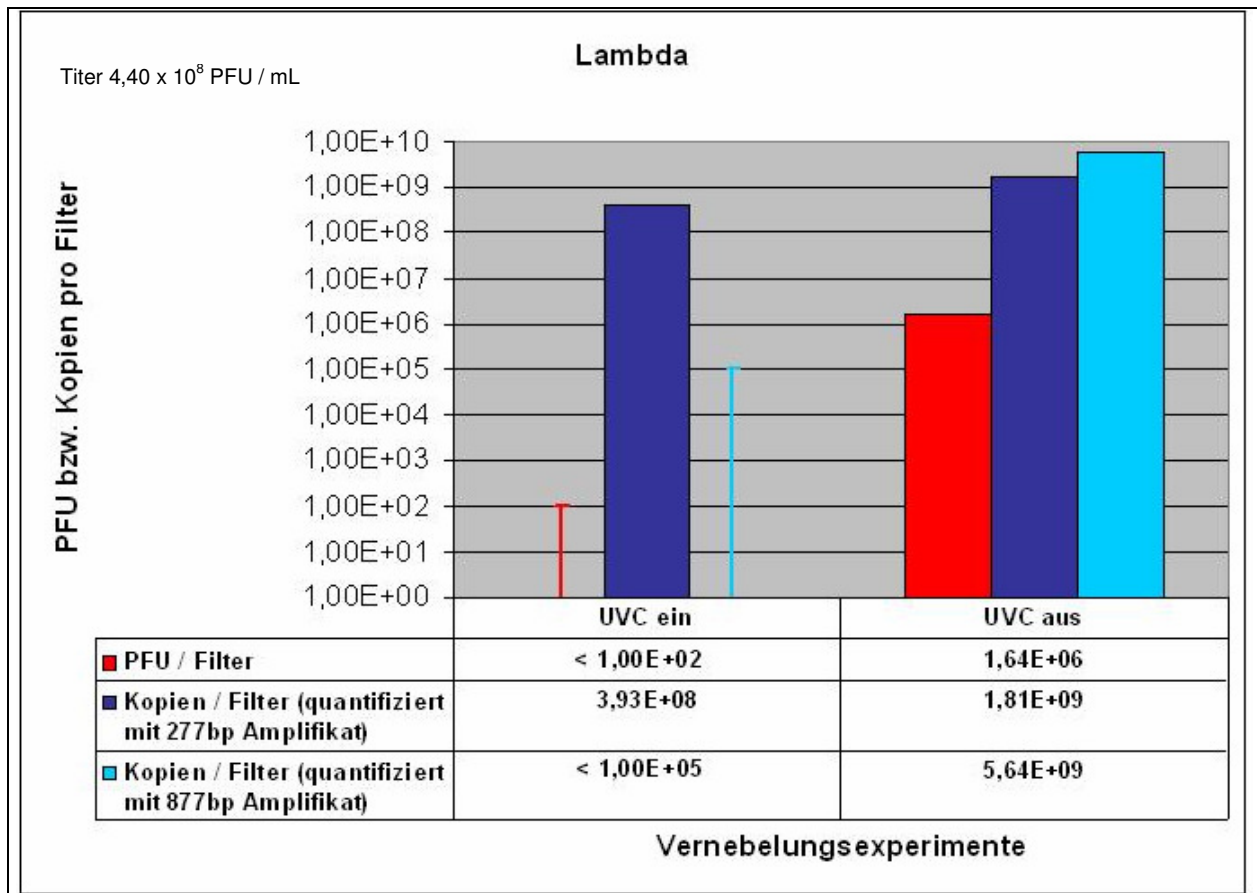


Abb. 5.26: Wirkung von UVC-Strahlung auf die Transmission von Lambda

Darstellung der ermittelten Phagentiter (rote Säulen) und mittels den Primersystemen Λ -A (Amplifikatgröße 277 bp, dunkelblaue Säulen) und Λ -B (Amplifikatgröße 877 bp, hellblaue Säulen) bestimmten Kopienzahlen pro Filter nach verschiedenen Vernebelungsexperimenten mit und ohne UVC-Bestrahlung des Luftstroms; die T-förmigen Linien repräsentieren die unteren Nachweisgrenzen der PFU-Bestimmung und der quantitativen Real-Time PCR, oben links ist der vernebelte Lambda-Phagentiter angegeben.

Die Infektiosität der Phagen wurde durch UVC-Strahlung bis unter die Nachweisgrenze reduziert. Das 277 bp Amplifikat war bei beiden, das 877 bp Amplifikat nur bei der unbestrahlten Probe generiert worden. Die Kopienzahlen der Amplifikate von den unbestrahlten Proben unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Basierend auf den Daten aus Tab. 5.14 wurde berechnet, dass das 277 bp Amplifikat um $82,38 \pm 7,12$ % gegenüber unbestrahlten Proben in seiner Amplifizierbarkeit reduziert war, während die längeren Amplifikate alle um 100 % reduziert waren.

Tab. 5.14: Ermittelte Lambda-Genomkopienzahlen pro Filter aus drei Paaren von Vernebelungsexperimenten (1. bis 3.), quantifiziert anhand des 277 bp Amplifikats

Experimentpaare	UVC ausgeschaltet	UVC eingeschaltet
	Kopien / Filter	Kopien / Filter
1.	$9,05 \times 10^7$	$1,97 \times 10^7$
2.	$6,20 \times 10^{10}$	$5,83 \times 10^9$
3.	$1,81 \times 10^9$	$3,93 \times 10^8$

Somit ist das Primersystem Λ -B (Amplifikatlänge 877 bp) geeignet, um im Vergleich mit den vom Primersystem Λ -A generierten 277 bp Produkten UVC-Schäden an Lambda-DNA nachzuweisen und somit die Effizienz der Desinfektionsmaßnahme durch UVC-Bestrahlung des Luftstroms im Steritube (2.6) abzuschätzen.

5.5.4 Wirkung von UVC-Strahlung auf M13

Um die Übertragungsfähigkeit eines weiteren komplex aufgebauten Phagen zu untersuchen, wurde in Vernebelungsexperimenten der Phage M13 benutzt. Dieser ist aufgrund seines filamentösen Aufbaus ebenfalls anfällig für Scherkräfte aller Art.

In insgesamt zwei Experimenten wurden Lysate von M13 mit $3,90 \times 10^9$ PFU pro mL in den Steritube (Kap. 2.6) vernebelt und parallel Luftproben genommen (Kap. 4.2). Zu Beginn wurde SM-Puffer als Leerkontrolle in den Steritube vernebelt. Die Vernebelungen der Lysate erfolgten bei ein- und ausgeschalteten UVC-Röhren. Anschließend wurden die Gelatinefilter in SM-Puffer gelöst und der Titer bestimmt (Kap. 4.1). Pro Filter wurde je zwei Mal DNA isoliert (Kap. 4.3.1), welche in quantitativen Real-Time PCRs am Rotor-Gene nach Tab. 4.6 und 4.7 sowie Tab. 4.20 und 4.21 mit den Primersystemen M13-A und M13-B (Amplifikatlängen 116 und 1017 bp, Tab. 4.3) eingesetzt wurde. Jede DNA-Probe im Doppelansatz analysiert, wobei die beiden für die Genomkopienzahlen erhaltenen Werte gemittelt wurden.

Auch bei M13 konnte eine desinfizierende Wirkung von UVC-Bestrahlung im Steritube gezeigt werden. Die ermittelten Titer der Gelatinefilter von den zwei Vernebelungsexperimenten ohne UVC-Bestrahlung lagen bei $2,02 \times 10^8$ und $1,57 \times 10^7$ PFU pro Filter. Die Titer der Filter aus Vernebelungsexperimenten mit UVC-Bestrahlung waren zwar nicht unter die Nachweisgrenze abgesunken, jedoch mit $5,71 \times 10^2$ und $1,54 \times 10^2$ PFU pro Filter deutlich reduziert (Tab. 5.15). In der SM-Puffer Leerkontrolle konnte keine infektiösen Phagen nachgewiesen werden. Die Transmission von M13 über den Steritube erfolgte mit ähnlicher Effizienz wie bei Phi X174, MS2 und Lambda.

Tab. 5.15: Ermittelte M13-Titer in PFU pro Filter aus zwei Paaren von Vernebelungsexperimenten (1. + 2.)		
Experimentpaare	UVC ausgeschaltet	UVC eingeschaltet
1.	$2,02 \times 10^8$	$5,71 \times 10^2$
2.	$1,57 \times 10^7$	$1,54 \times 10^2$

Hinsichtlich der Amplifizierbarkeit der 116 bp und 1017 bp langen Produkte in der quantitativen Real-Time PCR am Rotor-Gene konnte festgestellt werden, dass die kurzen Amplifikate bei den Proben beider Experimente (mit und ohne UVC-Bestrahlung) generiert wurden, während dieses mit dem längeren Amplifikat nur bei den unbestrahlten Proben der Fall war (Tab. 5.16). Da aus der DNA, welche aus dem Luftprobenfilter der Leerkontrolle isoliert wurde, das 116 bp Produkt erzeugt werden konnte, wurde der Wert von $1,02 \times 10^7$ Kopien pro mL von den ermittelten 116 bp langen Kopienzahlen der Proben subtrahiert. Im Verhältnis war die Kontamination jedoch zu vernachlässigen.

Tab. 5.16: Ermittelte Lambda-Genomkopienzahlen pro Filter aus drei Paaren von Vernebelungsexperimenten (1. bis 3.), quantifiziert anhand der 277 bp und 1017 bp Amplifikate				
Experimentpaare	UVC ausgeschaltet		UVC eingeschaltet	
	Kopien / Filter		Kopien / Filter	
	116 bp	1017 bp	116 bp	1017 bp
1. SM-Puffer Leerkontrolle	$1,02 \times 10^7$	$< 1,00 \times 10^6$	-----	-----
2. M13-Vernebelung	$2,76 \times 10^9$	$1,50 \times 10^{10}$	$1,16 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^6$
3. M13-Vernebelung	$1,42 \times 10^9$	$5,10 \times 10^8$	$1,91 \times 10^8$	$< 1,00 \times 10^6$

Der Vergleich des ermittelten M13-Titers mit den per quantitativem molekulargenetischem Nachweis bestimmten M13-Genomkopien (quantifiziert mit Amplifikaten verschiedener Längen) aus isolierter DNA der Luftprobenfilter aus den Vernebelungsexperimenten (Tab. 5.15 und 5.16) sind in Abb. 5.27 dargestellt.

Somit ist das Primersystem M13-B (Amplifikatlänge 1017 bp) geeignet, um im Vergleich mit den vom Primersystem M13-A generierten 116 bp Produkten UVC-Schäden an M13-DNA nachzuweisen und somit die Effizienz der Desinfektionsmaßnahme durch UVC-Bestrahlung des Luftstroms im Steritube (2.6) abzuschätzen.

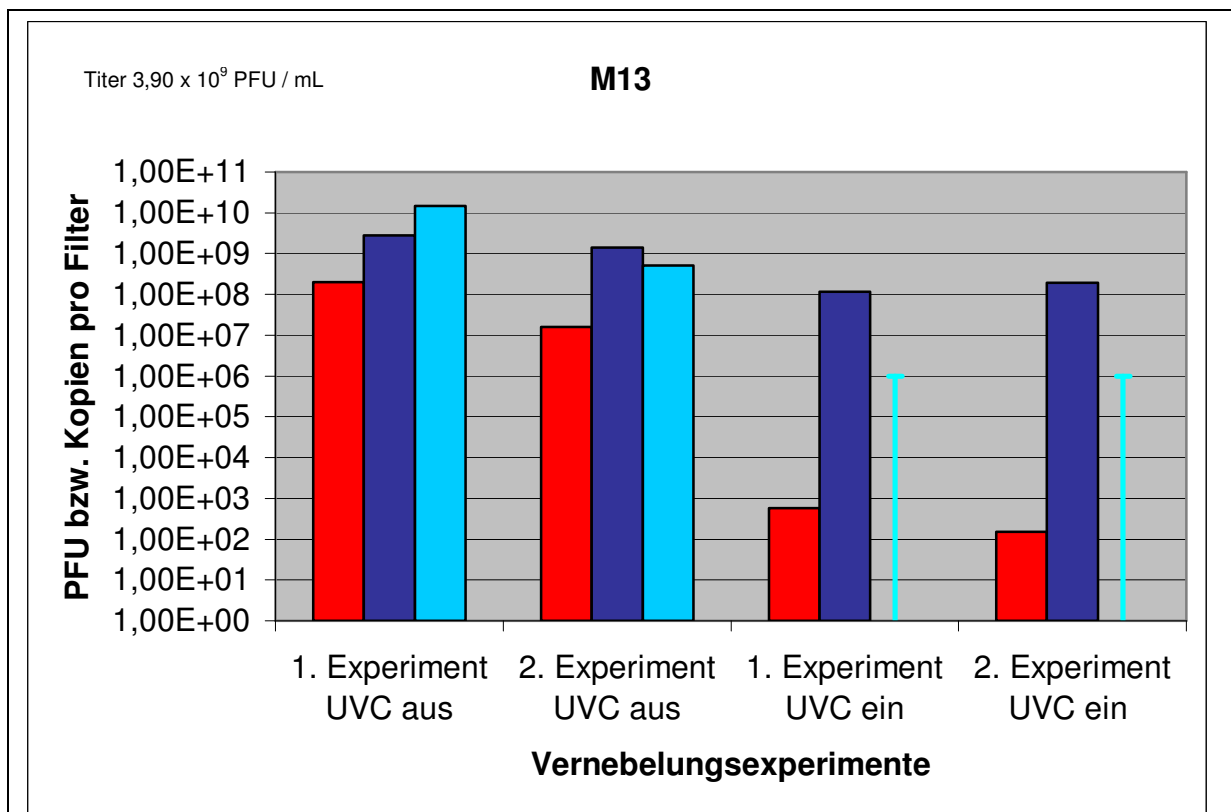


Abb. 5.27: Wirkung von UVC-Strahlung auf die Transmission von M13

Darstellung der ermittelten Phagentiter (rote Säulen) und mittels den Primersystemen M13-A (Amplifikatgröße 116 bp, dunkelblaue Säulen) und M13-B (Amplifikatgröße 1017 bp, hellblaue Säulen) bestimmten Kopienzahlen pro Filter nach verschiedenen Vernebelungsexperimenten mit und ohne UVC-Bestrahlung des Luftstroms; die T-förmigen Linien repräsentieren die unteren Nachweisgrenzen der quantitativen Real-Time PCR, oben links ist der vernebelte M13-Phagentiter angegeben.

Aus den gewonnenen Daten von Lambda (Kap. 5.5.3) und M13 geht hervor, dass die Infektiosität von diesen komplex aufgebauten DNA-Phagen durch UVC-Bestrahlung des Luftstroms ebenfalls signifikant reduziert wird, und dass sich die Phagen-Inaktivierung in den mittels der verwendeten Primersysteme quantifizierten Genomkopienzahlen widerspiegelt.

5.6 Rückhaltevermögen von F5- und F7-Filtern

Die Analyse der Verweilzeit des Bakteriophagen MS2 in einer RLT-Modellanlage zeigte, dass selbst nach vier Stunden noch mehr als 100 infektiöse Partikel pro Kubikmeter Zuluft nachweisbar waren (s. Kap. 5.4.3). Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls für die anderen in verwendeten Viren erhalten. Selbst komplexe Viren wie der Bakteriophage Lambda und M13 scheinen eine entsprechend hohe Stabilität in Luftströmen zu haben. Daher sollte

untersucht werden, welches Rückhaltevermögen mechanische Filterelemente in RLT-Anlagen für Viren haben. Als Stand der Technik sind nach VDI-6022 für den Umluftbetrieb F5 Filterelemente vorgesehen, währenddessen für Zuluftsysteme mindestens ein F7-Filterelement in RLT-Anlagen zu integrieren ist.

Die verwendete Versuchsanlage ist in der Abb. 5.28 nocheinmal dargestellt und wurde bereits unter 3.17. detailliert beschrieben. 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 m³ Luft über 10 min bei einer Saugleistung von 6 m³/h abfiltriert wurde. Die Filter wurden anschließend für die jeweilige Nachweismethodik aufbereitet.

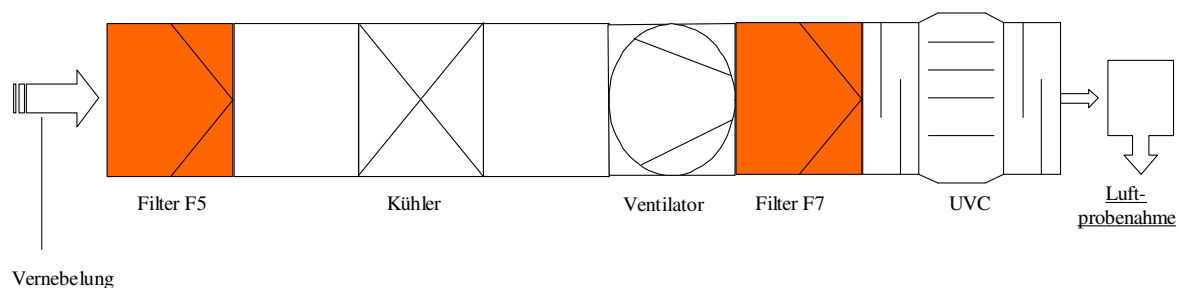


Abb. 5.28: Versuchsaufbau der RLT-Anlage: Position der Filterelemente

Bei Integration eines F5- oder F7-Filterelementes wird deutlich, dass Aerosole des Virus MS2 nicht in ausreichender Form durch diese Filterelemente zurückgehalten werden (siehe Abb. 5.28). Dabei zeigt sich, dass ein Großteil der eingebrachten Viren in der RLT-Anlage verbleibt, bzw. nicht auf dem Membranfilter des Luftprobenahmesystems (MD8) niedergeschlagen wird. Dies war zu erwarten, da der für die Membranfiltration eingesetzte Filterquerschnitt nur einem Teilquerschnitt des Luftkanales entspricht. Die Wiederfindungsrate beträgt zwischen 0,82 (ohne Filter) und 0,07 Promille (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 zu der Kontrolle ohne Filter, jedoch ist dies insbesondere beim F5-Filterelement wenig effektiv.

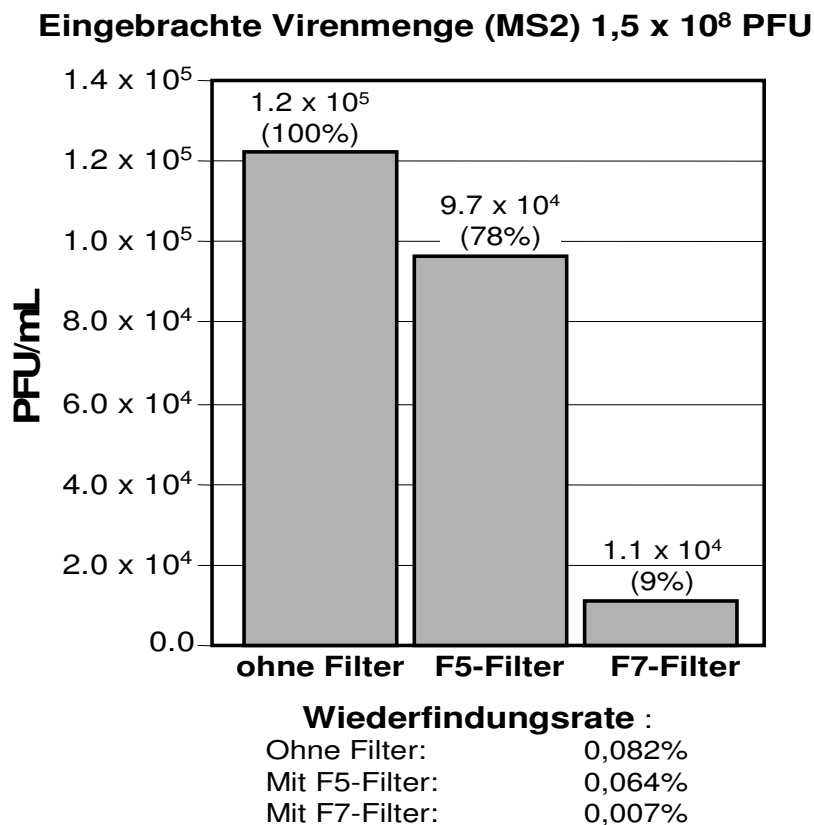


Abb. 5.29: Abreicherung von MS2-Viren (PFU) mittels F5- bzw. F7-Filter

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

5.7 Wirkung von mechanischer Filtration und UVC-Strahlen auf Feline Caliciviren

Nach Etablierung der Phagen-Modellsysteme für die Überprüfung der aerogenen Transmission von Viren über RLT-Anlagen, wurde ein eukaryontisches Modellvirus zur Prüfung der gewonnenen Ergebnisse verwendet. Das Feline Calicivirus wird als Modellvirus für humane Noroviren eingesetzt, beispielsweise zur Prüfung von Desinfektionsmitteln oder anderen Desinfektionsmaßnahmen (s. Kap. 2.4.2).

In dieser Untersuchungsreihe kamen zwei unterschiedliche RLT-Anlagen zum Einsatz. Die Anlage der Firma BÄ•RO GmbH & Co. KG ist optional mit Filtersystemen ausgestattet und eine UV-C-Strahlungseinheit konnte zugeschaltet werden. Die Steritube-Anlage ist ohne Filtervorrichtung nur mit UV-C-Strahlungseinheit einzusetzen. In der Versuchsreihe mit der BÄro Anlage wurden der Titer der FCV-Suspension nach 10 min Vernebelung ohne Filter und ohne UV-C-Strahlung ermittelt und mit den Ergebnissen ohne Filter, mit UV-C-Strahlung

und mit F7-Filter und mit UV-C-Strahlung verglichen. Es konnte sowohl ohne als auch mit F7-Filter und UV-C-Strahlung eine Reduktion der Felinen Caliciviren im Durchschnitt von weniger als einer log-Stufe ermittelt werden (s. Abb. 5.30). Damit sind die Ergebnisse vergleichbar mit denen des Bakteriophagen MS2.

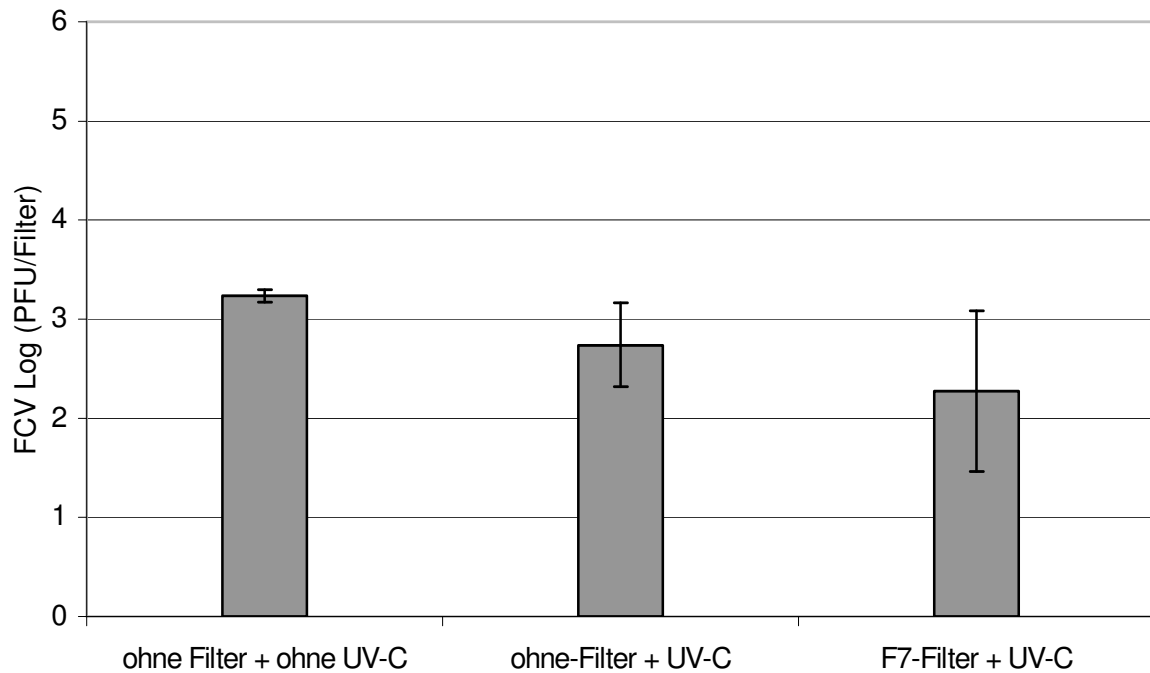


Abb. 5.30: Reduktion des Felinen Calicivirus ohne und mit F7-Filter und UV-C-Strahlung in einer RLT-Anlage (Firma BÄ•RO GmbH & Co. KG)
Ergebnisse aus einer Doppelbestimmung

Es wurden zwei weitere Versuchsreihen an unterschiedlichen Tagen mit der Steritube-Anlage durchgeführt. In beiden Versuchsreihen konnte unter gleichen Bedingungen eine Reduktion des Felines Calicivirus im Durchschnitt von 4 log-Stufen erzielt werden (Abb. 5.31).

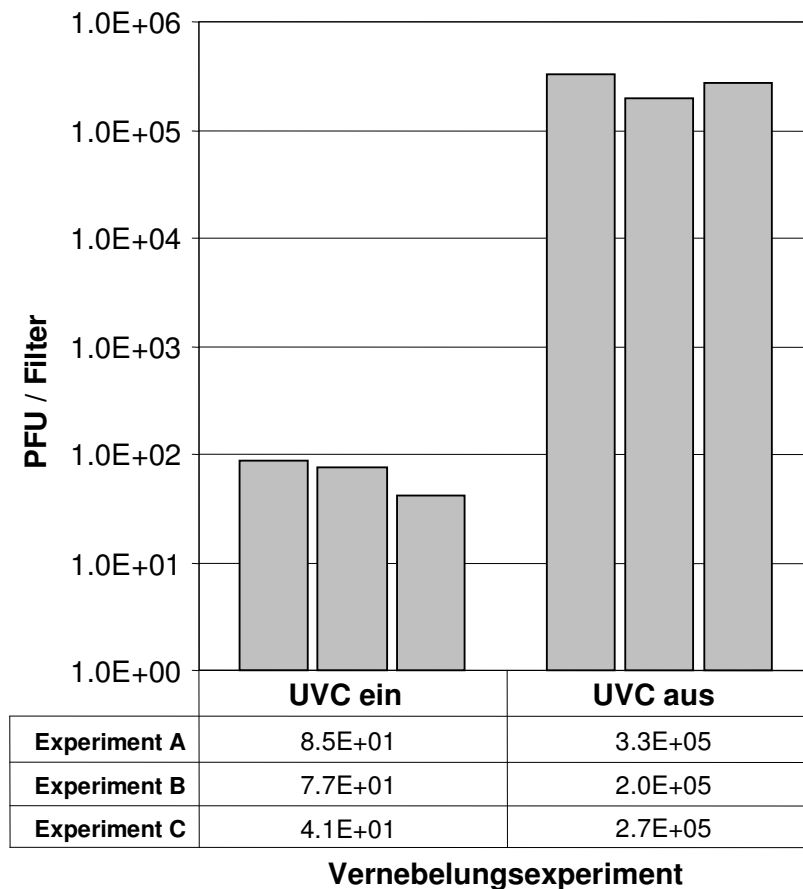


Abb. 5.31: Reduktion Felines Calicivirus ohne und mit UVC-Strahlung in einer RLT-Anlage (Steritube, Firma Virobuster)

Ergebnisse aus 3 parallelen Versuchen an drei unabhängigen Untersuchungstagen

Es wurden jeweils die Virus Titer nach 10 min Vernebelung ohne UVC-Strahlung mit den Werten mit UV-C-Strahlung verglichen. Felines Calicivirus konnte durch UVC-Strahlung reduziert werden.

Die gewonnenen Daten belegen also die Effektivität von UVC-Modulen gegenüber klassischen Filterelementen hinsichtlich der Inaktivierung luftgetragener Viren. Der Vergleich der beiden RLT-Modellanlagen zeigt, dass der Steritube (Fa. Virobuster) im Vergleich zur Büro-Anlage eine höhere Effektivität bei der UVC-Inaktivierung von Viren im Luftstrom aufweist (s. auch Tab. 5.17-5.19). Die Effizienz der Reduktion wird maßgeblich durch die Bauart der Anlage und durch die Intensität der UVC-Strahlung bedingt, wobei die Unterschiede bei den verwendeten UVC-Systemen noch zu diskutieren sind.

Tab. 5.17: Anlage: Bairo GmbH & Co. KG

Versuch B I

Probe Nr.	Gewicht des Probeeintrages FCV-Suspension [g]	Titer der FCV-Ausgangssuspension [PFU/ml]	Filter F 7	UVC-Strahlung	Titer FCV nach Behandlung [PFU/Filter]	Titer FCV nach Behandlung korrigiert (bezogen auf 3,4 g -Eintrag) [PFU/Filter]
1	3,4	$6,0 \times 10^6$	ja	ja	$5,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^1$
2	3,4	$6,0 \times 10^6$ $4,0 \times 10^6$	ja	ja	$7,0 \times 10^2$ $7,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$ $7,0 \times 10^2$
3	3,1	$6,0 \times 10^6$ $4,0 \times 10^6$	nein	ja	$2,0 \times 10^2$ $3,0 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$ $3,3 \times 10^2$
4	3,1	$6,0 \times 10^6$ $4,0 \times 10^6$	nein	ja	$1,2 \times 10^3$ $8,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$ $8,8 \times 10^2$
5	3,2	$6,0 \times 10^6$ $4,0 \times 10^6$	nein	nein	$1,3 \times 10^3$ $1,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$ $1,7 \times 10^3$
6	2,5	$6,0 \times 10^6$	nein	nein	$1,4 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$

Folgende Bedingungen wurden in der RLT-Anlage gewählt: Luftvolumenstrom $2000 \text{ m}^3/\text{h}$, Dauer der Probennahme 10 min
Kontrolle nach Desinfektion $< 10 \text{ PFU / Filter}$

Tab. 5.18: Anlage: Steritube

Versuch S I

Probe Nr.	Gewicht des Probeintrages FCV-Suspension [g]	Titer der FCV-Ausgangssuspension [PFU/ml]	Filter	UVC-Strahlung	Titer FCV nach Behandlung [PFU/Filter]	Titer FCV nach Behandlung korrigiert (bezogen auf 3,4 g -Eintrag) [PFU/Filter]
1	3,1	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	nein	3,0 x 10 ⁵ 3,0 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁵ 3,3 x 10 ⁵
2	3,4	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	nein	1,0 x 10 ⁵ 2,0 x 10 ⁵	1,0 x 10 ⁵ 2,0 x 10 ⁵
3	2,5	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	nein	1,0 x 10 ⁵ 2,0 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁵ 2,7 x 10 ⁵
4	2,4	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	ja	6,0 x 10 ¹	8,5 x 10 ¹
5	2,2	8,0 x 10 ⁶	nein	ja	5,0 x 10 ¹	7,7 x 10 ¹
6	2,5	8,0 x 10 ⁶	nein	ja	3,0 x 10 ¹	4,1 x 10 ¹

Folgende Bedingungen wurden in der RLT-Anlage gewählt: Luftvolumenstrom des Ventilators: 300 m³/h, Dauer der Probennahme 10 min
Kontrolle nach Desinfektion: < 10 PFU / Filter

Tab. 5.19: Anlage: Steritube

Versuch S II

Probe Nr.	Gewicht des Probeeintrages F CV-Suspension [g]	Titer der FCV-Ausgangssuspension [PFU/ml]	Filter	UVC-Strahlung	Titer FCV nach Behandlung [PFU/Filter]	Titer FCV nach Behandlung korrigiert (bezogen auf 3,4 g -Eintrag) [PFU/Filter]
1	3,1	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	nein	8,0 x 10 ⁵ 5,0 x 10 ⁵	8,8 x 10 ⁵ 5,5 x 10 ⁵
2	3,4	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	nein	6,0 x 10 ⁵ 7,0 x 10 ⁵	6,0 x 10 ⁵ 7,0 x 10 ⁵
3	2,2	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	nein	6,0 x 10 ⁵ 5,0 x 10 ⁵	9,3 x 10 ⁵ 7,7 x 10 ⁵
4	2,8	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	ja	3,0 x 10 ¹ 2,0 x 10 ¹	3,6 x 10 ¹ 2,4 x 10 ¹
5	2,7	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	ja	1,0 x 10 ¹ 2,0 x 10 ¹	1,3 x 10 ¹ 5,5 x 10 ¹
6	3,0	8,0 x 10 ⁶ 8,0 x 10 ⁶	nein	ja	2,0 x 10 ¹ 4,0 x 10 ¹	2,3 x 10 ¹ 4,5 x 10 ¹

Folgende Bedingungen wurden in der RLT-Anlage gewählt: Luftvolumenstrom des Ventilators: 300 m³/h, Dauer der Probennahme 10 min
Kontrolle vor Beginn des Versuches: < 10 PFU / Filter

6. Diskussion

In diesem Forschungsvorhaben wurde die Transmission der Viren Phi X174, MS2, M13, Lambda und FCV als Modellsystem für humanpathogene Viren über ein Modell einer RLT-Anlage untersucht, wobei der Fokus auf Phi X174 und MS2 gerichtet war. Es wurden mittels Kollisionsvernebelung Aerosole von Phagenlysaten mit hohem Titer erzeugt und diese in RLT-Anlagen vernebelt. Die Aerosole wurden mittels Luftprobenahme am anderen Ende der Modellanlage aufgefangen. Aus den Luftprobenfiltern wurden zum einen der verbleibende Phagentiter per Top-Agar-Methode bestimmt, zum anderen erfolgte ein molekulargenetischer Nachweis der Phagen-Nukleinsäure durch Etablierung quantitativer Real-Time PCR-Systeme (Watzinger *et al.*, 2004; Dreier *et al.*, 2005; diese Arbeit).

Am Modell Steritube konnte eine Transmission aller getesteten Phagenaerosole und darüber hinaus eine hohe Phagen-Inaktivierungsrate durch die Bestrahlung des Luftstroms nachgewiesen werden. Da das Steritube System modular aufgebaut ist, lassen sich die ermittelten Ergebnisse ohne Probleme auch auf RLT-Anlagen mit höheren Luftvolumenströmen übertragen, wobei dies nur für die in dieser Arbeit verwendeten Luftvolumina (max. 300 m³/h) gilt. Die Effektivität bei einem Luftvolumenstrom von 400 m³/h kann zukünftig getestet werden.

Für Experimente mit den Phagen MS2, Phi X174, Lambda und M13 können die in dieser Arbeit etablierten und den Experimenten zugrunde liegenden geeigneten Nachweismethoden für Phagen im Luftstrom (Luftprobennahme, Titerbestimmung und molekulargenetische Nachweismethoden von Nukleinsäure) eingesetzt werden.

6.1 Etablierung von PCR-Systemen und vorbereitende Versuche

Um zu überprüfen, ob sich PCR-Systeme generell zum Nachweis von UVC-Schäden im Phagen genom eignen, wurde Phagen-Nukleinsäure gezielt mit UVC-Licht bestrahlt. Anschließend wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen der bestrahlten und unbestrahlten Nukleinsäure PCR-Produkte unterschiedlicher Amplifikatlänge generiert. Es konnte beobachtet werden, dass aus UVC-bestrahlter Nukleinsäure deutlich weniger Amplifikate als aus unbestrahlter Nukleinsäure hergestellt werden konnten, was wahrscheinlich mit UVC-induzierten Veränderungen der Nukleinsäuren erklärt werden kann. Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass UVC-Schäden durch Bestrahlung mit einem UV-Transilluminator an den Nukleinsäuren entstehen, und zum anderen, dass die gewählten

Amplifikatgrößen ab 277 bp aufwärts zum Nachweis von UVC-Schäden in Real-Time PCR-Systemen geeignet sind. Längere Amplifikate lassen sich aus bestrahlter Nukleinsäure schlechter generieren als kürzere. Das kann mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Nukleinsäureschäden in Zusammenhang gebracht werden, welche auf einem längeren Nukleinsäureabschnitt größer als auf einem kürzeren ist. An einem UVC-bedingten Nukleinsäureschaden kann die DNA-Synthese in der PCR nicht weiter fortschreiten. Aus diesem Grund kann die PCR-Methode eingesetzt werden, um zum einen die Gesamtkopienzahl über die Erzeugung kurzer Amplifikate zu ermitteln und zum anderen über längere Amplifikate UVC-Schäden im Phagengenom nachzuweisen. Damit kann über diese molekulargenetische Methodik die Infektiosität der Phagen abgeschätzt werden, um beispielsweise die Wirksamkeit einer UVC-Desinfektionsmaßnahme zu überprüfen.

Da verschiedene Studien demonstrieren, dass kürzere Amplifikate von etwa 300 bp Länge aus bestrahlter und unbestrahlter Nukleinsäure nach konventionellen PCRs und elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel mit anschließender EtBr-Färbung in ihren Bandenintensitäten nicht unterschieden werden können (Wang *et al.*, 2004), und 388 bp bzw. 292 bp Amplifikate zum molekulargenetischen Nachweis von UVC-Schäden in konventioneller RT-PCR untauglich sind (Myatt *et al.*, 2003), lässt dies den Schluss zu, dass Real-Time PCR-Systeme zur Messung von UVC-Schäden konventionellen PCRs überlegen sind. Im Gegensatz zu konventionellen PCRs ist es unter Zuhilfenahme von Real-Time PCR-Systemen möglich, UVC-Schäden an Nukleinsäure durch die Generierung von Amplifikaten unter 300 bp und Vergleich der ct-Werte nachzuweisen (diese Arbeit). Ein Beispiel ist das Fluoreszenzkurvendiagramm von 277 bp großen Lambda-Amplifikaten (Abb. 5.2). Die ct-Werte (Crossing Point) von Amplifikaten aus bestrahlter Lambda-DNA liegen um sechs bis acht Zyklen hinter den vergleichbaren unbestrahlten Proben, was einer Reduktion in der Kopienzahl von zwei bis drei log-Stufen entspricht.

Der Vorteil von Real-Time PCR-Systemen gegenüber konventionellen PCRs bei der Messung von Strahlungsschäden an Nukleinsäuren ist in deren grundlegender Funktionsweise begründet. Bei einer konventionellen PCR erfolgt die Detektion der entstandenen Amplifikate als Endpunktmessung nach Beendigung der PCR durch Auftrennung der Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese und Bestimmung der Bandenintensitäten im Gel nach EtBr-Färbung. Im Gegensatz dazu stellt eine Real-Time PCR eine kinetische Betrachtung der Amplifikatentstehung unter Zuhilfenahme fluoreszenzmarkierter Sonden dar. Hierbei wird eine Zunahme der Fluoreszenz während einer Amplifikation „online“ detektiert. Bei Überschreitung eines definierten Schwellenwertes wird das Ergebnis als ct-Wert dargestellt. Der dynamische Bereich einer Real-time PCR erstreckt sich über bis zu neun log-Stufen, so dass auch Proben mit hohen Kopienzahlen quantifiziert und schwach positive Proben detektiert werden können. In weiterführenden

Experimenten sollten aus diesem Grund Real-Time PCR-Systeme verwendet werden. Die in dieser Arbeit etablierte interne Kontrollreaktion kann nach Testung und eventuellen Modifikationen vermutlich auch in anderen Real-Time PCR-Systemen Verwendung finden. Ebenso kann die Methode zur Herstellung von Quantifizierungsstandards auf andere PCR-Systeme übertragen werden.

Um zu überprüfen, ob Phagenlysate auch nach mehreren Tagen Lagerung stabil bleiben und für Vernebelungsexperimente eingesetzt werden können, wurde exemplarisch der Phage M13 getestet (5.4). Es zeigte sich, dass M13 über einen Zeitraum von sieben Tagen ohne signifikanten Titerverlust bei 4 °C und –20 °C gelagert werden konnte. Somit korrelieren die Ergebnisse zur temperaturabhängigen Lagerungsfähigkeit von M13 mit den Literaturangaben anderer Phagen, die belegen, dass Lambda und Phi X174 (Ackermann *et al.*, 2004; Jepson *et al.*, 2004) sowie MS2 (Dreier *et al.*, 2005) ohne signifikanten Titerverlust über Monate bis zu mehreren Jahren lagerfähig sind. Phagen sollten zur Infektiositätserhaltung auf jeden Fall in SM-Puffer gelagert werden, da bei Lagerung in Wasser MS2-Titerreduktionen von fast 100 % nach 28 Tagen beobachtet wurden (Allwood *et al.*, 2003). In der gleichen Studie konnte gezeigt werden, dass eine schnellere Titerreduktion von MS2 bei 37 °C und 25 °C als bei 4 °C eintritt. Anhand dieser Beobachtungen und dem Vergleich mit den erwähnten anderen Literaturdaten zur Stabilität von Phagen scheint sich tendenziell eine niedrigere Temperatur günstiger auf die Phagenstabilität auszuwirken, weshalb bei zukünftigen Experimenten mit niedrigtitrigen Phagenlysaten zur besseren Simulation von Virengehalten in der Raumluft eine Lagerung bei Temperaturen von –20 °C oder tiefer in Betracht gezogen werden kann, um den Phagentiter möglichst effizient zu erhalten.

6.2 Vernebelung von Phagen in RLT-Anlagen und nachfolgende Luftprobenahme

Als standardisierbare Vernebelungszeit mit paralleler Luftprobensammlung wurden unter Kap. 5.5.1 für MS2- und Phi X174-Lysate zehn Minuten ermittelt. Diese Vernebelungsdauer war auch für Experimente mit UVC-Bestrahlung geeignet. Sie stellte einen Kompromiss zwischen maximaler Ausbeute an Phagentiter und Nukleinsäure bei möglichst geringem Verbrauch an Phagenlysate dar. Die Experimente mit MS2 und Phi X174 zeigen, dass die Gelatinefilter ab einem bestimmten aufgenommenen Phagentiter eine Sättigung erreichen und keine weiteren infektiösen Partikel und Nukleinsäure mehr aufnehmen können. Das liegt vermutlich zum einen am hohen Titer der vernebelten Phagenlysate, so dass es zu einer

schnellen Absättigung des Gelatinefilters mit Phagen kommt und mit längerer Vernebelungsdauer nur wenig weitere Phagen und Nukleinsäure auf der Filteroberfläche haften bleiben. Zum anderen kommt es bei länger andauernden Vernebelungen zu längerer Aerosolexposition der Filter. Durch erhöhte Feuchtigkeit quellen die netzartigen Wanddurchbrüche der Gelatine-Hohlblasen des Filters, welche die filtrationswirksamen Poren darstellen, bis um das zwei- bis dreifache ihrer normalen Größe auf (Jaschhof, 1992). Ein unter erhöhter Feuchtigkeit beeinflusstes Rückhaltevermögen eines Filters könnte mit zu den beobachteten Sättigungseffekten beitragen, jedoch ist dieses noch nicht untersucht worden.

Mit standardmäßiger Vernebelungsdauer von zehn Minuten sollte in Experimenten mit hohen Phagentitern ein geeignetes Mittelmaß erzielt sein. Beim Einsatz von Lysaten mit geringem Titer in nachfolgenden Experimenten bleibt zu ermitteln, ob die Vernebelungs- und Luftprobennahmezeiten zwecks einer Erniedrigung der unteren Nachweisgrenze verlängert werden müssen. Außerdem könnte eine niedrigere untere Nachweisgrenze erzielt werden, indem ein Gelatinefilter nach Luftprobennahme in einem kleineren Volumen SM-Puffer als 20 mL gelöst wird.

In den Vernebelungsexperimenten dieser Arbeit entsprach der vernebelte Phagentiter nicht dem ermittelten Titer aus dem Luftprobenfilter. Deshalb wurde an MS2 und Phi X174 untersucht, ab welchem vernebelten Titer das Verhältnis zwischen diesem und dem ermittelten Phagentiter aus dem Filter konstant ist (Kap. 5.5.2). Dieses Verhältnis wird kurz als Titerverhältnis bezeichnet. Parallel wurde der Nukleinsäuregehalt der Luftprobenfilter quantifiziert. Die Ergebnisse aus den Experimenten (Kap. 5.4.2) stimmen weitgehend miteinander überein. Annähernd lineare Titer- und Kopienzahlverhältnisse wurden ab mittleren eingesetzten Phagentitern um etwa $1,00 \times 10^5$ PFU pro mL aufwärts beobachtet, wobei der ermittelte Phagentiter aus dem Filter (nach Vernebelung) immer um einen bestimmten Wert geringer war als der zur Vernebelung eingesetzte Titer. Die quantifizierten Kopienzahlen eines Filters lagen um mehr als 1,7 bis zu 3 log-Stufen über dem zum Vergleich daraus bestimmten Phagentiter. Vergleichbare Werte für MS2 sind bereits bestimmt worden (Dreier *et al.*, 2005). Diese Abweichung wurde tendenziell mit steigendem vernebeltem Titer kleiner. Bei Lysaten mit höherem Titer als $1,00 \times 10^8$ PFU pro mL wurde auch das Titerverhältnis kleiner.

Diese Beobachtungen können verschiedene Ursachen haben. Aus den Luftprobenfiltern konnten generell mehr Amplifikate generiert werden, als infektiöse Phagen nachgewiesen wurden. Das liegt vermutlich daran, dass einerseits im Phagenlysat freie Nukleinsäurefragmente in hoher Anzahl vorhanden sind, mit denen die kurzen Amplifikate generiert werden können. Andererseits sind im Lysat wahrscheinlich einige inaktivierte, nicht

infektiöse Phagenpartikel vorhanden, deren Nukleinsäure ebenfalls mittels molekulargenetischen Nachweis erfasst wird. Für die ermittelten Titerverhältnisse scheint hauptsächlich das Rückhaltevermögen des „Steritubes verantwortlich zu sein, welches in anschließenden Experimenten untersucht wurde und für die untersuchten Phagen nicht signifikant unterschiedlich ist. Außerdem bedeckt ein Gelatinefilter mit 8 cm Durchmesser nur ein Viertel der Gesamtfläche des Luftauslasses (16 cm Durchmesser), so dass damit gerechnet werden kann, dass ein großer Anteil des Phagenaerosols am Filter vorbei strömt. Um den Anteil an nicht detektierbarem vorbeiströmenden Phagenaerosol zu minimieren, könnte eine Verjüngung der Luftauslassöffnung in Betracht gezogen werden. Durch den dabei entstehenden Düseneffekt würde der Luftstrom jedoch beschleunigt, was unter Umständen bei der Probennahme in einer geringeren Phagenausbeute resultieren könnte. Deshalb erscheint es vorteilhafter, auch in zukünftigen Vernebelungsexperimenten wie in dieser Arbeit zu verfahren. Da jeweils Phagenlysate mit gleichem Titer für einen Experimentdurchgang (UVC ein / aus) verwendet wurden, sollte auch die Ausbeute an Phagen pro Luftprobenfilter gleich sein. Damit können die Werte aus nachfolgenden Vernebelungsexperimenten z.B. für die Beurteilung von Desinfektionsmaßnahmen herangezogen werden.

Die maximale Aufnahmekapazität der Filter kann die Ursache für das beobachtete abnehmende Titerverhältnis bei hochtitrigen Lysaten sein und korreliert mit den unter Kap. 5.5.1 gewonnenen Erkenntnissen, dass der im Filter ermittelbare Phagentiter auch nach längeren Probennahmezeiten nicht mehr ansteigt. In keinem Vernebelungsexperiment, auch nicht mit anderen Phagen, wurde aus einem Gelatinefilter ein Titer bestimmt, welcher viel größer als $2,00 \times 10^9$ PFU pro Filter war. Bei zukünftigen Experimenten mit niedrigtitrigen Lysaten könnte problematisch werden, dass bei vernebelten Lysaten mit Titern unter $1,00 \times 10^5$ PFU pro mL absteigend die Nachweisgrenzen der Top-Agar-Methode erreicht wird. Aus diesem Grund müsste versucht werden, diese Nachweisgrenzen zu erniedrigen, indem beispielsweise ein größeres Probenvolumen zur Titerbestimmung eingesetzt wird.

Um zu ermitteln, wie viele Phagen nach einer einmalig erfolgten Vernebelung im Steritube zurückgehalten werden und wie lange infektiöse Phagen nach Vernebelung im Luftstrom des mit konstanter Geschwindigkeit weiter betriebenen Steritube nachweisbar sind, wurden einmalig Lysate von MS2 und Phi X174 in den Steritube vernebelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden aus dem Luftstrom Proben entnommen, aus denen die Phagentiter bestimmt und die Nukleinsäure mittels Generierung der kurzen Amplifikate in quantitativer Real-Time PCR quantifiziert wurden (Kap. 5.5.3). Unter den in den Experimenten gewählten Bedingungen waren beide Phagen über einen Zeitraum von mehreren Stunden im Luftstrom des Steritube nachweisbar (Abb. 5.15 und 5.16). Dass MS2 länger als Phi X174 im Luftstrom nachzuweisen war, ist wahrscheinlich durch die Titer der eingesetzten Lysate bedingt.

Auffallend ist, dass die Differenz zwischen Phagentiter und ermittelten Kopienzahlen in den Experimenten zu 5.5.3 immer größer wurde. Diese Beobachtung könnte damit zu erklären sein, dass viele Phagen während ihrer Verweildauer / Passage des Steritubes inaktiviert werden. Sie verlieren ihre Infektiosität, jedoch bleibt ihre Nukleinsäure mittels PCR weiterhin detektierbar. In einer Studie ist gezeigt worden, dass der Vorgang der Kollisionsvernebelung an sich die Infektiosität von Corona-, Polio-, Rhino- und Rotaviren-Lysaten nicht signifikant beeinflusst (Ijaz *et al.*, 1987). Somit könnte die Inaktivierung der Phagen durch Austrocknungseffekte zu erklären sein, weil durch den stetig weiterströmenden Luftzug im Inneren des Steritubes in Verbindung mit durch die Ventilation entstehende Wärme die Feuchtigkeit entzogen werden könnte, zumal sich Mikroorganismen und Viren im Aerosol generell bei hohen Luftfeuchtigkeiten (Ijaz *et al.*, 1987; Ko *et al.*, 2000; Peccia *et al.*, 2001; Tseng & Li, 2005) und niedrigeren Temperaturen (Ijaz *et al.*, 1987; Nuanualsuwan *et al.*, 2002; Allwood *et al.*, 2003) als stabiler erwiesen haben. Außerdem nehmen die ermittelten Titer und Genomkopienzahlen von Zeitpunkt zu Zeitpunkt nicht kontinuierlich ab, sondern zwischenzeitlich leicht zu (Abb. 5.15). Dieses Phänomen könnte mit der Zusammenführung von kleinen Aerosoltröpfchen durch den kontinuierlichen Luftstrom im „Steritube“ zu erklären sein. Ein Aerosol besteht aus Tröpfchen verschiedener Durchmesser von $> 7 \mu\text{m}$ bis zu $0,65 \mu\text{m}$. Die Anteile verschieden großer Tropfen sind dabei von der RH abhängig. Kleine Tröpfchen könnten an Volumen gewinnen, bis sie nicht mehr an den inneren Oberflächen zurückgehalten werden können und sukzessiv in den Luftstrom abgegeben werden (Ijaz *et al.*, 1987; Ko *et al.*, 2000; Peccia *et al.*, 2001; Lin & Li, 2002).

Diese Ergebnisse belegen, dass einmal in ein Modellsystem einer RLT-Anlage gelangte Viren über einen langen Zeitraum infektiös im System verbleiben. Übertragen auf eine große RLT-Anlage (z.B. in einem Gebäude) bedeutet dies, dass auch von humanpathogenen Viren mit ähnlicher Stabilität längerfristige Infektionsrisiken ausgehen können, wenn sie in eine RLT-Anlage gelangt sind. Virenaerosole, wie sie von infizierten Personen über die Atemluft oder durch Niesen erzeugt werden, könnten in den Umluftbetrieb einer RLT-Anlage gelangen und auf diese Weise verbreitet werden. Vor allem bei mehreren infizierten Personen in einem Raum, z.B. während saisonaler Grippeepidemien, könnte auf diese Weise eine größere Menge an virushaltigen Aerosolen entstehen. Da gezeigt wurde, dass Virenaerosole auch 24 h nach Vernebelung noch in der Luft nachweisbar und infektiös sind (Ijaz *et al.*, 1987), und die Immunsensitivität von Personen variiert, kann keine bestimmte Mindestkonzentration an Viren in einem Tröpfchen in der Luft festgelegt werden, nach dessen Inspiration zwangsläufig eine Infektion folgt (Brickner *et al.*, 2003). Deshalb kann das Infektionsrisiko von Viren, die durch RLT-Anlagen verbreitet werden, nur schwer abgeschätzt, und zukünftig nicht als unerheblich eingestuft werden. Insbesondere zu beachten ist dies unter dem in dieser Arbeit nachgewiesenen Aspekt, dass die nach dem Stand der Technik im

Umluftbetrieb zu verwendenden F5-Filter kaum geeignet sind um Viren/Virenaerosole zu filtrieren.

Auffallend ist auch, dass Phagen an inneren Bauteilen und Oberflächen einer RLT-Anlage haften und stabil bleiben. Diese Beobachtung ist mit den Infektionswegen humanpathogener Viren in Einklang zu bringen. So werden Viren neben Tröpfcheninfektion auch durch kontaminierte Hände oder Oberflächen über Schmier- und Schmutzinfektionen verbreitet (Modrow *et al.*, 2003), erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die regelmäßig besonders in den Wintermonaten auftretenden Epidemien von Gastroenteritis durch Noroviren. Die aerogene Transmission von Noroviren ist eindrucksvoll anhand einer Infektion in einem Restaurant verdeutlicht worden, in welchem durch Erbrechen einer infizierten Person entstandene Virenaerosole über die Deckenventilation verbreitet wurden, so dass mit zunehmender Entfernung vom Infektionsherd sukzessiv abnehmende Infektionsraten anderer Personen beobachtet werden konnten (Marks *et al.*, 2000). Von Noroviren ist außerdem bekannt, dass sie auf trockenen Oberflächen längere Zeit ohne Infektiositätsverlust überdauern können (MMWR, 2001; Robert Koch Institut, 2004; Wu *et al.*, 2005). Da eine Reduzierung der mikrobiellen und endotoxinen Oberflächenkontamination in RLT-Anlagen um mehr als 99 % durch UVC-Bestrahlung demonstriert worden ist (Menzies *et al.*, 2003), ist es als wahrscheinlich anzusehen, dass Viren an den Oberflächen ebenfalls durch UVC-Strahlung inaktiviert werden.

6.3 UVC-Bestrahlung von Luftströmen in RLT-Anlagen

Um den Einfluss von UVC-Modulen auf Phagenaerosole im Luftstrom zu testen, wurden hochtitrige Lysate von MS2, Phi X174, Lambda und M13 verwendet. Experimentell wurde hier vornehmlich mit dem Steritube gearbeitet. Die benannten Lysate wurden in den Steritube vernebelt und parallel Luftproben mittels Membranfiltration genommen (Kap. 5.6). Aus den Filtern wurde der Titer bestimmt sowie Nukleinsäure isoliert, aus der mit verschiedenen Primersystemen unterschiedlich lange Amplifikate generiert wurden. Insgesamt betrachtet konnten durch UVC-Bestrahlung des Luftstroms bei allen vernebelten Phagen deutliche Reduktionen im Phagentiter sowie in den Anzahlen längerer amplifizierbarer Genomkopien festgestellt werden. Aus Experimenten mit Phi X174 und MS2 konnte ermittelt werden, dass der Wärmeeffekt der mit Aluminiumfolie verkleideten UVC-Röhren zu vernachlässigen war. Deshalb wurden die UVC-Röhren während der Experimente mit Lambda und M13 lediglich ein- bzw. ausgeschaltet. Eine Kontamination im Steritube mit Nukleinsäuren von vorhergehenden Experimenten war vorhanden, jedoch bei den in den

Experimenten eingesetzten recht hohen Phagentitern zu vernachlässigen, wie vernebelte SM-Puffer Leerkontrollen gezeigt haben. Für weiterführende Experimente im niedrigtitrigen Bereich kann dies jedoch störend sein. Deshalb sind effizientere Reinigungsprozeduren der Anlage nach Vernebelungsexperimenten erforderlich, zum einen Desinfektionsmaßnahmen zur Phageninaktivierung durch effiziente antivirale Desinfektionsmittel, zum anderen Inaktivierung der Nukleinsäure mittels DNA-zerstörenden Agenzien.

Aus den gewonnenen Daten der Experimente mit allen untersuchten Phagen ging hervor, dass die im Luftprobenfilter gemessenen Phagentiter nach Experimenten mit UVC-Bestrahlung des Luftstroms in sämtlichen Experimenten deutlich reduziert wurden. Die mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmten Kopienzahlen nahmen mit zunehmender Länge der generierten Amplifikate aus Nukleinsäure von bestrahlten Luftproben in ihrer Anzahl ab, während diese bei unbestrahlten Proben weniger stark reduziert wurden. Diese Beobachtung deutet auf UVC-Schäden der Nukleinsäuren hin.

UVC-Schäden konnten neben DNA auch bei RNA nachgewiesen werden. Der Hauptanteil an MS2-RNA-Schäden wurde wahrscheinlich von Uracil-Dimeren ausgemacht, gefolgt von Uracil-Cytosin-Dimeren. Solche Schäden treten im Strahlungsdosenbereich von 0,8 bis 140 mJ/cm² auf (Nuanualsuwan & Cliver, 2003). Es konnte in einer Studie beobachtet werden, dass nach zehnmütiger Bestrahlung etwa 8 bis 10 % aller Uracil-Basen des RNA-Genoms von Mengoviren Dimere gebildet hatten, was 80 bis 85 % aller Schäden neben Uracil-Cytosin-Dimeren entsprach (Miller & Plagemann, 1974).

Die Beobachtung, dass weniger DNA mit steigender Produktlänge amplifiziert werden konnte, basiert wahrscheinlich auf den unter 2.5 beschriebenen und durch UVC-Strahlung hervorgerufenen Nukleinsäureschäden. CPDs und 6-4PPs führen zu einer Distorsion der DNA-Doppelhelix, wobei in Bakterien die letale Wirkung von UVC-Schäden der DNA zu 85 bis 95 % auf CPDs und zu 5 bis 15 % auf 4-6PPs zurück geht (Zölzer & Kiefer, 1989). Durch CPDs werden DNA-Polymerasen in ihrer Aktivität während der PCR inhibiert, so dass das entstandene Amplifikat nicht weiter verlängert werden kann, da unter *in vitro* Bedingungen keine Reparaturmechanismen wie unter *in vivo* Bedingungen zur Geltung kommen (Sinha & Häder, 2002). Aus diesem Grund bleiben die TaqMan-Sonden während der PCR am DNA-Einzelstrang gebunden, und werden nicht durch die Taq-Polymerase abgebaut, so dass kein Fluoreszenzanstieg detektiert werden kann.

In einer Studie wurden in M13-DNA nach UVC-Bestrahlung CPDs und 6-4PPs nachgewiesen und deren Auftreten in Verbindung mit der zunehmenden Abnahme der M13-Infektiosität bei steigender UVC-Dosis gebracht. Allerdings konnten keine durch freie Sauerstoffradikale verursachten Schäden wie oxoG gemessen werden, außerdem wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung kein Unterschied in der Bandenstärke oder der

Mobilität des Hüllproteins im Gel beobachtet. Außerdem ist die Formation von CPDs und 6-4PPs von der UVC-Dosis abhängig (Kurosaki *et al.*, 2003). Im Steritube kann die UVC-Dosis über die Geschwindigkeit des Luftstroms variiert werden. Bei Amplifikation eines kurzen DNA-Abschnitts wie beispielsweise des 85 bp Produktes von Phi X174 war zwischen den Kopienzahlen des bestrahlten und unbestrahlten Proben zwar ebenfalls eine Reduktion von bestrahlten Amplifikaten zu beobachten (Abb. 5.17, 5.18), diese ist jedoch nicht so deutlich ausgeprägt wie nach Amplifikation von längeren Genom-Abschnitten (Abb. 5.17, 5.21; Tab. 5.9). Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von UVC-bedingten Schäden ist wie schon erwähnt auf einem längeren Nukleinsäureabschnitt größer als auf einem kürzeren Abschnitt. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die anderen getesteten Phagen ermittelt. Bemerkenswert ist, dass im Luftstrom des Steritubes die komplexer aufgebauten Phagen Lambda und M13 im Aerosol in gleichem Maße stabil waren wie die kleinen und kompakt aufgebauten Phagen MS2 und Phi X174. Somit scheint die Struktur von Viren keinen wesentlichen Einfluss auf deren Transmission über RLT-Anlagen zu haben. Erklären lässt sich dies damit, dass die bei der Kollisionsvernebelung auftretenden Scherkräfte nicht groß genug sein könnten, um die zur mechanischen Phagenzerstörung notwendige Stärke zu erreichen. Übertragen auf reale RLT-Anlagen bedeutet dieses, dass Viren unterschiedlichster Strukturen übertragen werden können. Deshalb kann von fast allen über Aerosole übertragbaren humanpathogenen Viren eine Infektionsgefahr über RLT-Anlagen ausgehen. Besonderes Augenmerk ist dabei auf solche Viren zu richten, die über den Nase-Mund-Raum als Eintrittspforte in den menschlichen Organismus gelangen.

In Luftprobenfiltern UVC-bestrahlter Proben von MS2 und M13 konnte noch stark reduzierte Infektiosität gemessen werden, während in Filtern bestrahlter Proben von Phi X174 und Lambda die Infektiosität immer unter die Nachweisgrenze reduziert war. Das könnte zum Teil daran liegen, dass die zu den Vernebelungsexperimenten eingesetzten Titer der Lysate von MS2 und M13 höher waren als die Titer des Lambda-Lysats, so dass zum Teil noch infektiöse Phagen nachgewiesen werden konnten. Außerdem kann dabei die Empfindlichkeit (untere Nachweisgrenze der Methode) der PCR-Systeme für die unterschiedlichen Amplifikatlängen, welche die verschiedenen Primersysteme generieren, eine Rolle spielen.

Auf Literaturdaten basierend müsste theoretisch MS2 mit einem ssRNA-Genom am leichtesten durch UVC-Strahlung zu inaktivieren sein, gefolgt von Phi X174 und M13 mit ssDNA-Genomen sowie zuletzt Lambda mit einem dsDNA-Genom. Diese Beobachtungen sind darin begründet, dass in einem doppelsträngigen Genom der zweite Strang als Matritze bei der Nukleinsäurereparatur dienen kann (Nuanalsuwan & Cliver, 2003; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Tseng & Li, 2005).

Viren sind in Aerosolen empfindlicher gegenüber UVC-Strahlung als in Flüssigkeiten. Das wird aus dem Vergleich der in vorangegangenen Studien zur Inaktivierung notwendigen gemessenen UVC-Dosen in Flüssigkeiten (Meng & Gerba, 1996; Gerba *et al.*, 2002; Nuanualsuwan *et al.*, 2002; Thurston-Enriquez *et al.*, 2003; Duizer *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Hijnen *et al.*, 2005) im Vergleich zu Aerosolen (Jensen, 1964; Tseng & Li, 2005) ersichtlich. Der G+C-Gehalt der Phagengenome ist bei allen in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Phagen mit etwa 50 % gleich groß. Somit sollte der G+C-Gehalt bei der Entstehung UVC-bedingter Nukleinsäureschäden im Vergleich der Phagen untereinander zu vernachlässigen sein. Die gemessenen UVC-Dosen für 90 % Inaktivierung von ssRNA- und dsRNA-Viren sowie ssDNA und dsDNA-Viren (Tseng & Li, 2005) reichen von 339 bis 1196 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$, für 99 % Inaktivierung sind diese doppelt so hoch. Im Vergleich dazu war die UVC-Dosis in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Vernebelungsexperimenten um ein Vielfaches höher. Vermutlich wurde aus diesem Grund die Infektiosität bei Lysaten mit einem mittleren Titer von ca. $5,00 \times 10^8$ FU pro ml unter die Nachweisgrenze reduziert.

Auffallend an den Ergebnissen der Vernebelungsexperimente mit M13 und MS2 ist, dass sich deren Titer auch durch UVC-Bestrahlung im Luftstrom nicht unter die Nachweisgrenze reduzieren ließen, obwohl in den quantitativen Real-Time PCRs längere Amplifikate nicht mehr nachgewiesen wurden. Dabei könnten Nukleinsäure-Reparaturmechanismen in den Wirtszellen wie die lichtabhängige Photoreaktivierung und die Nukleotid-Excisionsreparatur eine Rolle spielen. Diese Reparaturmechanismen könnten von Bedeutung sein, wenn die Phagen durch UVC-Bestrahlung zwar Nukleinsäure-Schäden davontragen, aber noch in der Lage sind, ihr Genom in ihre Wirtszellen einzuschleusen. Die Reparaturmechanismen kehren die Formation von Schäden um bzw. schneiden die betreffenden Stellen aus (Knippers *et al.*, 2006). Die lichtabhängige Photoreaktivierung ist an Poliovirus Typ 1 getestet worden, indem bestrahlte Viren mit ihren Wirtszellen im Dunkeln und parallele Proben im Hellen (Weißlicht) belassen wurden, allerdings konnte kein signifikanter Unterschied der Titer festgestellt werden (Nuanualsuwan *et al.*, 2002). Dass Viren Reparaturmechanismen nutzen, wird am Beispiel des Geflügelpestvirus verdeutlicht, welches in seinem Genom selbst für eine CPD-Photolyase codiert (Srinivasan *et al.*, 2001). Nach Reparatur können aus der Wirtszelle intakte Phagen freigesetzt werden. Um einen Einfluss der Wirtsreparaturmechanismen zu belegen, sollten in zukünftigen Arbeiten verschiedene Wirtsstämme untersucht werden, die in unterschiedlichen UVC-Reparaturgenen defekt sind. Diese Reparaturmechanismen können jedoch ebenfalls von den anderen, in dieser Arbeit eingesetzten Phagen eingeschleuste Nukleinsäure reparieren, deren Infektiosität durch UVC-Bestrahlung unter die Nachweisgrenze reduziert wurde. Deshalb könnte ein unterschiedlicher Phagentiter der vernebelten Lysate als Ursache in Betracht gezogen

werden, weshalb es in zukünftigen Experimenten sinnvoll erscheint, zu Vernebelungen einzusetzende Lysate alle in etwa auf einen gleichen Titer zu verdünnen.

Basierend auf den gewonnenen Daten kann festgestellt werden, dass die praktische Anwendung von UVC-Strahlung zur Desinfektion des Luftstroms einer RLT-Anlage einen sinnvollen Beitrag zur Reduktion des viralen Infektionsrisikos darstellen kann. Wie die Experimente mit dem Steritube zeigen, wird nicht nur eine fast vollständige Reduktion der Infektiosität von Virenaerosolen erzielt (Tseng & Li, 2005; diese Arbeit), sondern es werden bei den verwendeten Strahlendosen auch Mikroorganismen wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, Hefezellen von *Candida famata* sowie Pilzsporen von *Penicillium citrinum* inaktiviert (Lin & Li, 2002). Werden die UVC-Röhren aus dotiertem Quarzglas gefertigt, wird die ozonerzeugende Wellenlänge von 185 nm herausgefiltert (Philips, 2007), so dass kein gesundheitsgefährdendes Ozon emittiert wird. Aus diesem Grund ist ein routinemäßiger Einbau von UVC-Modulen in RLT-Anlagen nicht nur dem Allgemeinwohl zuträglich, sondern auch unter volkswirtschaftlichen Gesichtspunkten zu empfehlen. Denn durch routinemäßigen Einbau solcher Module und Optimierung der RLT-Anlage kann die Übertragung von Krankheiten sowie Verminderung von SBS-Symptomen erreicht werden, wodurch der Krankenstand der Angestellten reduziert wird. Da das SBS in direktem Zusammenhang mit verminderter Produktivität und verringerter Arbeitsleistung von Angestellten steht (Wyon, 2004; Niemelä *et al.*, 2006), sollte die Reduktion von SBS-Symptomen und der Einbau von UVC-Modulen für Arbeitgeber rentabel sein. Auch im Bereich der Lebensmittelindustrie erscheint der routinemäßige Einbau von UVC-Modulen sinnvoll. Im Rahmen der Produktsicherheit könnte in Molkereien beispielsweise die Kontamination mit *Lactobacillus*-Phagen reduziert werden, in fleischverarbeitenden Betrieben (Schlachthöfen etc.) könnte durch UVC-Module in RLT-Anlagen der Gehalt an Schimmelpilzsporen und Mikroorganismen wie Legionellen oder Salmonellen in der Zuluft deutlich reduziert werden.

Um in Zukunft auch die Virenbelastung in klimatisierten Räumlichkeiten zu erfassen, ist zu überdenken, ob die VDI-6022 im Hinblick auf Virenbelastungen präzisiert werden sollte. Bisher waren geeignete diagnostische Methoden zum Nachweis von Viren nicht etabliert bzw. bei der routinemäßigen Hygienekontrolle von RLT-Anlagen nicht eingesetzt worden. Das Screening auf eine humanpathogene Virusbelastung von RLT-Anlagen ist aufgrund der parasitären Vermehrung von Viren in Wirtsorganismen schwierig und im Vergleich zu Bakterien oder Pilzen kaum zu realisieren. Daher müssen andere Wege beschritten werden, um die Funktionalität von RLT-Anlagen zu prüfen. Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Phagen könnten sozusagen als Indikator-Viren für diese Fragestellung herangezogen werden, um so beispielsweise die Wirkung von integrierten Desinfektionsmodulen zu testen. Gemäß der VDI-6022 wird lediglich der Einbau von F5/F7- bzw. F7/F9-Filterstufen in RLT-Anlagen empfohlen. Diese besitzen jedoch den Nachteil, dass ihre Porengröße

Virendurchmesser um ein Vielfaches übersteigt. Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Eigenschaften von F5- und F7-Filterelementen nicht ausreichend sind, um Viren in Luftströmen zurückzuhalten. Da die VDI-6022 als technische Richtlinie die Gesundheit von Menschen im Zuluftbereich von RLT-Anlagen schützen möchte, ist hier zu überdenken, ob UVC-Systeme zur Luftentkeimung nicht zukünftig Aufnahme in dieses Regelwerk finden sollten. Dies erscheint deshalb wichtig, weil ein Großteil der Infektionen des oberen Atemtraktes des Menschen durch Viren verursacht werden.

6.4 Vergleich der getesteten UVC-Module

In dieser Arbeit wurde zwar vorwiegend mit dem modular verwendbaren Steritube gearbeitet, darüberhinaus wurden aber auch Experimente mit einem Standardmodul der Firma BÄ•RO durchgeführt. Die UVC-Module der Firma BÄ•RO werden seit Jahren mit sehr gutem Erfolg in RLT-Anlagen verbaut und bieten die Möglichkeit über Standardbauteile in bestehenden Anlagen nachgerüstet zu werden. Das hier verwendete Modul zeigt allerdings hinsichtlich der Vireninaktivierung (Abb. 5.30) eine geringere Leistungsfähigkeit, obwohl mit annähernd rechnerisch ähnlichen UVC-Dosiswerten gearbeitet wurde wie beim Steritube der Firma Virobuster. Erklärbar wird dies über die Tatsache, dass die tatsächliche UVC-Leistung sicherlich von weiteren Faktoren abhängt, was im Folgenden kommentiert werden soll.

Beim BÄ•RO-Modul sind die UVC-Strahler alle im Bereich des Umfanges des Kanalschachtes angeordnet. Bei einem Schachtquerschnitt von 400mm x 700mm stellt sich die Frage, ob die im Zentrum des Schachtes passierenden Mikroorganismen noch ausreichend bestrahlt werden. Die Dosisvariabilität während der Passage ist sicherlich bei der BÄ•RO-Anlage grösser. Ab einem bestimmten Kanalquerschnitt könnte die Möglichkeit bestehen, dass zentrale Luftströme geringeren UVC-Dosen unterliegen. Bei dem getesteten Virobuster-System wird dieses Problem durch die modulare Anordnung vermieden. Darüber hinaus ist das Virobuster-System verspiegelt, wobei der Reflektionsgrad der Strahlung stark von der Materialbeschaffenheit abhängt, die Verspiegelung aber sicherlich die tatsächliche UVC-Dosis erhöht. Zu klären ist auch die Frage, ob der in der Virobuster-Einheit verwendete Radialventilator für eine längere Verweilzeit von Mikroorganismen in der Brennerkammer, bzw. für eine gleichmäßigere Bestrahlung sorgt. Durch radiale Luftströme kommt es in der Brennerkammer zu Verwirbelungen, so dass Partikel nicht den kürzesten linearen Weg durch die Brennerkammer nehmen können. Im Vergleich zu weitgehend linearen Luftströmen sind hier sicherlich Effekte zu erwarten. Denkbar wäre hier bei dem BÄ•RO-Modul mit einfachen Luftleitblechen zu arbeiten, um hier einen linearen zentralen Luftweg zu vermeiden. Bei der BÄ•RO-Anlage sind die Lichtfallen darüber hinaus direkt vor bzw. hinter den Strahlern angeordnet. Eine Verlängerung der Brennerkammer könnte hier die Randstrahlung nutzbar machen. Es erscheint also sinnvoll bei der Entwicklung von UVC-

Systemen die tatsächliche UVC-Dosis zu ermitteln, die Mikroorganismen bei der Passage der Bestrahlungseinheit erfahren. Der folgende Gedanke eines Biosensors zur Ermittlung der tatsächlichen Dosis sollte diskutiert werden. Die PCR ist abhängig von der Anzahl der durch UVC induzierten Photoprodukte. Nimmt die Anzahl an UVC-bedingten Photoprodukten in einer gegebenen Template-DNA zu sinkt die Ausbeute in der nachfolgenden PCR. Es wäre also denkbar ein definiertes DNA Molekül als Biosensor einzusetzen. Wird dieses über eine UVC Strecke vernebelt entstehen Fotoprodukte die direkt abhängig sein müssen von der tatsächlichen UVC-Dosis. Durch nachfolgende Real time-PCR wären diese Dosiseffekte dann darstellbar. Ein solches System ließe sich durch definierte Bestrahlungen (Dosis ist dann bekannt) sogar eichen. Die künstliche Synthese von AT-reichen Biomolekülen könnte hierzu genutzt werden, um ausreichend „Biosensormoleküle“ für derartige Experimente zu erhalten.

6.5 Ausblick

Um die Anwendung der RLT-Modellanlagen unter realistischeren Virenkonzentrationen zu testen, sollten die Vernebelungsexperimente dieser Arbeit mit Phagenlysaten niedrigerer Titer wiederholt werden. Dazu muss untersucht werden, ob sich niedrigtitrige vernebelte Lysate mittels Luftprobensammlung noch nachweisen lassen. Der Einfluss einer Erniedrigung oder Erhöhung der Luftstromgeschwindigkeit sollte ebenso untersucht werden, um die Verweildauer der Aerosole im Bestrahlungsbereich der UVC-Module und somit die UVC-Strahlungsdosis zu variieren, um insbesondere die wirksame Minimaldosis zu erfassen. Dabei scheint es wichtig zu sein die tatsächliche Dosis zu ermitteln die ein Mikroorganismus bei Passage einer Bestrahlungseinheit erfährt. Das etablierte Phagen-Modellsystem kann dabei sowohl für die Optimierung von RLT-Anlagen und implementierter Desinfektionsmaßnahmen, als auch für die Wartung und/oder Dosisbestimmung von UVC-Strahlern eingesetzt werden. Die Entwicklung eines synthetischen Biosensors zur Ermittlung der tatsächlichen Dosis ist in der Diskussion bereits angesprochen worden.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass Viren in Luftströmen tatsächlich infektiös verbleiben. Zukünftig ist in einem aus dieser Arbeit erwachsenen Projekt geplant, die virale Belastung in Wartezimmern von Arztpraxen zu ermitteln. Hier kommen infizierte immunsupprimierte Menschen auf engem Raum zusammen, so dass sich die Frage stellt, ob eine gegenseitige Infektion unter derartigen Bedingungen möglich ist. Ähnlich Fragestellungen ergeben sich auch mit bakteriellen Erregern.

Nachdem die Transmission von Phagen als Modellsysteme in den RLT-Modellanlagen untersucht wurde, können die Studien ausgeweitet werden. In Feldstudien sollte untersucht werden, ob etwa virale Erreger oder deren Nukleinsäuren in RLT-Anlagen nachweisbar sind.

Als Untersuchungsmaterial könnten hierzu auch Filterkuchen von Filterelementen mit langer Standzeit nutzbar gemacht werden.

Interessant aus epidemiologischer Sicht wäre ebenfalls die Fragestellung, ob das Medium Luft bei der Ausbreitung von Noroviren in Gemeinshafteinrichtungen wie Krankenhäuser oder Altenpflegeheime eine Rolle spielt. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Techniken und der entwickelten Applikation für die Firma Sartorius, Gelatinefilter für die nachfolgende Real-Time PCR einzusetzen, werden solche Untersuchungen möglich.

7. Literatur

- Ackermann, H.-W.; Tremblay, D.; Moineau, S. (2004):** Long-Term bacteriophage preservation. World Federation for Culture Collections, Newsletter, No. 38, pp. 35 – 40, Quelle: <http://www.wfcc.info/NEWSLETTER/newsletter38/a4.pdf>
- Allwood, P. B.; Malik, Y. S.; Hedberg, C. W.; Goyal, S. M. (2003):** Survival of F-specific RNA coliphage, Feline Calicivirus, and *Escherichia coli* in water: a Comparative Study. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 9, pp. 5707 – 5710
- Bermphohl, A. (2005):** Bessere Luft durch UVC-Bestrahlung – Aspekte zur aerogenen Übertragung viraler Erreger durch RLT-Anlagen. TGA Fachplaner, Nr. 7, pp. 60 + 61
- Bidawid, S., N. Malik, O. Adegbunrin, S. A. Sattar, J. M. Farber (2003):** A feline kidney cell line-based plaque assay for feline calicivirus, a surrogate for Norwalk virus, Journal of Virological Methods, 107, 163-167
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Research, Vol. 7, No. 6, pp. 1513 – 1523
- Borneff, J.; Borneff, M. (1982):** Hygiene. Ein Leitfaden für Studenten und Ärzte. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. überarbeitete und erweiterte Auflage
- Boullard, A.; Giacomoni, P. U. (1988):** Effect of UV irradiation at defined wavelengths on the tertiary structure of double-stranded covalently closed circular DNA. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology, Vol. 2, pp. 491 – 501
- Bourbeau, J.; Brisson, C.; Allaire, S. (1996):** Prevalence of the sick building syndrome symptoms in office workers before and after being exposed to a building with an improved ventilation system. Occupational and Environmental Medicine, Vol. 53, No. 3, pp. 204 – 210
- Brickner, P. W.; Vincent, R. L.; First, M.; Nardell, E.; Murray, M.; Kaufman, W. (2003):** The application of ultraviolet germicidal irradiation to control transmission of airborne disease: bioterrorism countermeasure. Public Health Reports, Vol. 118, pp. 99 – 114
- Bridges, B. A. (1999):** DNA-repair: Polymerases for passing lesions. Current Biology, Vol. 9, R475 – R477
- Caillet-Fauquet, P.; Di Giambattista, M.; Draps, M.-L.; Sandras, F.; Branckaert, T.; de Launoit, Y.; Laub, R. (2004):** Continuous-flow UVC irradiation: a new, effective, protein activity-preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19. Journal of Virological Methods, Vol. 118, pp. 131 – 139
- Calendar, R. (1988):** The bacteriophages, Volume 2. Plenum Press New York and London
- Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus (2003):** Nuanualsuwan S, Cliver DO. Appl. Environ Microbiol.; 69: 350-7
- Chin, S.; Williams, B.; Gottlieb, P.; Margolis-Nunno, H.; Ben-Hur, E.; Hamman, J.; Jin, R.; Dubovi, E.; Horowitz, B. (1995):** Virucidal short wavelength ultraviolet light treatment of plasma and factor VIII concentrate: protection of proteins by antioxidants. Blood, Vol. 86, No. 11, pp. 4331 – 4336
- Clark, W. A. (1962):** Comparison of several methods for preserving bacteriophages. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 10, No. 5, pp. 466 – 471

- Daugelavicius, R.; Cvirkaite, V.; Gaidelyte, A.; Bakiene, E.; Gabrenaite-Verkhovskaya, R.; Bamford, D. H. (2005):** Penetration of enveloped double-stranded RNA bacteriophages ϕ 13 and ϕ 6 into *Pseudomonas syringae* cells. *Journal of Virology*, Vol. 79, No. 8, pp. 5017 – 5026
- de Laat, W. L.; Jaspers, N. G. J.; Hoeijmakers, J. H. J. (1999) :** Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes & Development*, Vol. 13, pp. 768 – 785
- Douttree, J. C.; Druce, J. D.; Birch, C. J.; Bowden, D. S., Marshall, J. A. (1999):** Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*, Vol. 41, No. 1, pp. 51 – 57
- Dreier, J.; Störmer, M.; Kleesiek, K. (2005):** Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 43, No. 9, pp. 4551 – 4557
- Duizer, E.; Bijkerk, P.; Rockx, B.; de Groot, A.; Twisk, F.; Koopmans, M. (2004):** Inactivation of caliciviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70, No. 8, pp. 4538 – 4543
- Edelman, D. C.; Barletta, J. (2003):** Real-time PCR provides improved detection and titer determination of bacteriophage. *Bio Techniques*, Vol. 35, No. 2, pp. 368 – 375
- Espy, M. J.; Smith, T. F.; Persing, D. H. (1993):** Dependence of Polymerase Chain Reaction Product Inactivation protocols on amplicon length and sequence composition. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 31, No. 9, pp. 2361 – 2365
- Finnegan, M. J.; Pickering, C. A. C.; Burge, P. S. (1984):** The sick building syndrome: prevalence studies. *British Medical Journal*, Vol. 289, pp. 1573 – 1575
- Gelman, F.; Lewis, K.; Klibanov, A. M. (2004):** Drastically lowering the titer of waterborne bacteriophage PRD1 by exposure to immobilized hydrophobic polycations. *Biotechnology Letters*, Vol. 26, pp. 1695 – 1700
- Gerba, C. P.; Gramos, D. M.; Nwachuku, N. (2002):** Comparative inactivation of enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 10, pp. 5167 – 5169
- Goller, J. L.; Dimitriadis, A.; Tan, A.; Kelly, H. ; Marshall, J. A. (2004):** Long-term features of Norovirus gastroenteritis in the elderly, *Journal of Hospital Infection*, Vol. 58, pp. 286 – 291
- Griffiths, W. D.; Bennett, A.; Speight, S.; Parks, S. (2005):** Determining the performance of a commercial air purification system for reducing airborne contamination using model micro-organisms: a new test methodology. *Journal of Hospital Infection*, Vol. 61, pp. 242 – 247
- Hermann, J. R.; Hoff, S. J.; Yoon, K. J.; Burkhardt, A. C.; Evans, R. B.; Zimmerman, J. J. (2006):** Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 72, No. 7, pp. 4811 – 4818
- Hijnen, W. A. M.; Beerendonk, E. F.; Medema, G. J. (2005):** Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Research*, Vol. 40, pp. 3 - 22
- Ijaz, M. K.; Karim, Y. G.; Sattar, S. A.; Johnson-Lussenburg, C. M. (1987):** Development of methods to study the survival of airborne viruses. *Journal of Virological Methods*, Vol. 18, pp. 87 – 106

- Inactivation of feline calicivirus and adenovirus type 40 by UV radiation (2003):** Thurston-Enriquez JA, Haas CN, Jacangelo J, Riley K, Gerba CP. *Appl. Environ Microbiol.*; 69: 577-82
- Jaschhof, H. (1992):** Sammlung von Viraerosolen mit dem Gelatine-Membranfilter. *BioTec 4* (4), p. 22 – 26; Sammlung von Viraerosolen, Vergleichende Untersuchungen zur Effektivität von Gelatine-Membranfiltern, Schlitzsammler und Impinger. *BioTec 5* (4), pp. 24 – 27
- Jensen, M. (1964):** Inactivation of airborne viruses by ultraviolet irradiation. *Applied Microbiology*, Vol. 12, No. 5, pp. 418 – 420
- Jepson, C. D.; March, J. B. (2004):** Bacteriophage lambda is a highly stable DNA vaccine delivery vehicle. *Vaccine*, Vol. 22, pp. 2413 – 2419
- Jones, M. V.; Bellamy, K.; Alcock, R.; Hudson, R. (1991):** The use of bacteriophage MS2 as a model system to evaluate virucidal hand disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, Vol. 17, pp. 279 – 285
- Kapikian, A. Z.; Wyatt, G.; Dolin, R.; Thornhill, T. S.; Kalica, A. R.; Chanock, R. M. (1972):** Visualisation by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology*, Vol. 10, No. 5, pp. 1075 – 1081
- Klaus, S.; Krüger, D. H.; Meyer, J. (1992):** Bakterienviren. Gustav Fischer Verlag Jena – Stuttgart
- Knippers, Rolf (2006):** Molekulare Genetik. 9., komplett überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart – New York
- Ko, G.; First, M. W.; Burge, H. A. (2000):** Influence of relative humidity on particle size and UV sensitivity of *Serratia marcescens* and *Mycobacterium bovis* BCG aerosols. *Tubercle and Lung Disease*, Vol. 80, No. 4 / 5, pp. 217 – 228
- Ko, G.; First, M. W., Burge, H. A. (2002):** The characterization of upper-room ultraviolet germicidal irradiation in inactivating airborne microorganisms. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 110, No. 1, pp. 95 – 101
- Komanapalli, I. R.; Lau, B. H. S. (1998):** Inactivation of bacteriophage λ , *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 49, pp. 766 – 769
- Kujundzic, E.; Matalkah, F.; Howard C. J.; Hernandez, M.; Miller, S. L. (2006):** UV air cleaners and upper-room air ultraviolet germicidal irradiation for controlling airborne bacteria and fungal spores. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, Vol. 3, No. 10, pp. 536 – 546
- Kundsinn, R. B. (1965):** Characterization of *Mycoplasma* Aerosols as to viability, particle size, and lethality of ultraviolet irradiation. *Journal of Bacteriology*, Vol. 93, No. 3, pp. 942 – 944
- Kurosaki, Y.; Abe, H.; Morioka, H.; Hirayama, J.; Ikebuchi, K.; Kamo, N.; Nikaido, O.; Azuma, H.; Ikeda, H. (2003):** Pyrimidine dimer formation and oxidative damage in M13 bacteriophage inactivation by ultraviolet C irradiation. *Photochemistry and Photobiology*, Vol. 78, No. 4, pp. 349 – 354
- Levetin, E.; Shaughnessy, R.; Rogers, C. A.; Scheir, R. (2001):** Effectiveness of germicidal UV radiation for reducing fungal contamination within air-handling units. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No. 8, pp. 3712 – 3715
- Li, Q.; MacDonald, S.; Bienek, C.; Foster, P. R.; MacLeod, A. J. (2005):** Design of a UV-C irradiation process for the inactivation of viruses in protein solutions. *Biologicals*, Vol. 33, pp. 101-110

- Lin, L.; Londe, H.; Hanson, C. V.; Wieseahn, G.; Isaacs, S.; Cimino, G.; Corash, L. (1993):** Photochemical inactivation of cell-associated human immunodeficiency virus in platelet concentrates. *Blood*, Vol. 82, No. 1, pp. 292 – 297
- Lin, L.; Londe, H.; Janda, M.; Hanson, C. V.; Corash, L. (1994):** Photochemical inactivation of pathogenic bacteria in human platelet concentrates. *Blood*, Vol. 83, No. 9, pp. 2698 - 2706
- Lin, C.-Y.; Li, C.-S. (2002):** Control effectiveness of ultraviolet germicidal irradiation on bioaerosols. *Aerosol Science and Technology*, Vol. 36, pp. 474 – 478
- Maniatis, T.; Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Russell, D. W. (1989):** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Band 1 bis 3
- Marks, P. J.; Vipond, I. B.; Carlisle, D.; Deakin, D.; Fey, R. E.; Caul, E. O. (2000):** Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection*, Vol. 124, pp. 481 – 487
- Mendell, M. J.; Smith, A. H. (1990):** Consistent pattern of elevated symptoms in air-conditioned office buildings: A Reanalysis of Epidemiologic Studies. *American Journal of Public Health*, Vol. 80, No. 10, pp. 1193 – 1199
- Mendell, M. J.; Fisk, W. J.; Deddens, J. A.; Seavey, W. G.; Smith, A. H.; Smith, D. F.; Hodgson, A. T.; Daisey, J. M.; Goldman, L. R. (1996):** Elevated symptom prevalence associated with ventilation type in office buildings. *Epidemiology*, Vol. 7, No. 6, pp. 583 – 589
- Mendell, M. J.; Cozen, M.; Lei-Gomez, Q.; Brightman, H. S.; Erdmann, C. A.; Girman, J. R.; Womble, S. E. (2006):** Indicators of moisture and ventilation system contamination in U.S. office buildings as risk factors for respiratory and mucous membrane symptoms: analysis of the EPA BASE data. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, Vol. 3, No. 5, pp. 225 – 233
- Meng, Q. S.; Gerba, C. P. (1996):** Comparative inactivation of enteric adenoviruses, poliovirus and coliphages by ultraviolet irradiation. *Water Research*, Vol. 30, No. 11, pp. 2665 – 2668
- Menzies, D.; Pasztor, J.; Rand, T.; Bourbeau, J. (1999):** Germicidal ultraviolet irradiation in air conditioning systems: effect on office worker health and wellbeing: a pilot study. *Occupational and Environmental Medicine*, Vol. 56, pp. 397 – 402
- Menzies, D.; Popa, J.; Hanley, J. A.; Rand, T.; Milton, D. K. (2003):** Effect of ultraviolet germicidal lights installed in office ventilation systems on workers' health and wellbeing: double-blind multiple crossover trial. *The Lancet*, Vol. 362, No. 9398, pp. 1785 – 1791
- Miller, R. L.; Plagemann, P. G. W. (1974):** Effect of ultraviolet light on Mengovirus: formation of uracil dimers, instability and degradation of capsid, and covalent linkage of protein to Viral RNA. *Journal of Virology*, Vol. 13, No. 3, pp. 729 – 739
- MMWR (2001):** "Norwalk-Like Viruses:" Public health consequences and outbreak management. Centers for Disease Control and Prevention, *MMWR*, Vol. 50, No. RR-9, pp. 1 – 17
- Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U. (2003):** Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin, 2. Auflage
- Moorer, W. R. (2003):** Review Article: Antiviral activity of alcohol for surface disinfection. *International Journal of Dental Hygiene*, Vol. 1, No. 3, pp. 138 – 142

- 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.
- Myatt, T. A.; Johnston, S. L.; Rudnick, S.; Milton, D. K. (2003):** Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay. BMC Public Health, Vol. 3, No. 5, Published online 2003 January 13. <http://www.biomedcentral.com/1471-2458/3/5>
- Nicas, M. (1996):** Estimating exposure intensity in an imperfectly mixed room. American Industrial Hygiene Association Journal, Vol. 57, pp. 542 – 550
- Niemelä, R.; Seppänen, O.; Korhonen, P.; Reijula, K. (2006):** Prevalence of building-related symptoms as an indicator of health and productivity. American Journal of Industrial Medicine, Vol. 49, No. 10, pp. 819 – 825
- Nuanualsuwan, S.; Mariam, T.; Himathongkham, S.; Cliver, D. O. (2002):** Ultraviolet inactivation of feline calicivirus, human enteric viruses and coliphages. Photochemistry and Photobiology, Vol. 76, No. 4, pp. 406 – 410
- Nuanualsuwan, S.; Cliver, D. O. (2003):** Infectivity of RNA from inactivated poliovirus. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 63, No. 3; pp. 1629 – 1632
- Ooi, P. L.; Goh, K. T.; Phoon, M. H.; Foo, S. C.; Yap, H. M. (1998):** Epidemiology of sick building syndrome and its associated risk factors in Singapore. Occupational and Environmental Medicine, Vol. 55, pp. 188 – 193
- Peccia, J.; Werth, H. M.; Miller, S.; Hernandez, M. (2001):** Effects of relative humidity on the ultraviolet induced inactivation of airborne bacteria. Aerosol Science and Technology, Vol. 35, pp. 728 – 740
- Philips (2007):** Philips: Desinfektion mit UV-Strahlung - Strahlungsquellen, technische Hinweise, Anwendungen. Firmeninformation Philips Lighting.
- Porstmann, T. (1996):** Virusdiagnostik. Diagnostische Bibliothek, Band 1, Berlin, Wien, Blackwell-Wissenschaftsverlag, (1. Auflage).
- Robert Koch Institut (2004):** Erkrankungen durch Noroviren in Deutschland in saisonaler Darstellung von 2001 bis 2004. Epidemiologisches Bulletin, Nr. 36, pp. 295-306.
- Robertson, A. S.; Burge, P. S.; Hedge, A.; Sims, J.; Gill, F. S.; Finnegan, M.; Pickering, C. A. C.; Dalton, G. (1985):** Comparison of health problems related to work and environmental measurements in two office buildings with different ventilation systems. British Medical Journal, Vol. 291, pp. 373 – 376
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 74, No. 12, pp. 5463 – 5467
- Servey, J. T.; Reamy, B. V.; Hodge, J. (2007):** Clinical presentations of parvovirus B19 infection. American Family Physician, Vol. 75, No. 3, pp. 373 – 376
- Shin, G.-A.; Sobsey, M. D. (2003):** Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of Water. Applied and Environmental Microbiology, Vol. 69, No. 7, pp. 3975 – 3978

- Sinha, R. P.; Häder, D.-P. (2002):** UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences*, Vol. 1, pp. 225 – 236
- Srinivasan, V.; Schnitzlein, W. M.; Tripathy, D. N. (2001):** Fowlpox virus encodes a novel DNA repair enzyme, CPD-Photolyase, that restores infectivity of UV light-damaged virus. *Journal of Virology*, Vol. 75, No. 4, pp. 1681 – 1688
- Stock, I. (2004):** Coronaviren als Krankheitserreger des Menschen. *Chemotherapie Journal*, Vol. 13, Heft 1/2004, pp. 17 – 26
- Störmer, M; Cassens, U.; Kleesiek, K.; Dreier, J. (2007):** Detection of bacteria in platelet concentrates prepared from spiked single donations using cultural and molecular genetic methods. *Transfusion Medicine*, No. 17, pp. 61 – 70
- Stuart, H. A.; Klages, G. (2000):** Kurzes Lehrbuch der Physik. Springer-Verlag Berlin - Heidelberg
- Tarlo, S. (2006):** Cough: Occupational and environmental considerations: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, Vol. 129, pp. 186 – 196
- Teeuw, K. B.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; Verhoef, J. (1994):** Airborne gram-negative bacteria and endotoxin in sick building syndrome. A study in Dutch governmental office buildings. *Archives of Internal Medicine*, Vol. 154, No. 20, pp. 2339 – 2345
- Templeton, M. R.; Andrews, R. C.; Hofmann, R. (2005):** Inactivation of particle-associated viral surrogates by ultraviolet light. *Water Research*, Vol. 39, No. 15, pp. 3487 – 3500
- Thiemann, F.; Cullen, P. M.; Klein, H.-G. (2006):** Leitfaden Molekulare Diagnostik. Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks. WILEY-VHC Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim
- Thornton, A. C.; Jennings-Conklin, K. S.; McCormick, M. I. (2004):** Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manage Response*, Vol. 2, No. 1, pp. 4 – 9
- Thurston-Enriquez, J. A.; Haas, C. N.; Jacangelo, J.; Riley, K.; C. P. Gerba (2003):** Inactivation of feline calicivirus and adenovirus Type 40 by UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 1, pp. 577 – 582
- Tseng, C.-C.; Li, C.-S. (2005):** Inactivation of virus-containing aerosols by ultraviolet germicidal irradiation. *Aerosol Science and Technology*, Vol. 39, pp. 1136 – 1142
- Turiel, I.; Hollowell, C. D.; Miksch, R. R.; Rudy, J. V.; Young, R. A.; Coye, M. J. (1983):** Effects of reduced ventilation on indoor air quality in an office building. *Atmospheric Environment*, Vol. 17, No. 1, pp. 51 – 64
- Urbach, F.; Forbes, P. D.; Davies, R. E.; Berger, D (1976):** Cutaneous photobiology: past, present and future. *The Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 67, No. 1, pp. 209 – 224
- VDI 6022 (2006):** Richtlinie VDI 6022 Hygienische Anforderungen an raumluftechnische Anlagen und Geräte, Blätter 1 – 3
- Voet, D.; Voet, J. G. (1994):** Biochemie. WILEY-VHC Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim
- Wang, C.-H.; Tschen, S.-Y.; Flehmig, B. (1995):** Antigenicity of hepatitis A virus after ultra-violet inactivation. *Vaccine*, Vol. 13, pp. 835 – 840
- Wang, J.; Mauser, A.; Chao, S.-F.; Remington, K.; Treckmann, R.; Kaiser, K.; Pifat, D.; Hotta, J. (2004):** Virus inactivation and protein recovery in a novel ultraviolet-C reactor. *Vox Sanguinis*, Vol. 86, pp. 230 – 238

- Watson, J. D.; Baker, T. A.; Bell, S. P.; Gann, A.; Levine, M.; Losick, R. (2004):** Molecular Biology of the Gene, Fifth Edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Watzinger, F.; Suda, M.; Preuner, S.; Baumgartinger, R.; Ebner, K.; Baskova, L.; Niesters, H. G. M.; Lawitschka, A.; Lion, T. (2004):** Real-Time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 42, No. 11, pp. 5189 – 5198
- Wong, S. S. Y.; Yuen, K.-Y. (2006):** Avian influenza virus infections in humans. *Chest*, Vol. 129, pp. 156 – 168
- Woolwine, J. D.; Gerberding, J. L. (1995):** Effect of testing method on apparent activities of antiviral disinfectants and antiseptics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 39, No. 4, pp. 921 – 923
- Wu, H. M.; Fornek, M.; Schwab, K. J.; Chapin, A. R.; Gibson, K.; Schwab, E.; Spencer, C.; Henning, K. (2005):** A Norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, Vol. 26, No. 10, pp. 802 – 820
- Wyon, D. P. (2004):** The effects of indoor air quality on performance on productivity. *Indoor Air*, Vol. 14, No. 7, pp. 92 – 101
- Yang, H.; Makeyev, E. V.; Butcher, S. J.; Gaidelyte, A.; Bamford, D. H. (2003):** Two distinct mechanisms ensure transcriptional polarity in double-stranded RNA bacteriophages. *Journal of Virology*, Vol. 77, No. 2, pp. 1195 – 1203
- Zemke, V.; Glade, T.; Kiel, K.; Kolb, H.; Kralj, N.; Merdian, J.; Müller, K.; Rabente, T.; Schlieper, R.; Siebert, B. (2005):** Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS). Bericht Gefährdung und Schutzmaßnahmen bei nicht gezielten Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen bei der Lebensmittelherstellung. Merkblätter Biologische Arbeitsstoffe, Ecomed Sicherheit.
- Zölzer, F.; Kiefer, J. (1989):** Zelluläre Wirkungen der ultravioletten Komponente des Sonnenlichts. *Naturwissenschaften*, Vol. 76, pp. 489 – 495

8. Abkürzungsverzeichnis

6-4PP	6-4 Photoprodukt
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Acc.Nr.	accession number
add.	Addieren
b	Basen
BHQ	Black hole quencher
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CaCV	Canines Calicivirus
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin Dimer
ct-Wert	crossing point of threshold
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Stammsammlung
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
ddNTP	didesoxy-Nukleotidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminteraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EZ	Eppendorfzentrifuge
F-	forward
FAM	6-Carboxy-fluorescein
FCV	Felines Calicivirus
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
<i>g</i>	Erdbeschleunigung [m/s^2]
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
h	Höhe (in Formeln)

IC	interne Kontrollreaktion
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
JOE	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxy-
fluorescein	
L	Liter
LB	Luria Bertani
LBMM	Luria Bertani mit Magnesiumsulfat und Maltose
log-Stufe	logarithmische Stufe
min	Minute
MEK	Methyl-Ethyl-Keton
OD	optische Dichte
oxoG	7,8-Dihydro-8-Oxoguanin
p.	Page
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFU	Plaque Forming Unit
pp.	Pages
quant.	quantifiziert
r	Radius
R-	reverse
RH	relative Luftfeuchtigkeit
RLT-Anlage	raumluftechnische Anlage
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
s	Sekunde
s.	siehe
ssDNA	einzelsträngige DNA
ssRNA	einzelsträngige RNA
SBS	Sick Building Syndrome
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisborat-EDTA

TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U	Unit (Enzymkonzentration)
ü. N.	über Nacht
UNG	Uracil-N-Glycosylase
UV	ultraviolette Strahlung
UVC	ultraviolette Strahlung im Bereich 280 bis 185 nm
VDI	Verband Deutscher Ingenieure
Vol.	Volume
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

9. Veröffentlichungen

9.1 Publikationen

1. BERPPOHL, A., WEIßHAAR, I., WALENDA, T., KLEESIEK, K., and DREIER, J. (2007). Transfer of airborne virus particles by conditioning systems and inactivation by ultraviolet irradiation. *Reinraumtechnik: Innovative Verfahren zum Schutz von Produkten und Personen, VDI-Berichte 1973*: 67-75
2. Dreier, J., BERPPOHL, A., JESCHIN, P., BECKER, B., and KLEESIEK, K. (2008). Virus transmission via HVAC systems and inactivation using UVC irradiation. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* **68**: 379-384.

9.2 Tagungsbeiträge

1. Workshop: Verbreitung aerogener Viren über Raumluftechnische Anlagen. Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen, 17.1.2008.
2. Seminar: Transmission von Viren über RLT-Anlagen. Workshop zum Forschungsvorhaben Nr. S770, Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen, 25.3.2009
3. BERPPOHL, A. (2007): Übertragung von Viren durch RLT-Anlagen und Inaktivierung durch UVC-Strahlung., Reinraumtage Basel, Innovative Verfahren zum Schutz von Produkten und Personen, Basel (Schweiz), 23/24.10.2007.
4. BERPPOHL, A. (2007): UVC Applikations. UVC technology in air conditioning systems. USA Penn State University, 25.07.2007

9.3. Transfer der Ergebnisse an mittelständige Unternehmen

Die Ergebnisse des Forschungsprojektes wurden erfolgreich an mittelständige Unternehmen transferiert. Durch eine zeitnahe Berichterstattung der Resultate an die beteiligten Industrieunternehmen durch die beiden Workshops (s. Kap. 9.2) und Vorträge auf internationalen Tagungen wurden die Erkenntnisse in die Produktverbesserung integriert. So wurde durch die Fa. Virobuster der Brennerkanal aufgrund der vorliegenden

biogenen Daten optimiert. Die Fa. BÄRO hat Hinweise auf eine ineffektive Virusabreicherung durch die eingesetzten UVC-Brenner erhalten. Durch technische und bauliche Änderung wie eine Verspiegelung der Brennerkammer, Luftleitbleche und Einsatz von Radialventilatoren wurde eine Optimierung der bestehenden Anlage erzielt. Für die Fa. Sartorius AG wurde eine Applikation zur Nukleinsäureextraktion aus Gelatinefilter erstellt, die sich für den molekulargenetischen Nachweis viraler Infektionserreger eignet. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden einem breiten Publikum in Fortbildungs- und Schulungsmaßnahmen nach der VDI-6022 durch das Pilotunternehmen Biotec GmbH, Gütersloh vorgestellt (Themen: Hygiene von Klimaanlage und Hygieneschulungen, Hygieneinspektion, Raumlufttechnik, Krankenhaushygiene, Reinraumtechnik, Luftanalytik). Verbreitung finden die Forschungsergebnisse ebenfalls über die regelmäßigen RLT-Seminare bei der Fa. BÄRO, Leichlingen, an denen mittelständige Unternehmen teilnehmen. Der Verband Deutscher Ingenieure wird die Ergebnisse als VDI-Fortschrittsbericht (VDI6022) oder als VDI-Richtlinie publik machen. In der nächsten VDI-Ausschusssitzung werden die Ergebnisse des Forschungsprojektes vorgestellt und diskutiert. Wesentlich hierbei ist, dass die erzielten Ergebnisse damit einen Einfluß auf den Stand der Technik im Bereich von Klima und Versorgungstechnik haben. Die Berücksichtigung der erzielten Ergebnisse in einer Hygiene-Richtlinie ist von gemeinnützigem Interesse, zumal das Arbeitsschutzgesetz auf diese Richtlinie verweist.

Anhang:

Publikationen

Berpohl, A., Weißhaar, I., Walenda, T., Kleesiek, K., and Dreier, J. (2007). Transfer of airborne virus particles by conditioning systems and inactivation by ultraviolet irradiation. *Reinraumtechnik: Innovative Verfahren zum Schutz von Produkten und Personen, VDI-Berichte 1973: 67-75*

Dreier, J., Berpohl, A., Jeschin, P., Becker, B., and Kleesiek, K. (2008). Virus transmission via HVAC systems and inactivation using UVC irradiation. *Gefahrstoffe -Reinhaltung der Luft 68: 379-384.*

Übertragung von Viren durch RL-T-Anlagen und Inaktivierung durch UVC-Strahlung

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

Dr. rer. nat. **A. Bermann**, Dipl.-Biol. **I. Weishaar**, biotec GmbH,
Güterloh, Dipl. Biol. **T. Watenda**, Prof. Dr. med. **K. Kleesiek**,
Dr. rer. nat. **J. Dreier**, Herz- und Diabeteszentrum Nordrhein-Westfalen,
Bad Oeynhausen

Reinraumtechnik: Innovative Verfahren zum Schutz von Produkten und Personen

Kurzfassung

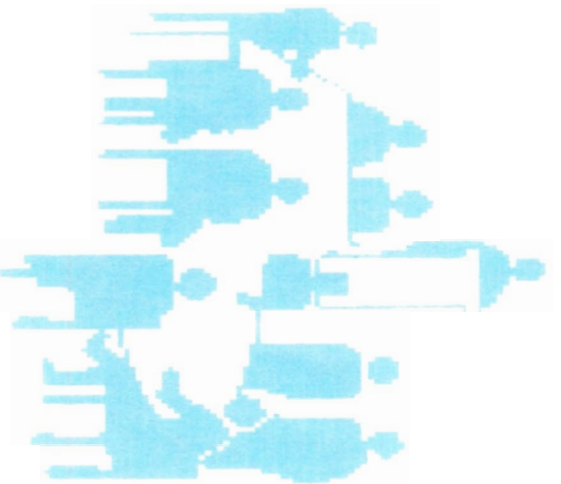
Die vorliegende Studie zeigt, dass Viren, die über Vernebelungsexperimente in eine Versuchs-RL-T-Anlage eingebracht werden, bis zu vier Stunden später noch in infektiöser Form im Zuluftstrom nachweisbar sind. Selbst komplex gebaute Viren sind über diesen Zeitraum in infektiöser Form detektierbar. Über Real-Time PCR besteht die Möglichkeit mit hoher Sensitivität virale Nukleinsäuren in Luftströmen quantitativ zu erfassen. Die nach VDI6022 in RL-T-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, dass den Stand der Technik im Bereich der Lufthygiene von Raumlufttechnischen Anlagen (RL-T-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].



VDI-Berichte 1973

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 berechtigte Frage nach einem möglichen Transfer viraler Erreger durch RL-T-Anlagen zu.

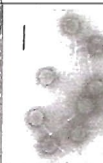



Derzeit ist wenig über die Infektiosität von Viren nach längerer Luftexposition bekannt, was aber nicht zwangsläufig bedeutet, dass man die Infektionsroute über RL-T-Anlagen *a priori* vernachlässigen kann. So ist beispielsweise für das Norovirus, einem wichtigen Erreger der Gastroenteritis bekannt,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

Es stellt sich also die Frage, ob die derzeit in RL-T-Anlagen für Büro-Versammlungs- und Produktionsräumen verwendeten Filterelemente (F7/F5) 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 (UV-C-Strahlung) zur Inaktivierung luftgetragener Viren in RL-T-Anlagen vorgestellt. Die Integration von UV-C-Entkeimungssystemen in RL-T-Anlagen hat in einer Studie von Menzies et al. [6] zu einer Reduktion von arbeitsplatzbezogenen Krankheitserscheinungen insbesondere hinsichtlich Atemwegs- und Schleimhaut bezogenen Symptomen geführt.

Material und Methode

Für die Studien zur Virusstransmission 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 UV-C, mechanisches Rückkalvermögen durch Filter, Dehydratationseigenschaften) zu erwarten sind.

Tab. 1: Bakteriophagenauswahl und humanpathogenes Analogon

Virus (Wirt)	Virusgenom		Hüllstruktur	Größe	Morphologie ¹⁾	Modellvirus für
	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
φ X174 (<i>Escherichia coli</i>)	ss-DNA (-Strang)	ringförmig	kosaeder, nackt	25 nm		Adenoviridae z.B. Adenovirus
MS2 (<i>Escherichia coli</i>)	ss-RNA (+Strang)	Linear	kosaeder, nackt	26 nm		Caliciviridae z.B. Norovirus
φ 6 (<i>Pseudomonas syringae phaseolicola</i>)	ds-RNA	Linear	Sphärisch, umhüllt	66 nm		Orthomyxoviridae z.B. Influenzavirus

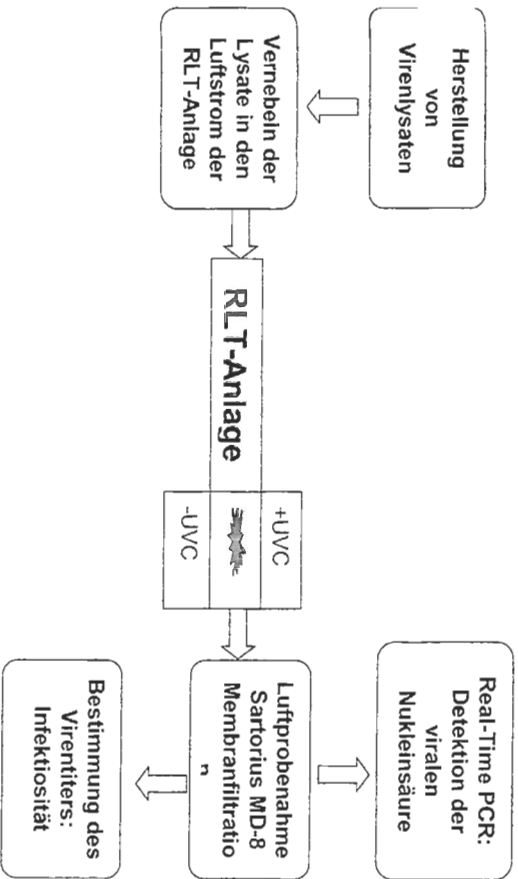
¹⁾ Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus ICTVdB (The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses), Maßstab 100 nm

Die Bestimmung der Infektiosität der Phagen erfolgte über standardisierte Weichagar-Plattierungsmethoden mit definierten Bakterien-Indikatorstämmen, wobei eine Quantifizierung über die Bestimmung der PFU (Plaques 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 virusspezifische Amplifikate unterschiedlicher Länge gewonnen werden.

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

Abb. 1: Versuchsaufbau

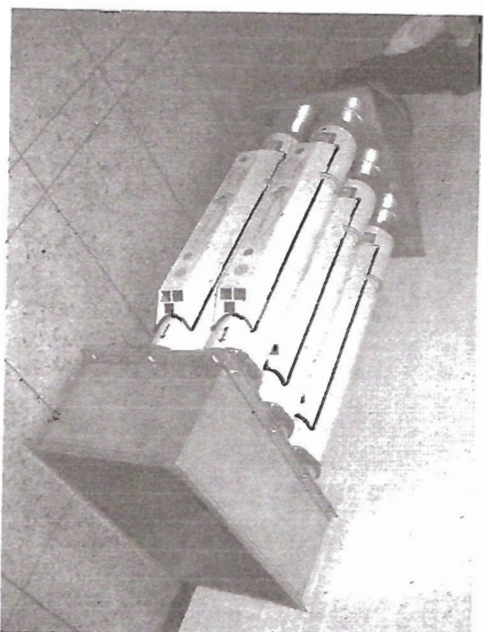


In die oben beschriebene Versuchs-RL-T-Anlage [7] wurden über einen Pari-Aerosolgenerator (Pari-LC Plus) definierte Virmengen eingebracht.

Sowohl für die Bestimmung der Infektiosität als auch für die PCR erfolgte die Luftprobenahme am Luftaustlass 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 Nachweisemethode aufbereitet [7].

Die Inaktivierungsexperimente wurden mit Steritube UVC-Modulen (TUV,UVC 2 x 95W, Philips) der Firma Vibuster 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 RL-T Anlagen integrieren (Abb. 2). Die Bestrahlungsdosis betrug $77 \text{ mJ}/\text{cm}^2$. Die Luftprobenahmen erfolgten im Auslassbereich eines Modules.

Abb. 2: Steritube UVC-Modulechologie der Firma Vibuster zum Einbau in RL-T-Anlagen

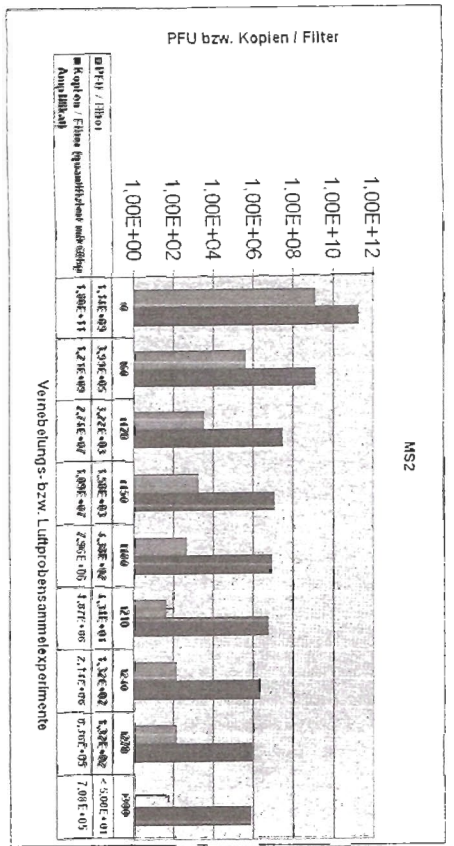


Ergebnisse

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 RL-T-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 RL-T-Anlage



Deutlich wird hierbei ebenfalls die Sensitivität des spezifischen Nukleinsäurenachweises mittels Real-Time PCR. Nach 300 min nach Vernebelung (t_{500}) 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	$1,5 \times 10^8$	$1,23 \times 10^5$
F5	$1,5 \times 10^8$	$9,67 \times 10^4$
F7	$1,0 \times 10^{11}$	$7,57 \times 10^8$

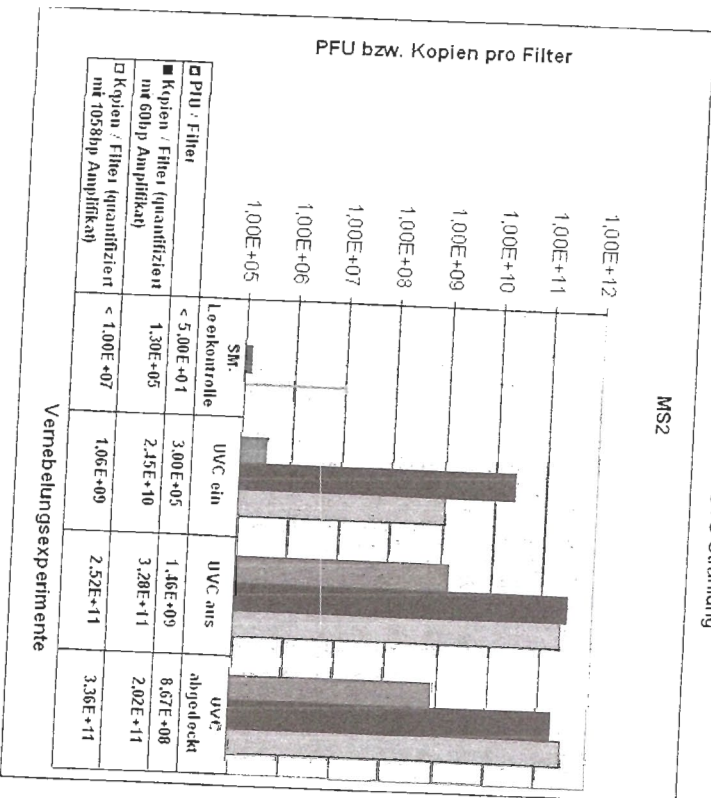
* PFU= Plaque Forming Units

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

Filterelement	Vernebelte Nukleinsäure-Kopien	Nukleinsäurekopien im Zuluftstrom (60bp-Amplifikat) t_{50}	Nukleinsäurekopien im Zuluftstrom (60bp-Amplifikat) t_{50}
ohne	$4,49 \times 10^{11}$	$7,9 \times 10^7$	$1,29 \times 10^7$
F5	$2,56 \times 10^{12}$	$1,5 \times 10^8$	$3,34 \times 10^8$
F7	$1,15 \times 10^{13}$	$2,54 \times 10^8$	$5,74 \times 10^8$

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 eingesetzten Amplifikat-Länge durch UVC-Bestrahlung reduziert.

Abb. 4: Reduktion des Bakteriophagen MS2 durch UVC Strahlung



Vernebelungsexperimente

Filterelement	Vernebelte Virenmenge	Infektiöse Viren (PFU) im Zuluftstrom pro m^3
ohne	$1,5 \times 10^8$	$1,23 \times 10^5$
F5	$1,5 \times 10^8$	$9,67 \times 10^4$
F7	$1,0 \times 10^{11}$	$7,57 \times 10^8$

* PFU= Plaque Forming Units

Der komplex gebaute Bakteriophage Lambda lässt sich sogar bei einmaliger Passage des Sterilube-UVC Modules von $1,64 \times 10^5$ 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 RL-T-Anlagen vermuten kann, zumal Infektionsdosen bei diesem extrem umweltschlauen Virus von 10-100 Viruspartikeln ausreichen. Selbst komplex gebaute Viren sind in Luftströmen von RL-T-Anlagen mehrere Stunden stabil.

Die molekularbiologischen Analysen mittels Real-Time PCR demonstrieren, dass eine schnelle und sensitive Analytik viraler Nukleinsäuren im Luftstrom von RL-T-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, RL-T-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 RL-T-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 RL-T-Anlage eine echte Alternative zur Reduktion luftgetragener Mikroorganismen insbesondere von Viren bieten. Die Modularität des hier verwendeten Sterilubes (Fa. Vibroster, Niederlande) bietet die Möglichkeit eines einfachen Einbaus der Module auch in bereits bestehende Anlagen.

Zukünftige Feldstudien sollen zeigen, inwieweit eine Integration von UVC-Modulen in RL-T-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 Raumlufttechnische 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., Gaul, 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 Raumlufttechnische Anlagen Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- [8] Schulz, J., Berrpohl, A., Dreiselkelmann, B. (2003). Inaktivierung luftgetragener DNA-Aerosole mit Hilfe einer UVC-Arbeitskabine (Biotec). GIT Laborfachzeitschrift 47: 52-54.

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

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 verwendete 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 feliner 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,

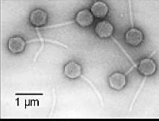
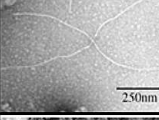
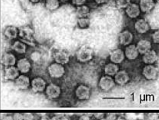
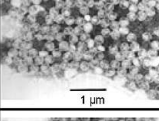
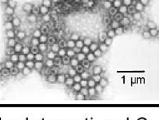
Biotech GmbH, Gütersloh.

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.

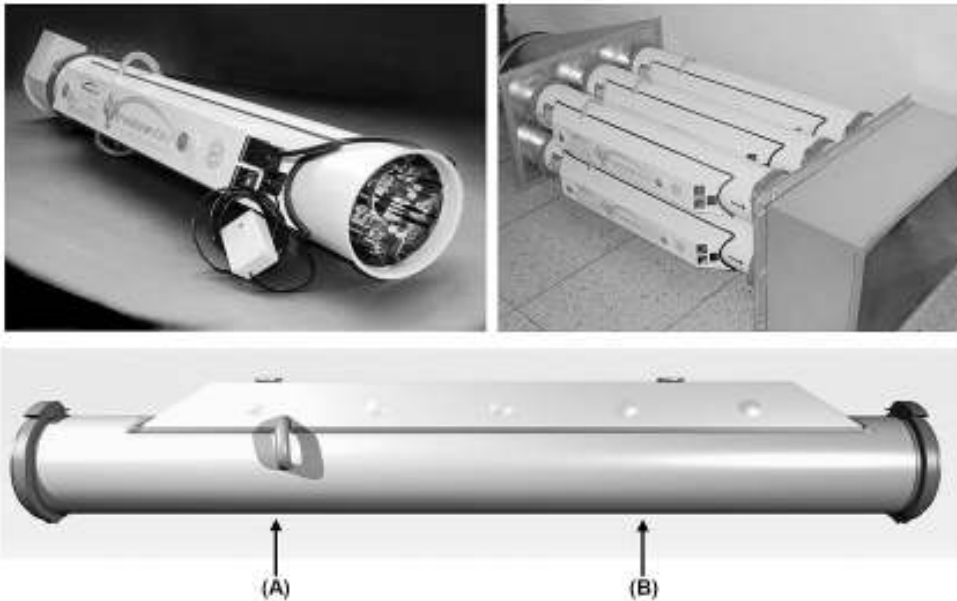


Bild 2. Steritube UVC-Modultechnologie (Fa. Virobuster) zum Einbau in RLT-Anlagen.
oben: Ansicht eines Steritube-Moduls und mehrerer in paralleler Schaltung
unten: Links befindet sich der Lufteinlass, rechts der Luftauslass; (A): Der Pfeil verweist auf die Position des Ventilators im Inneren des Steritubes; (B): Der Pfeil verweist 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 Kühlelement 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 Ver-suchs-RLT-Anlage wurden über einen Pari-Aerosolgenera-tor (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 ab-filtriert wurde. Die Filter wurden anschließend für die jewei-lige Nachweismethodik aufbereitet.

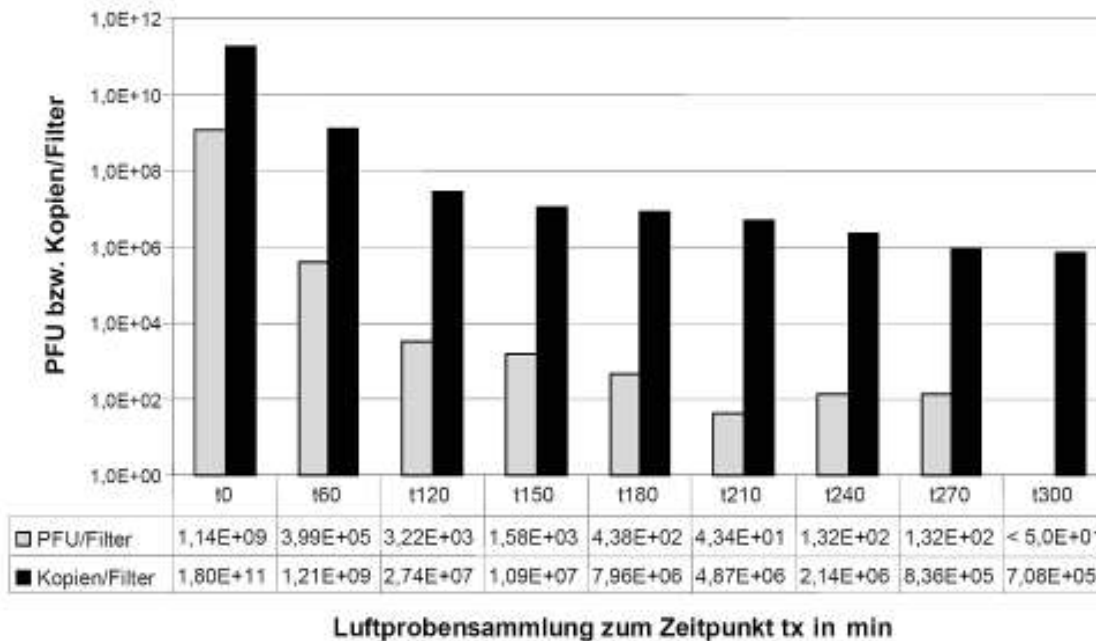


Bild 3. Verweilzeit von MS2-Viren nach Vernebelung in eine RLT-Anlage.
 Ermittelte MS2-Konzentrationen mittels Phagen-titerung (PFU; graue Balken) und Real-Time PCR (Kopien; schwarze Balken) pro Gelatinefilter. Nach einmaliger Vernebelung von $4,68 \cdot 10^{10}$ PFU in die RLT-Anlage wurden Luftproben 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.

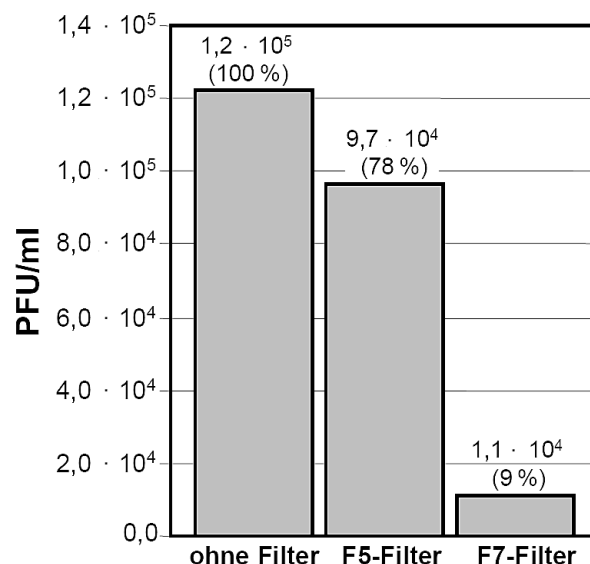
3 Ergebnisse

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 Luftprobensamplers nieder-

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



Wiederfindungsrate :

- Ohne Filter: 0,082 %
- Mit F5-Filter: 0,064 %
- Mit F7-Filter: 0,007 %

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-

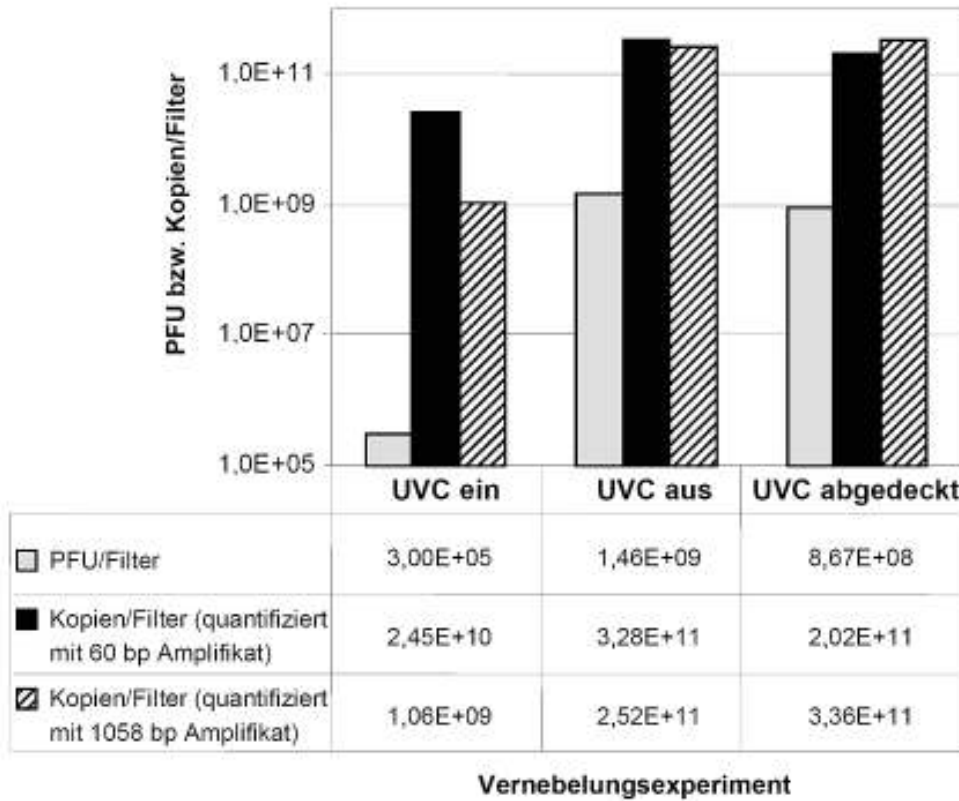


Bild 5. Reduktion des Bakteriophagen MS2 durch UVC-Strahlung.
 Ermittelte Phagenkonzentration pro Filter mittels Titerung (PFU; graue Balken) und Real-Time PCR mit 60 bp (schwarze Balken) bzw. 1 058 bp-Amplifikatgröße (schraffierte Balken) bestimmten Kopienzahlen nach verschiedenen Vernebelungsexperimenten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

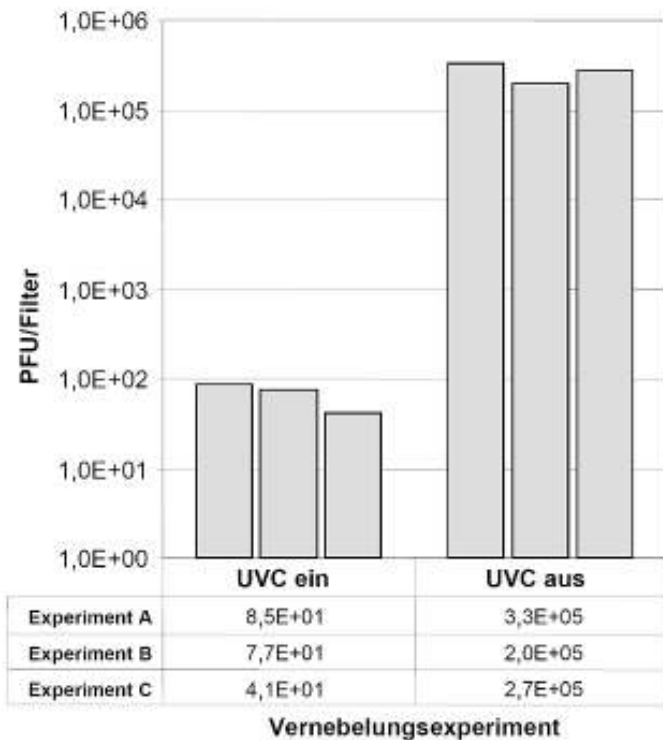


Bild 6. Reduktion des Felinen Calicivirus (FCV) mit UVC-Strahlung in einer RLT-Anlage (Steritube, Fa. Virobuster).

fen 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 $5 \cdot 10^7$ 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 Filterrückstände 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.; Adegbonrin, 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.