

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit von
UV-C-basierten Luftreinigern mithilfe molekularer Techniken**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Finja Rausch
aus Potsdam

Leipzig, 2023

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Uwe Rösler, Institut für Tier- und Umwelthygiene, Fachbereich
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 06.06.2023

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	II
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Bioaerosole	3
2.2 Arten der Luftdesinfektion.....	3
2.2.1 Mechanische Filter.....	3
2.2.2 UV-C-Strahlung	5
2.2.3 Ionisator.....	6
2.2.4 Elektrofilter	8
2.3 Aerogen übertragbare Viren	10
2.4 Luftdesinfektion in der Tierhaltung	11
2.5 Methoden zur Bestimmung der Virusinfektiosität	13
2.5.1 Virusanzucht auf Zellkulturen	14
2.5.2 Ethidiummonoazid-Bromid.....	15
2.5.3 Propidiummonoazid	16
2.5.4 Nukleasen	16
2.5.4.1 Benzon-Endonuklease	16
2.5.4.2 Ribonukleasen	17
2.6 Molekulare Nachweismethoden für Nukleinsäuren	18
2.6.1 Polymerasekettenreaktion	18
2.6.2 Rekombinase-basierte Amplifikation.....	19
3 Veröffentlichung.....	21
3.1 Eigenanteil	21
3.2 Publikation	21
4 Diskussion	37
5 Zusammenfassung.....	43
6 Summary.....	45
7 Literaturverzeichnis.....	47

Abkürzungsverzeichnis

Benzonase	Benzon-Endonuklease
bp	Base pair (Basenpaar)
COVID-19	Coronavirus disease 2019
CPE	Cytopathogenic effect (Zytopathogener Effekt)
Ct	Cycle threshold
CRFK	Crandell-Reese Feline Kidney
DIN	Deutsches Institut für Normung
dsRNA	Double-stranded ribonucleic acid (doppelsträngige Ribonukleinsäure)
EN	Europäische Norm
EMA	Ethidiummonoazid-Bromid
EU	Europäische Union
FCoV	Felines Coronavirus
HCl	Salzsäure
HPAIV	Hochpathogene aviäre Influenzaviren
IEC	International Electrotechnical Commission (Internationale Elektrotechnische Kommission)
ISO	International Organization for Standardization (Internationale Organisation für Normung)
J	Joule
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
m ²	Quadratmeter
Mg ²⁺	Magnesium(II)-Ion
min	Minute
Mio	Million
mM	Millimol
Mn ²⁺	Mangan(II)-Ion
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
nm	Nanometer
Pa	Pascal

Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PM	Particulate Matter (Feinstaub)
PMA	Propidiummonoazid
PEDV	Porcine epidemic diarrhea virus
PRRSV	Porcine reproductive and respiratory syndrome virus
RAA	Recombinase-aided amplification (Rekombinase-basierte Amplifikation)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SARS-CoV	Severe acute respiratory syndrome coronavirus
ssRNA	Single-stranded ribonucleic acid (einzelsträngige Ribonukleinsäure)
TCID ₅₀	50% tissue culture infectious dose
TS	Technische Spezifikation
tt	Time threshold
U	Unit
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
VO	Verordnung
VOC	Volatile organic compound (Flüchtige organische Verbindung)
W	Watt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Ablauf einer Prüfung gemäß DIN EN ISO 16980.	4
Abbildung 2. Struktur eines Hydratclusters.	7
Abbildung 3. Schema eines einstufigen Elektrofilters.....	9
Abbildung 4. Schema eines zweistufigen Elektrofilters.	9
Abbildung 5. Methodenvergleich zwischen PCR und RAA.....	20

Einleitung

Ende 2019 trat erstmals ein neuartiges respiratorisches Virus auf, das inzwischen unter dem Namen Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) bekannt ist, und löste eine Pandemie aus. Da das hochpathogene Virus durch Aerosole übertragen wird, sind präventive Schutzmaßnahmen wie das Tragen von Atemmasken und der Einsatz von Luftreinigern von zentraler Bedeutung.

Luftreiniger basieren häufig auf dem Prinzip der mechanischen Filterung. Je nach Wirksamkeit wird dabei zwischen Staub- und Schwebstofffiltern unterschieden. Schwebstofffilter wie der High Efficient Particulate Air (HEPA) Filter finden im medizinischen Bereich, in dem ein hohes Maß an Keimarmut erforderlich ist, oder auch in Heiz-, Lüftungs- und Klimaanlage der Luftfahrt Anwendung. Eine weitere Möglichkeit der Luftreinigung ist der Einsatz von ultravioletter (UV) Strahlung und hier vor allem von UV-C, das Mikroorganismen inaktiviert, indem es deren Nukleinsäuren schädigt. Angewandt werden UV-C-Einheiten sowohl in Form von Einzelgeräten, die im oberen Bereich des Raumes angebracht werden, als auch in Kombination mit mechanischen Filtern.

Bevor Luftreiniger auf den Markt gebracht werden, müssen sie nach bestimmten Standards auf ihre Wirksamkeit geprüft werden. Mobile Luftreiniger müssen in der Lage sein, die Viruslast in der Luft der Aufenthaltszone um 90% innerhalb einer halben Stunde zu reduzieren. Die Wirksamkeitstestung der Luftreiniger erfolgt zunächst unter Laborbedingungen. In einer Testkammer werden infektiöse Viruspartikel vernebelt. Vor und hinter dem zu testenden Gerät werden Luftproben gesammelt, welche anschließend mithilfe eines Zellkultursystems auf ihre Infektiosität untersucht werden. Diese Quantifizierung des Virustiters beansprucht jedoch mehrere Tage und erfordert ein gut ausgestattetes Labor mit hohen Sterilitätsanforderungen.

Molekulare Nachweismethoden wie die Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Rekombinase-basierte Amplifikation (RAA) sind hingegen schnell, spezifisch und sensitiv. Ihr Nachteil liegt darin, dass sie sowohl die Nukleinsäuren infektiöser als auch geschädigter, inaktiver Mikroorganismen nachweisen. Der selektive Nachweis infektiöser Mikroorganismen mithilfe einer molekularen Methode wie der RAA würde die Arbeit im Labor beschleunigen und könnte den Infektiositätsnachweis mittels Zellkultur ersetzen.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Protokolls, das auf molekularen Nachweismethoden basiert und in der Lage ist, zwischen infektiösen und nicht-infektiösen

Viruspartikeln zu unterscheiden. Dies wurde erreicht, indem die freien Nucleinsäuren von geschädigten Viruspartikeln vor dem Extraktionsschritt beseitigt wurden. Dafür wurden zwei verschiedene Techniken miteinander verglichen: der Farbstoff Propidiummonoazid (PMA) und Nucleasen wie die Benzonase und RNasen.

Das Protokoll wurde zur Wirksamkeitsprüfung zweier UV-C-Luftreiniger verwendet und mit dem Infektiositätstest basierend auf der Berechnung der 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) verglichen. Das Feline Coronavirus (FCoV) wurde hierbei als Modellvirus für SARS-CoV-2 genutzt.

Literaturübersicht

1.1 Bioaerosole

Luft ist ein Gasgemisch, das zudem viele Fremdstoffe beinhaltet. Die Ursache dafür kann natürlich sein, z.B. durch Winderosion, oder künstlich hervorgerufen, z.B. durch Autoabgase. Die in der Luft schwebenden Partikel wie Ruß, Lehm und Pflanzenfasern werden Aerosole genannt (ANON. 2002). Den Partikeln können Pilze, Bakterien, Viren und/oder Pollen sowie deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte anhaften oder sie können aus diesen bestehen (ANON. 2019a). In diesem Falle sind die luftgetragenen Teilchen biologischer Herkunft und es wird von Bioaerosolen gesprochen (ANON. 2019b). Durch das Einatmen von Bioaerosolen können Krankheiten verursacht werden, da pathogene Erreger wie Influenza-A-Viren oder SARS-CoV-2 anhaften können (GUZMAN 2021). Um vor der Aufnahme von Bioaerosolen zu schützen, kann deren Konzentration in der Luft durch verschiedene Methoden der Luftdesinfektion reduziert werden (VASILYAK 2021).

1.2 Arten der Luftdesinfektion

1.2.1 Mechanische Filter

Das Prinzip mechanischer Filter beruht auf der Partikelabscheidung im Filtermaterial, welche durch die Mechanismen Trägheit, Diffusion, Sperreffekt, Elektrostatik und Gravitation verursacht wird. Durch die Trägheit werden Partikel, die sich im Luftstrom befinden, bei Strömungsänderung aufgehalten. Sie ist eng mit der Partikelgröße und -dichte verbunden. Je größer und dichter die Partikel sind, desto größer ist ihre Trägheit. Bei der Diffusion bewegen sich die Partikel durch die Brownsche Molekularbewegung ungerichtet und kommen so zufällig in Kontakt mit dem Filter. Je kleiner die Partikel, desto stärker ist die Zufallsbewegung. Beim Sperreffekt folgt das Partikel zwar der Stromlinie um die Filterfaser, jedoch bleibt es aufgrund der geometrischen Ausdehnung trotzdem am Filter haften (LIU et al. 2017). Eine untergeordnete Rolle spielen die Gravitation und die Elektrostatik, bei der sich die Filterfasern und die Partikel gegenseitig anziehen, solange sie eine entgegengesetzte Ladung besitzen (WENKE 2019).

Die Klassifizierung und Prüfung von Luftfiltern richten sich nach verschiedenen europäisch anerkannten Standards. Grundsätzlich werden Staub- und Schwebstofffilter unterschieden (WENKE 2019).

Staubfilter werden nach DIN EN ISO 16890 in Grob- und Feinstaubfilter unterteilt (ANON. 2017b). Grobstaubfilter zählen zur Klasse „ISO Coarse“ (ANON. 2017b) und dienen als Vorfilter für Partikel, die größer als 10 µm sind (ANON. 2002). Beispielsweise werden sie in Klimageräten in Fenstern eingesetzt (ANON. 2002). Feinstaubfilter werden in „ISO ePM₁“, „ISO ePM_{2,5}“ und „ISO ePM₁₀“ klassifiziert. Die Namen der Klassen geben bereits Hinweis auf die Partikelspektren, die abgeschieden werden, nämlich ≤10 µm, ≤2,5 µm und ≤1 µm. Anforderung für diese Klassifikation ist, dass die Abscheideeffizienz für den jeweiligen Partikeldurchmesser mindestens 50% beträgt (ANON. 2017b). Anwendung finden Feinstaubfilter unter anderem in Zuluft- und Teilklimaanlagen für Schulen, Küchen oder Archiven (ANON. 2002). Die Prüfung von Staubfiltern erfolgt nach einem in der ISO-Norm definiertem Ablauf (Abbildung 1).

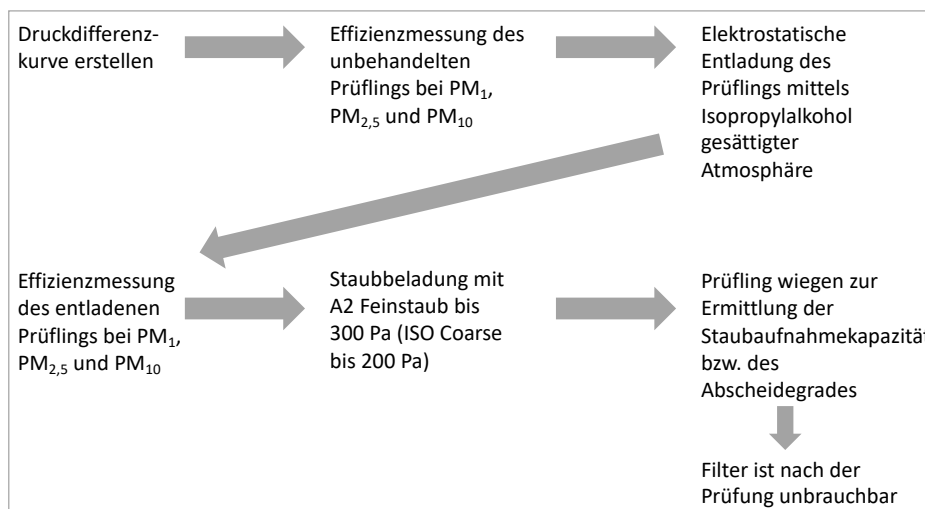


Abbildung 1. Ablauf einer Prüfung gemäß DIN EN ISO 16980. Der Effizienzgrad wird aus dem Mittelwert vom Wirkungsgrad des entladenen und des unbehandelten Filters ermittelt. Die Staubbehandlung dient der gravimetrischen Bestimmung des Wirkungsgrades. Abbildung modifiziert nach ANON. (2002).

Schwebstofffilter werden nach der DIN EN 1822 in die drei Gruppen Efficient Particulate Air (EPA) Filter (Hochleistungspartikelfilter) mit den Filterklassen E10 bis E12, High Efficient Particulate Air (HEPA) Filter (Schwebstofffilter) mit den Filterklassen H13 und H14 und Ultra Low Penetration Air (ULPA) Filter (Hochleistungsschwebstofffilter) mit den Filterklassen U15 bis U17 eingeteilt (ANON. 2019c). Seit 2011 existiert parallel zur DIN EN 1822 die

DIN EN ISO 29463, welche die Einteilung in EPA-, HEPA- und ULPA-Filter beibehält, jedoch 13 Filterklassen anstatt acht unterscheidet (ANON. 2017c). Schwebstofffilter sind in der Lage, kleinste Partikel $<1 \mu\text{m}$ aus der Luft zu entfernen, und werden daher zum Beispiel in Laboratorien oder sterilen OP-Sälen eingesetzt (ANON. 2002). Die Prüfung von Schwebstofffiltern erfolgt in drei Schritten. Zuerst wird die Partikelgröße mit dem größten Durchlassgrad bestimmt (most penetrating particle size, MPPS). Anschließend folgt eine Leckageprüfung und zuletzt wird der Abscheidegrad bestimmt (ANON. 2017c, ANON. 2019c). Werden mechanische Filter in mobilen Luftreinigungsgeräten eingesetzt, wird die Reinigungsleistung des Geräts gegenüber Viren auf Grundlage der VDI-EE 4300 geprüft (ANON. 2021b). Hier bezieht sich die Prüfung auf das gesamte System und nicht nur auf einzelne Komponenten wie zum Beispiel den Filter, da mobile Luftreiniger auch Kombinationen verschiedener Reinigungsmechanismen beinhalten können (z.B. Kombination aus einem mechanischen Filter und einer UV-C-Strahlungseinheit).

1.2.2 UV-C-Strahlung

UV-Strahlung ist für den Menschen nicht sichtbares Licht im Wellenlängenbereich von 100 nm bis 400 nm. Es wird in die drei Spektralbereiche UV-A (315 nm bis 400 nm), UV-B (280 nm bis 315 nm) und UV-C (100 nm bis 280 nm) eingeteilt.

UV-Strahlen werden von sogenannten Chromophoren absorbiert, wozu unter anderem die Purin- und Pyrimidinbasen der DNA und RNA gehören (ANON. 2013). Dies hat eine Dimerisierung der Basen zur Folge. Die Photodimere behindern Transkriptionsprozesse und somit auch die Replikation in Zellen und Organismen, wodurch diese absterben (GREEN and SCARPINO 2001, MULLENDERS 2018).

Der Wellenlängenbereich der UV-C-Strahlung ist am wirksamsten, um Keime zu inaktivieren. Als Strahlenquelle dient häufig eine Niederdruck-Quecksilberlampe, welche Licht einer Wellenlänge von 253,7 nm abgibt. Diese Wellenlänge hat die größte keimschädigende Wirkung (GREEN and SCARPINO 2001). Neben der Wellenlänge hängt die Inaktivierung auch von der Strahlendosis (J/m^2) ab (Bunsen-Roscoe-Gesetz), welche das Produkt aus Intensität (W/m^2) und Expositionsdauer (s) ist (REED 2010). Wenn die Viren sich von der Strahlungsquelle entfernen, also die Intensität abnimmt, kann die benötigte Dosis durch Verlängerung der Expositionsdauer erreicht werden (CUTLER and ZIMMERMAN 2011).

UV-C-Strahlung wurde bereits im 20. Jahrhundert zur Desinfektion von Wasser in der Pharma-, Lebensmittel- und Getränkeindustrie verwendet (COTTON et al. 2001). Studien in den 1930er-Jahren zeigten, dass die keiminaktivierende Wirkung der UV-C-Strahlen auch in der Luft angewendet werden kann (REED 2010). Ein Raum kann auf verschiedene Wege mittels UV-C-Strahlung desinfiziert werden. Zum einen kann der gesamte Raum bestrahlt werden, was jedoch einen leer stehenden Raum oder das Tragen von Schutzkleidung erforderlich macht (REED 2010). Um diese Bedingungen zu umgehen, hat sich die Bestrahlung der Luft im oberen Raum etabliert, bei der das Gerät zum Schutz vor menschlicher Exposition von unten abgeschirmt ist. Die effektive Luftdesinfektion hängt bei dieser Form von einer guten vertikalen Luftbewegung zwischen dem oberen und unteren Raum ab (GREEN and SCARPINO 2001). Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, die Luft auf ihrem Weg durch die Heiz-, Lüftungs- und Klimaanlage zu bestrahlen und anschließend zurück in den Raum zu leiten (REED 2010). Außerdem gibt es kommerzielle, in sich geschlossene Einheiten, die mit Staubfiltern, UV-Lampen und einem Ventilator für die Luftzirkulation ausgestattet sind (GREEN and SCARPINO 2001).

Aufgrund der COVID-19-Pandemie hat der DIN-Normenausschuss Lichttechnik Ende 2021 eine technische Spezifikation zur Konzeption, Prüfung und Anwendung von UV-C-Luftentkeimern ausgearbeitet. Neben der Wirksamkeit der Inaktivierung von Bakterien und Viren behandelt diese DIN/TS 67506 auch die Sicherheit und den Schutz vor UV-Strahlung (DIN-NORMENAUSSCHUSS LICHTTECHNIK 2021).

1.2.3 Ionisator

Ionisierung bedeutet, dass ein elektrisch neutrales Molekül oder Atom eine negative oder positive Ladung erhält. Wenn ein Atom mindestens die Ionisierungsenergie absorbiert, entsteht sowohl ein freies Elektron als auch ein positives Ion (DANIELS 2002).

Die positiven Ionen bilden durch Interaktion mit in der Luft befindlichen Wassermolekülen sogenannte Hydratcluster (Abbildung 2). Die freien Elektronen werden von Sauerstoff aufgenommen, wodurch hochreaktive Superoxid-Radikalanionen entstehen (CHARRY and KAVET 1987, DANIELS 2002).

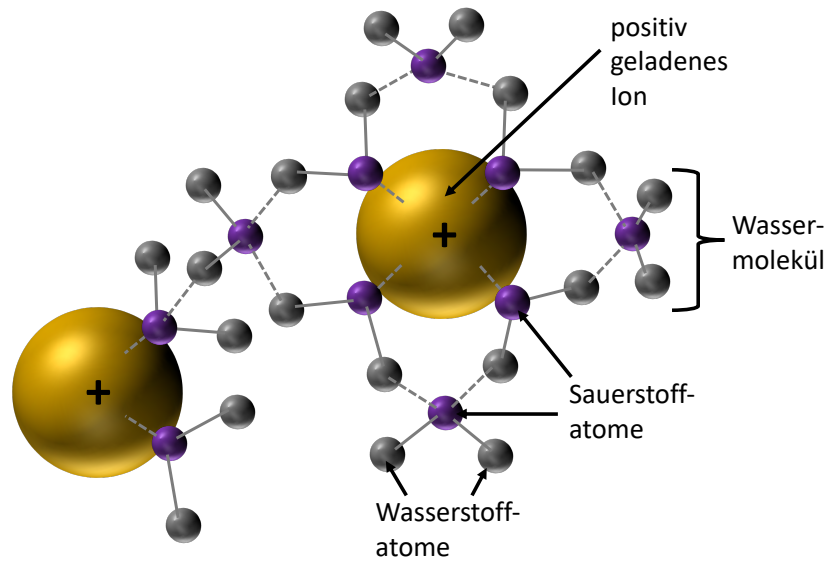


Abbildung 2. Struktur eines Hydratclusters. Die positiv geladenen Ionen (gelb) ziehen die freien Elektronenpaare des Sauerstoffatoms (lila) des Wassermoleküls elektrostatisch an. Abbildung modifiziert nach EGENOLF-JONKMANN (2015).

Luftionisatoren bilden lokale Ionen-Cluster, welche sich sowohl an Staubpartikel anlagern als auch mit flüchtigen organischen Verbindungen (VOC, volatile organic compounds) reagieren und diese zerstören (DANIELS 2002). Die Entfernung der Partikel aus der Luft basiert auf zwei Mechanismen. Zum einen wird der Aggregationsprozess verstärkt, d.h. dass neutrale Partikel zunehmend von geladenen Partikeln angezogen werden und so größere Partikel bilden, die sich schneller absetzen. Außerdem haben geladene Teilchen eine größere Mobilität und lagern sich dadurch schneller auf Oberflächen ab (PUSHPAWELA et al. 2017).

Luftionisatoren können auf drei verschiedenen Prinzipien basieren, der Photonionisierung, nuklearen Ionisierung und elektronischen Ionisierung.

Bei ersterem werden durch eine niederenergetische Röntgenstrahlenquelle Elektronen aus Gasmolekülen gelöst.

Nukleare Ionisatoren nutzen die Teilchenstrahlung des Radionuklid Polonium-210, welches Alpha-Strahlung emittiert. Beim Zusammenstoß mit Gasmolekülen übertragen diese Elektronen auf die Alphateilchen (DANIELS 2002).

Bei der elektrischen Ionisierung wird ein elektrisches Feld an spitze Elektroden oder flache Drähte angelegt. Die Ionen werden unter Hochspannung durch Koronaentladung und Feldemission erzeugt.

Ob bipolare oder unipolare Ionen generiert werden, hängt von der Art des Stroms ab. Gleichstrom führt zur Erzeugung unipolarer Ionen, während bipolare Ionisatoren mit Wechselstrom versorgt werden (LA et al. 2019).

Ein Nachteil von Ionisatoren ist die potenzielle Entstehung von Nebenprodukten wie Ozon, welches aufgrund der Reizung der Atemwege eine gesundheitsschädliche Wirkung besitzt. Neben einer verringerten Lungenfunktion kann es zu Atemwegssymptomen wie Husten, Atembeschwerden und Engegefühl in der Brust sowie zu verstärkten Entzündungen der Atemwege kommen (ZHANG and JENKINS 2017).

Weiterhin sind die Prüfverfahren und Verfahrensweisen zur Bewertung von Luftionisatoren in der IEC 61340-4-7 festgehalten. Es wird dabei Bezug auf alle drei Ionisierungsmechanismen genommen (ANON. 2017a). Wenn ein Ionisator in einem mobilen Luftreiniger verbaut wird, unterliegt die Prüfung des Geräts der VDI-EE 4300 (ANON. 2021b).

1.2.4 Elektrofilter

Elektrofilter basieren, ähnlich wie die Luftionisatoren, auf dem Prinzip der Aufladung von Partikeln. Dies kann entweder natürlich durch Reibung mit Luft oder künstlich durch einen Ionisator erfolgen (VASILYAK 2021). Die Ionisierung ist somit der zugrundeliegende Mechanismus. Ein Unterschied ist, dass das elektrische Feld zwischen einer emittierenden Drahtelektrode und einer sogenannten Abscheideelektrode angelegt wird. Die Abscheideelektroden sind häufig in Form von parallel zur Strömung gruppierten Metallplatten angeordnet. Die aufgeladenen Partikel wandern zu diesen Sammelplatten und geben ihre Ladungen ab (VASILYAK 2021). Für Luftreiniger werden in der Regel positiv geladene Drahtelektroden und negativ geladene Abscheideelektroden genutzt, da eine umgekehrte Ladung der Elektroden eine höhere Ozonproduktion zur Folge hat (AFSHARI et al. 2020). Nach einiger Zeit sollten die Sammelplatten vom Staub gereinigt werden, entweder durch Klopfschläge (MIZUNO 2000) oder durch Waschen der Sammelplatte mit Hochdruckwasser (LEGG 2017).

Elektrofilter können in einstufige und zweistufige Elektrofilter klassifiziert werden. Einstufig bedeutet, dass für die Aufladung als auch für die Abscheidung der gleiche Elektrodenansatz verwendet wird (Abbildung 3).

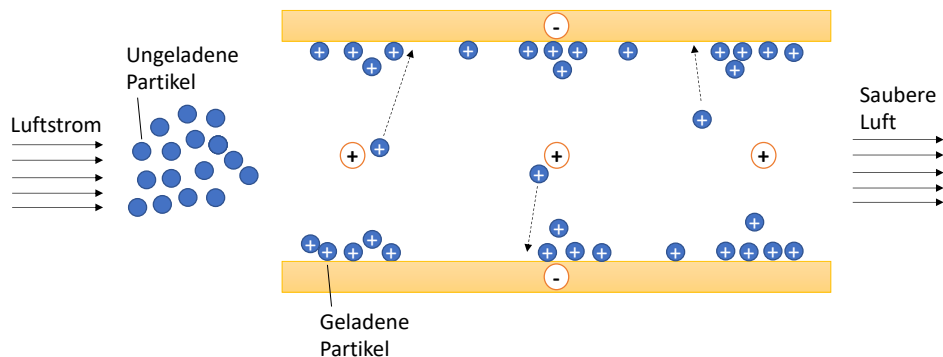


Abbildung 3. Schema eines einstufigen Elektrofilters. Die ungeladenen Partikel werden in einem elektrischen Feld positiv aufgeladen und lagern sich an der Niederschlagselektrode des gleichen elektrischen Feldes ab. Abbildung modifiziert nach AFSHARI et al. (2020).

Bei zweistufigen Elektrofiltern erfolgt die Aufladung und Abscheidung durch unterschiedliche Elektrodenansätze (Abbildung 4). Die Partikel werden in einer ersten Kaskade zwischen kleinen, positiv geladenen Drähten und entgegengesetzt geladenen Platten aufgeladen und anschließend in einer zweiten Kaskade von den Sammelplatten aufgefangen (AFSHARI et al. 2020).

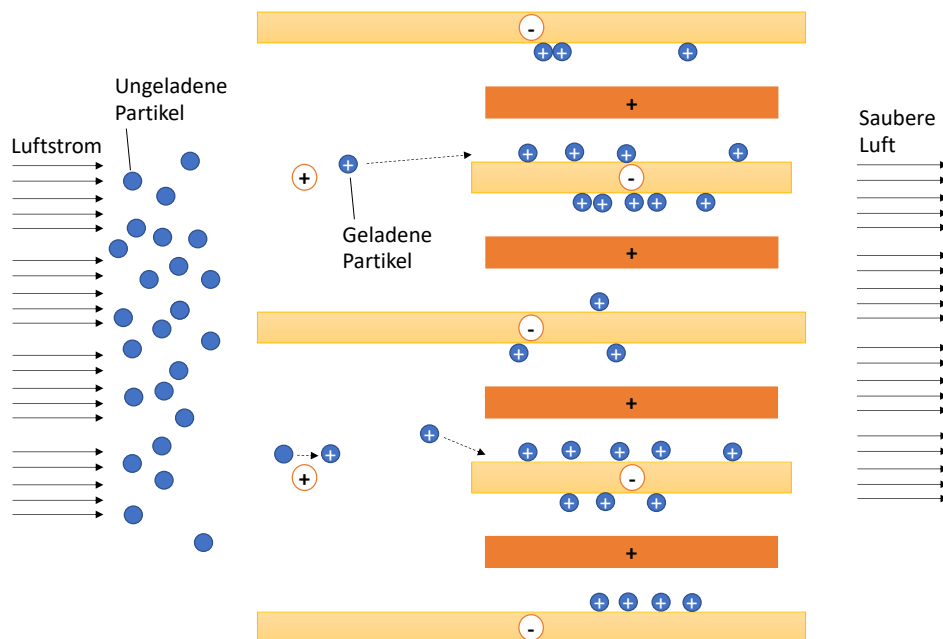


Abbildung 4. Schema eines zweistufigen Elektrofilters. Die ungeladenen Partikel werden in einem elektrischen Feld aufgeladen. Die Abscheidung erfolgt an nachfolgenden Kollektorplatten. Abbildung modifiziert nach AFSHARI et al. (2020).

Um Raumluft zu reinigen, werden in der Regel zweistufige Elektrofilter verwendet, da diese aufgrund der größeren Sammelfläche effizienter sind (MIZUNO 2000, VASILYAK 2021).

Elektrofilter können sowohl als in sich geschlossene Einheiten als auch als Bestandteil eines Kanals einer Heiz-, Lüftungs- und Klimaanlage erworben werden. Häufig sind sie Teil von tragbaren Luftreinigern, die in Innenräumen von Wohnungen und Bürogebäuden angewandt werden. Als Bestandteil der Heiz-, Lüftungs- und Klimaanlage werden sie auch in Fahrzeugen wie Bussen, Autos oder Schienenfahrzeugen verwendet (AFSHARI et al. 2020).

Auch die Prüfung von Elektrofiltern basiert auf der Prüfung mobiler Luftreiniger nach VDI-EE 4300 (ANON. 2021b). Elektrofilter speziell für die Prozessluft- und Raumluftreinigung werden in der VDI 3678 Blatt 2 behandelt (ANON. 2012).

1.3 Aerogen übertragbare Viren

Die Übertragung von Viren in der Luft bekam erstmals Bedeutung in den 1930er-Jahren, als der Wissenschaftler William F. Wells die aerogene Übertragung der Masern nachwies (COUCH 1981). Heutzutage ist dieser Übertragungsweg für viele Viren bekannt. Aufgrund ihrer im Vergleich zu anderen biologischen Partikeln kleinen Größe haben Viren das Potential, große Entfernungen auf dem Luftweg zurückzulegen (DEE et al. 2009, NÚÑEZ et al. 2016).

Die große Bedeutung der aerogenen Übertragung ist in den letzten Jahren durch Epidemien, wie zum Beispiel durch das Influenza-A-Virus verursacht, verdeutlicht worden. Influenza-A-Viren gehören zur Familie *Orthomyxoviridae* und sind behüllte Einzelstrang-RNA-Viren, die u.a. bei Menschen, Schweinen, Pferden und Wildvögeln vorkommen. Aufgrund der Variation der antigenen Strukturen Hämagglutinin (H) und Neuraminidase (N) lassen sich verschiedene Subtypen unterscheiden. Der Subtyp H1N1 war beispielsweise 1918 Ursache für die Spanische Grippe (CHEUNG and POON 2007). Bei der Familie *Coronaviridae* handelt es sich ebenfalls um behüllte, einzelsträngige RNA-Viren, die mit einer Genomgröße von 30 kb zu den bisher größten, identifizierten RNA-Viren zählen (DE GROOT et al. 2011).

Anfang des 21. Jahrhunderts wurde ein bisher unbekannter Vertreter der *Coronaviridae* entdeckt, der durch aerogene Übertragung eine Epidemie in der menschlichen Bevölkerung auslöste. Das sogenannte Severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 (SARS-CoV-1) führt zu respiratorischen Symptomen, die eine Pneumonie zur Folge haben können. Die genaue Herkunft des Virus ist bis heute nicht abschließend geklärt, jedoch gibt es Hinweise,

dass das Virus von Fledermäusen auf Zibetkatzen und Marderhunde übertragen wurde. Von diesen exotischen Tiere infizierten sich Menschen, die das Virus vor allem aerogen weiterübertragen haben (DE GROOT et al. 2011). Taxonomisch gehört das Virus zur Gattung *Betacoronavirus* der Subfamilie *Orthocoronavirinae* (HASÖKSÜZ et al. 2020).

Ein weiterer Vertreter dieser Gattung ist das Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), welches erstmals Ende 2019 auftrat und 2020 eine Pandemie ausgelöst hat. Die Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt ebenfalls hauptsächlich aerogen als Tröpfcheninfektion (HASÖKSÜZ et al. 2020). Das Virus ist Erreger der respiratorischen Erkrankung „Coronavirus disease 2019“ (COVID-19), die in Abhängigkeit von der Virusvariante mit eher unspezifischen Symptomen wie Fieber, Husten und Kopfschmerzen einhergeht und ebenfalls eine Pneumonie hervorrufen kann (HASÖKSÜZ et al. 2020). Schwere Verläufe können zum Tod führen. Weltweit sind bereits mehr als 6,5 Mio. Menschen an der Krankheit gestorben (ANON. 2022). Als natürliches Reservoir des Virus werden Fledermäuse diskutiert. Die Übertragung von Viren über die Luft stellt auch eine Herausforderung für die Nutztierhaltung dar, da aerogen übertragbare Viren wie das Maul-und-Klauenseuchen-Virus, das Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), das Influenza-A-Virus oder das Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) zu großen wirtschaftlichen Verlusten führen können (NÚÑEZ et al. 2016). Daher kann die Luftfiltration auch hier eine wichtige Präventionsmaßnahme darstellen, um die Aerosolbelastung in der Luft zu reduzieren.

1.4 Luftdesinfektion in der Tierhaltung

In den vergangenen Jahren wurde nachgewiesen, dass diverse pathogene Erreger bei Schweinen, wie beispielsweise das PRRSV, über große Entfernungen auf dem Luftweg transportiert werden können und so in einen Bestand neu eingetragen werden können (DEE et al. 2009, PITKIN et al. 2009). Trotz existierender Biosicherheitsprogramme kann die Übertragung per Luft nicht verhindert werden, weshalb Luftfiltersysteme vor allem in Nordamerika zunehmend Anwendung finden (DESROSIERS 2011).

Auch beim Geflügel können beispielsweise hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) über die Luft übertragen werden und so zu großen wirtschaftlichen Schäden führen. Auch wenn derzeit eine Übertragung über weite Entfernungen zwischen den Geflügelbeständen nicht direkt nachgewiesen worden sind, setzen einige Eierproduzenten auf Luftfiltersysteme (ZHAO

et al. 2018). Eine nachträgliche Modellierung der Flugbahnen und Viruskonzentrationen im Falle des HPAI-Ausbruchs 2015 in den USA lässt darauf schließen, dass das Risiko einer Übertragung aviärer Influenzaviren über die Luft durch Zuluftfiltersysteme erheblich verringert werden könnte (ZHAO et al. 2019).

Für Schweinebestände konnten Langzeitstudien die Effektivität von Zuluftfiltersystemen als Schutz vor Erregereinträgen wie PRRSV beweisen (SPRONK et al. 2010, ALONSO et al. 2013). Neben Zuluftfiltersystemen gibt es auch Umluftfiltersysteme, die im Alltag zum Beispiel Anwendung in Klimaanlage von Autos finden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass durch Umluftfiltration der Staubgehalt in der Luft von Schweinebeständen effektiv reduziert wurde (ANTHONY et al. 2015). Da Staub sowohl irritierend auf die Schleimhäute des Respirationstrakts als auch als Träger von Pathogenen dient, führt die Filtration zu einer verbesserten Tiergesundheit (LAU et al. 1996).

Sowohl bei den Zuluft- als auch bei den Umluftfiltersystemen in Schweinebetrieben wurde auf mechanische Filter als auch Elektrofilter zurückgegriffen (LAU et al. 1996, ALONSO et al. 2013). LAU et al. (1996) konnte zeigen, dass der Elektrofilter besser die Bakterienlast in der Luft reduziert und auch kosteneffektiver gegenüber dem mechanischen Filter ist. Auch wenn der mechanische Filter geringere Anschaffungskosten besitzt, muss dieser regelmäßig gewechselt werden. Dennoch sollten weitere Tests durchgeführt werden, um das Kosten-Nutzungsverhältnis korrekt zu bestimmen (LAU et al. 1996). Eine aktuellere Studie von WENKE et al. (2018) demonstrierte, dass mechanische Luftfiltersysteme als Zuluft- als auch Umluftfiltrationstechnik problemlos in bestehende Belüftungssysteme integriert werden können. Die Umluftfiltration führte zu der niedrigsten Gesamtstaubkonzentration und einer Verbesserung der Lungengesundheit der in diesem Stall gehaltenen Tiere. Jedoch konnte keine signifikante Reduktion des Keimgehaltes der Stallluft erreicht werden (WENKE et al. 2018).

In Geflügelbeständen liegt generell ein hoher Feinstaubgehalt aufgrund einer Belastung durch Federn, Futtermitteln und Trockenkotpartikeln vor. Die Partikel würden sich beim Einsatz von Schwebstofffiltern wie HEPA- oder ULPA-Filtern schnell auf diesen absetzen. Dadurch wird die Belüftung des Stalls reduziert und ein häufigeres Wechseln der Filter notwendig, wodurch sich die Investitionskosten zusätzlich erhöhen (ZHAO et al. 2018). Eine kostengünstigere Variante ist der Einsatz von Luftionisatoren, welche in einem Hähnchenmastbetrieb die Staubkonzentration um durchschnittlich 43% reduzieren konnte (RITZ et al. 2006). Eine weitere Möglichkeit besteht in der Kombination aus einem Feinstaubfilter mit einem

Luftionisator. Die größeren Poren des Filters führen nicht so schnell zu einer Verstopfung des Filtermaterials und die geringere Effizienz kann mit dem Luftionisator ausgeglichen werden (ZHAO et al. 2018).

Der Einsatz von UV-C-Einheiten in der Tierhaltung wurde bisher nur wenig untersucht. Ein Luftwäscher mit kombinierter UV-Einheit wurde in einem Schweinemastbetrieb getestet (SCHULZ et al. 2013). Dieser Prototyp führte zu einer signifikanten Reduktion der Konzentrationen mesophiler Gesamtkeimzahlen, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* und mesophiler aerotoleranter grampositiver Kokken. Von Nachteil war, dass bei dem Gerät ein relativ hoher Wasserverbrauch vorhanden war und dass die Leistung der UV-Strahlung durch Staubablagerung reduziert wurde, was eine regelmäßige Reinigung von Nöten macht (SCHULZ et al. 2013).

Die Keiminaktivierung durch UV-C-Licht wurde ebenfalls in einer späteren Studie zuerst im Labor und danach in einem Versuchstierstall untersucht (EISENLÖFFEL et al. 2019). Die Wirksamkeit einer UV-C-Einheit wurde in Laborversuchen an *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Porzinem Parvovirus und PRRSV getestet. Eine Reduktion dieser Erreger um mehr als 99% bis 100% wurde erreicht. Bei der Anwendung der UV-C-Leuchte im Schweinestall wurde ebenfalls eine Reduktion der Bakterien beobachtet, die durchschnittliche Abscheideeffizienz lag bei 31,6% bis 61,0% (EISENLÖFFEL et al. 2019).

1.5 Methoden zur Bestimmung der Virusinfektiosität

Die Standardmethode, um die Infektiosität von Viren festzustellen, stellt die Virusanzucht auf Zellkulturen dar, welche jedoch ein gut ausgestattetes Labor und geschultes Personal erfordert und zeitaufwendig ist (LELAND and GINOCCHIO 2007).

Molekulare Nachweismethoden für Nukleinsäuren sind zwar sehr sensitiv, können jedoch nicht zwischen den Nukleinsäuren lebensfähiger und toter Mikroorganismen unterscheiden. In den letzten Jahren wurden verschiedene Alternativen zur Zellkultur untersucht, um eine Lebend-Tot-Differenzierung durchzuführen.

Unter anderem wurde die Lebensfähigkeit durch eine reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) zum Nachweis von messenger-Ribonukleinsäure (mRNA) als Indikator für die Lebensfähigkeit getestet (KLEIN and JUNEJA 1997). Diese Methode ist jedoch unsicher, da das Vorhandensein von mRNA in toten Zellen von der Art der Inaktivierung abhängt (SHERIDAN et al. 1998).

Andere Methoden nutzen den Verlust der Membranintegrität toter Zellen. Dadurch können DNA-bindende Farbstoffe in diese eindringen. Dieses Prinzip wird in der Durchflusszytometrie und der mikroskopischen Lebend-Tot-Differenzierung angewandt. Ein dafür häufig genutzter Farbstoff ist Propidiumiodid (CARON et al. 1998, NEBE-VON-CARON et al. 2000). Da der Nachweisbereich enger ist als der von PCR-basierten Methoden, kann dieses Prinzip auch mit der PCR kombiniert werden. Als DNA-bindende Farbstoffe werden Ethidiummonoazid-Bromid (EMA) oder Propidiummonoazid (PMA) eingesetzt (RUDI et al. 2005, NOCKER et al. 2006).

Eine weitere Alternative ist die Behandlung der Proben vor der Nukleinsäureextraktion mit Endonukleasen wie RNasen oder der Benzon-Endonuklease (Benzonase), die freie Nukleinsäuren abbauen (NUANUALSUWAN and CLIVER 2002).

1.5.1 Virusanzucht auf Zellkulturen

Zellen lassen sich unter bestimmten Bedingungen *in vitro* anzüchten. Sie benötigen unter anderem ein Wachstumsmedium, welches mit weiteren Komponenten wie Glukose und Antibiotika angereichert wird. Außerdem findet die Anzucht in einem Inkubator statt, da die meisten Zellen eine Temperatur von 37 °C, einen Kohlenstoffdioxidgehalt von 5-10% und eine relative Luftfeuchtigkeit von 95% benötigen (JEDRZEJCZAK-SILICKA 2017).

Viele Viren lassen sich in solchen Zellkulturen vermehren, sofern sie infektiös sind und die verwendete Zelllinie empfänglich für das Virus ist. Verschiedene Zelllinien haben sich für die Virusisolierung etabliert, z.B. primary rhesus monkey kidney (RhMK)-Zellen, primary rabbit kidney-Zellen, Crandell-Reese Feline Kidney (CRFK)-Zellen oder humane Lungenfibroblasten (MRC-5) (HEMATIAN et al. 2016). Diese Zelllinien haften sich als Monolayer an den Boden des Kulturgefäßes an. Nach Inokulation einer virushaltigen Probe werden die Zellen täglich unter dem Mikroskop angeschaut. Veränderungen im Monolayer deuten auf die Präsenz von Viren hin, die den sogenannten zytopathogenen Effekt (CPE) verursachen (LELAND and GINOCCHIO 2007). Zum Beispiel werden CRFK-Zellen, die mit FCoV infiziert wurden, nach 4 bis 5 Tagen trüb, rund und bilden schließlich Synzytien (AMER et al. 2012). Speziell im frühen Stadium ist der CPE schwierig zu erkennen und erfordert daher Fachkompetenz (LELAND and GINOCCHIO 2007).

Um die Infektiosität der Viren zu messen, kann die TCID₅₀ bestimmt werden. Dies ist ein Endpunkt-Verdünnungstest, der die Konzentration mithilfe einer Berechnung basierend auf

der Spearman-Kaerber-Methode abschätzt, bei der 50% der Zellen infiziert sind (LELAND and GINOCCHIO 2007).

1.5.2 Ethidiummonoazid-Bromid

Ethidiumbromid ist ein Trypanozid, welches interkalierend an DNA bindet und so die Nukleinsäuresynthese inhibiert (WARING 1965, HIXON et al. 1975). Ein Azidderivat von Ethidiumbromid ist der Farbstoff Ethidiummonoazid-Bromid (EMA), der ein Komplex mit DNA bildet. Mithilfe von sichtbarem Licht wird es zu einem hochreaktiven Nitrenradikal photolysiert, welches zu einer kovalenten DNA-Bindung führt (HIXON et al. 1975). Das Absorptionsmaximum liegt bei 460 nm (NOCKER and CAMPER 2006). Der an die DNA gebundene Farbstoff führt zu einer Hemmung der DNA-Amplifikation in der PCR. Dieser biologische Effekt kann zur Differenzierung von lebensfähigen und toten Bakterien genutzt werden, da EMA nur in Bakterienzellen mit geschädigten Zellwänden und Zellmembranen eindringen kann (RUDI et al. 2005). Ungebundenes, freies EMA reagiert mit Wassermolekülen und bildet so ein Hydroxylamin (DETRAGLIA et al. 1978), welches nicht mehr kovalent an DNA binden kann (KELL et al. 1998). Wenn ein Gemisch aus lebensfähigen und toten Bakterien mit EMA und sichtbarem Licht inkubiert wird, anschließend die Nukleinsäuren extrahiert werden und dann eine PCR durchgeführt wird, sollte somit nur die DNA der lebensfähigen Bakterien amplifiziert werden. Durch die Inaktivierung des EMA zu einem Hydroxylamin, sollte die DNA der lebensfähigen Bakterien nicht nachträglich während der Nukleinsäureextraktion beeinträchtigt werden (NOCKER and CAMPER 2006).

Jedoch wurde herausgefunden, dass EMA Nachteile in Bezug auf die Lebend-Tot-Differenzierung besitzt (FLEKNA et al. 2007, CAWTHORN and WITTHUHN 2008, KOBAYASHI et al. 2009). Dafür gibt es bisher zwei mögliche Gründe. Zum einen wird vermutet, dass EMA bis zu einem gewissen Grad auch in lebensfähige Zellen mit intakten Zellmembranen und Zellwänden eindringen kann. Zum anderen könnte das für die Photolyse genutzte sichtbare Licht zu einer teilweisen Zellyse der lebensfähigen Zellen führen und diese somit für EMA empfänglich machen (NOCKER and CAMPER 2006).

Die Effizienz von EMA wurde auch an einzelsträngigen RNA-Viren, nämlich Aviären Influenzaviren, getestet (GRAIVER et al. 2010). Aufgrund einer vermutlich ineffizienten Bindung des EMA an RNA geschädigter Viruspartikel war die korrekte Unterscheidung nicht erfolgreich (GRAIVER et al. 2010).

1.5.3 Propidiummonoazid

Propidiummonoazid (PMA) ist strukturell identisch zu Propidiumiodid. Beide Moleküle können in Zellen mit geschädigten Zellmembranen eintreten und an die DNA durch Einlagerung zwischen die Basen binden (NOCKER et al. 2006). Der einzige Unterschied besteht darin, dass PMA eine zusätzliche Azidgruppe besitzt. Dadurch gehört es wie auch EMA zu den Azidderivaten und basiert auf demselben Prinzip wie EMA, d.h. durch Lichteinfluss wird die Azidgruppe in ein Nitrenradikal umgewandelt, welches kovalent an die DNA bindet (FITIPALDI et al. 2011). Diese Quervernetzung des Farbstoffs mit der DNA führt zur Hemmung der PCR-Amplifikation (NOCKER et al. 2007).

Der Vorteil gegenüber EMA ist, dass PMA nicht in lebensfähige Zellen eindringen kann, wodurch eine selektivere Lebend-Tot-Differenzierung stattfindet. Dies ist wahrscheinlich auf die höhere Ladung des PMA zurückzuführen. PMA besitzt zwei positive Ladungen, während EMA nur eine positive Ladung aufweist (NOCKER et al. 2006).

Für die Unterscheidung lebensfähiger und toter Bakterien wurde Propidiummonoazid bereits erfolgreich angewendet (BAE and WUERTZ 2009, NOCKER et al. 2009). Es wurde lediglich festgestellt, dass die Unterscheidung bei gramnegativen Bakterien selektiver im Gegensatz zu grampositiven Bakterien ist. Dies ist auf den unterschiedlichen Aufbau der Zellwände von grampositiven und gramnegativen Bakterien zurückzuführen (ELIZAQUÍVEL et al. 2014).

Der Gebrauch von PMA als Infektiositätsnachweis wurde auch an verschiedenen RNA-Viren erfolgreich getestet (PARSHIONIKAR et al. 2010).

1.5.4 Nukleasen

1.5.4.1 Benzon-Endonuklease

Die Benzon-Endonuklease (Benzonase) ist eine gentechnisch hergestellte Endonuklease, die im *Escherichia coli*-Stamm W₃₁₁₀ erzeugt wird. Dieser Stamm ist eine Mutante des Stamms K₁₂, der das Plasmid pNUC1 enthält. Dieses Plasmid kodiert für die Endonuklease, die normalerweise in *Serratia marescens* exprimiert wird (ZHU et al. 2013). Das Protein besteht aus 245 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 26,7 kDa.

Wenn die Nukleinsäuren von geschädigten Mikroorganismen frei vorliegen, kann das Enzym die Phosphodiesterbindung von sowohl einzel- als auch doppelsträngiger DNA und RNA

spalten (MILLER et al. 1994). Dadurch entstehen Oligonukleotide von ungefähr 3 bis 5 Basenpaaren (ZHU et al. 2013).

Die Benzonase gehört zu den Magnesium-abhängigen Enzymen, die Phosphodiesterbindungen spalten (MILLER et al. 1994). Für eine optimale Aktivität werden 1-2 mM Magnesium(II)-Ionen (Mg^{2+}) benötigt (ZHU et al. 2013). Ersetzt werden kann Mg^{2+} durch Mangan(II)-Ionen (Mn^{2+}), jedoch ist die maximale Aktivität reduziert. Die höchste Aktivität wurde mit Tris-HCl als Inkubationspuffer bestimmt. Der pH-Bereich, in dem das Enzym aktiv ist, streckt sich von pH 7 bis pH 10. Die maximale Aktivität erreicht es bei einem pH von 8,5 (NESTLE and ROBERTS 1969). Das Temperaturoptimum liegt bei 37 °C (ZHU et al. 2013). Die Enzymaktivität kann durch Guanidin-HCl ab einer Konzentration von 100 mM vollständig gehemmt werden. Eine EDTA-Konzentration von 1 mM inhibiert das Enzym teilweise, erst ab einer Konzentration von 5 mM wird ein mindestens 90%-iger Verlust der Enzymaktivität durch Komplexierung der Magnesium-Ionen erreicht (ZHU et al. 2013). Eine Unit (U) der Endonuklease wird ungefähr benötigt, um 37 µg DNA in 30 min unter Standardbedingungen abzubauen (ZHU et al. 2013).

Angewendet wird die Benzonase beispielsweise zur Aufreinigung von Proteinen, speziell auch in der Impfstoffproduktion (ZHU et al. 2013). Kürzlich wurde das Enzym das erste Mal eingesetzt, um ausschließlich Nukleinsäuren infektiöser Viren in der PCR nachzuweisen (ORISTO et al. 2018). Diesen Ansatz nutzten AMAR et al. (2021), um die Repräsentation lebender Mikroorganismen in Mikrobiomproben der menschlichen Haut zu verbessern, indem tote Bakterien und extrazelluläre DNA vor der Nukleinsäureextraktion und Sequenzierung mithilfe des Enzyms eliminiert wurden.

1.5.4.2 Ribonukleasen

Ribonukleasen (RNasen) gehören zu den Nukleasen und sind Enzyme, die die Spaltung von RNA katalysieren. Die Mehrheit dieser Enzymklasse spaltet hydrolytisch die Phosphodiesterbindung von RNA (MURCHISON 2013). Sie können in Exoribonukleasen, die terminale Nukleotide am 3'- oder 5'-Ende des RNA-Moleküls abspalten, als auch in Endoribonukleasen klassifiziert werden, die die Phosphodiesterbindung innerhalb der Polynukleotidkette spalten (MURCHISON 2013). Zu den Endoribonukleasen gehören viele der kommerziell erhältlichen RNasen (STRUHL 1989). Endoribonukleasen sind substratspezifisch. Es lassen sich sowohl RNasen mit Spezifität für einzelsträngige RNA (ssRNA) als auch RNasen

mit Spezifität für doppelsträngige RNA (dsRNA) unterscheiden. Zu den ssRNA-spezifischen RNasen gehören sowohl die RNase A als auch die RNase T1 (MURCHISON 2013).

Die RNase A, auch bekannt als Bovine Pankreas-Ribonuklease, spaltet RNA spezifisch am 3'-Ende von Pyrimidinresten (RICHARDS and WYCKOFF 1971). Die Hydrolyse erfolgt in zwei Schritten. Zuerst wird die Kette gespalten, so dass ein zyklisches 2',3'-Phosphat entsteht. Dieses wird anschließend zu dem entsprechenden 3'-Nukleosidphosphat hydrolysiert. RNase A ist in einem breiten Spektrum an Reaktionsbedingungen aktiv (NICHOLS and YUE 2008). Die maximale Aktivität erreicht das Enzym bei einem pH von 7 bis 7,5 (RICHARDS and WYCKOFF 1971).

Die RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* spaltet RNA spezifisch am 3'-Ende von Guanidinresten. Auch hier erfolgt die Hydrolyse in zwei Schritten, die wie bei der RNase A ablaufen. Das Enzym ist ebenfalls unter einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen aktiv (NICHOLS and YUE 2008).

RNasen werden zu analytischen Zwecken angewandt, z.B. für die Sequenzierung von RNA (STRUHL 1989). NUANUALSUWAN and CLIVER (2002) nutzten RNase zum ersten Mal als Vorbehandlung vor der PCR, um die Amplifikation von RNA inaktivierter Viren zu verhindern. Dieser Ansatz wurde beispielsweise ausgenutzt, um die Hitzestabilität von Hepatitis E-Viren zu untersuchen, da dafür effiziente, schnelle und empfindliche Zellkultursysteme fehlen (SCHIELKE et al. 2011).

1.6 Molekulare Nachweismethoden für Nukleinsäuren

1.6.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine *in vitro*-Methode, um ein bestimmtes DNA-Fragment innerhalb weniger Stunden zu amplifizieren (SCHOCHETMAN et al. 1988). Entwickelt wurde sie 1983 von Kary Mullis (BARTLETT and STIRLING 2003). Heute dient sie als Goldstandard für den Nachweis vieler Mikroorganismen.

Das Prinzip basiert auf einem dreistufigen Zyklus: Denaturierung, Annealing und Extension. In der ersten Stufe werden die Wasserstoffbrückenbindungen der doppelsträngigen DNA-Vorlage aufgetrennt, indem die DNA auf mindestens 90 °C erhitzt wird. Anschließend folgt das Annealing, die Anlagerung von zwei zur DNA komplementären Oligonukleotidprimern, die das DNA-Fragment flankieren, welches amplifiziert werden soll. Die Temperatur ist von Länge und Sequenz der Primer abhängig und liegt in der Regel bei 50-60 °C. Schließlich katalysiert die

hitzestabile Taq-Polymerase die Synthese eines neuen DNA-Strangs aus freien Desoxyribonukleosidtriphosphaten. Diese Extension erfolgt im Temperaturoptimum von 72 °C. Die mehrmalige Wiederholung dieses Zyklus führt zur exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNA (Abbildung 5) (SCHOCHETMAN et al. 1988, WHITE et al. 1989, JOSHI and DESHPANDE 2010).

Um RNA zu amplifizieren, wird diese vor dem ersten Zyklus mithilfe der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA umgewandelt (SCHOCHETMAN et al. 1988).

Bei der konventionellen PCR werden die PCR-Produkte durch die Gelelektrophorese visualisiert und analysiert. Eine andere Möglichkeit der Visualisierung besteht in der Echtzeit-PCR durch den Einsatz eines fluoreszierenden Reporters, der mit der DNA hybridisiert. Die Fluoreszenz kann in Echtzeit gemessen werden, welche proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt (HOLZAPFEL and WICKERT 2007).

1.6.2 Rekombinase-basierte Amplifikation

Die Rekombinase-basierte Amplifikation (RAA) ist wie die PCR eine *in vitro*-Methode, um ein bestimmtes DNA-Fragment zu amplifizieren. Im Gegensatz zur PCR werden hierfür jedoch nicht unterschiedliche Temperaturzyklen, die mindestens 2 Stunden Zeit in Anspruch nehmen, sondern lediglich eine konstante Temperatur benötigt, wodurch die Gesamtdauer der Analyse nur 15 min beträgt. Die RAA zählt daher zu den sogenannten isothermalen Amplifikationstechniken (LI et al. 2019).

Dank der drei Schlüsselproteine Rekombinase, „Loading“-Faktor und Einzelstrang-bindendes Protein kann die Reaktion bei einer konstanten Temperatur von 37-42 °C stattfinden. Die Rekombinase bindet mithilfe des „Loading“-Faktors an Primer, die komplementär zur Ziel-DNA sind. Durch die Bindung dieses Komplexes an die DNA entsteht ein D-Loop. In diesem liegt ein DNA-Strang als Einzelstrang vor und wird durch das Einzelstrang-bindende Protein stabilisiert. Der andere Strang liegt doppelsträngig vor, da der Primer daran gebunden ist. Daran setzt eine Polymerase an, die einen neuen Strang synthetisiert. Die Rekombinase löst sich und initiiert mithilfe eines neuen Primers eine neue Verdrängungsschleife (Abbildung 5). Genau wie bei der PCR muss für die Amplifikation von RNA eine Reverse Transkriptase hinzugefügt werden (LI et al. 2019).

Die Amplifikationsprodukte können ebenfalls mithilfe eines fluoreszierenden Reporters visualisiert werden. Von Vorteil gegenüber der PCR ist, dass günstige, tragbare Geräte genutzt werden können, um die Fluoreszenz zu messen (ABD EL WAHED et al. 2013).

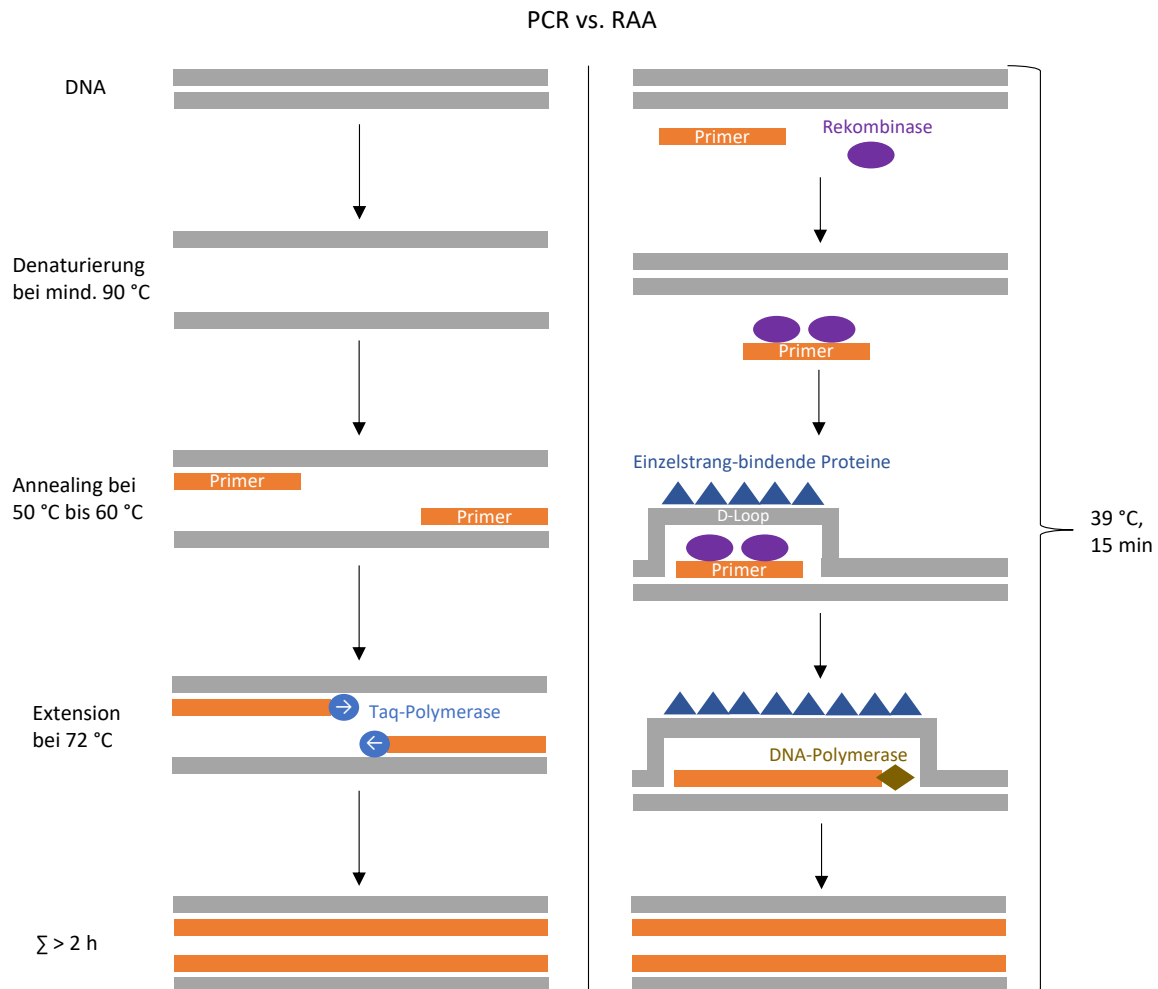


Abbildung 5. Methodenvergleich zwischen PCR und RAA. Der Doppelstrang wird bei der PCR durch Hitze aufgetrennt, während bei der RAA ein Rekombinase-Primer-Komplex an die DNA bindet und einen D-Loop bildet. Im Gegensatz zur PCR können die Prozesse der RAA bei einer konstanten Temperatur von 39 °C und innerhalb von 15 min ablaufen. Die bei der PCR benötigten Temperaturzyklen beanspruchen hingegen einen zeitlichen Rahmen von mindestens 2 Stunden. Abbildung modifiziert nach LI et al. (2019) und ERLICH (1989).

Veröffentlichung

1.7 Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig unter der Betreuung von Prof. Dr. Uwe Truyen und Dr. Ahmed Abd El Wahed durchgeführt. Die Literaturrecherche und die Methodenentwicklung habe ich mit der Unterstützung der oben genannten Betreuer selbstständig realisiert. Bei der Durchführung und Auswertung der Versuche erhielt ich Unterstützung von Dr. Franziska Tanneberger und Dr. Ahmed Abd El Wahed. Das Manuskript habe ich mit Unterstützung der Betreuer selbstständig angefertigt und wurde in Absprache mit den genannten Co-Autoren eingereicht.

1.8 Publikation

Validation of the efficacy of air purifiers using molecular techniques

Finja Rausch¹, Franziska Tanneberger¹, Ahmed Abd El Wahed¹, Uwe Truyen¹

¹Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany

Eingereicht: 07.11.2022


Akzeptiert: 23.12.2022

Veröffentlicht: 09.01.2023

PLoS ONE 18(1): e0280243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243>

RESEARCH ARTICLE

Validation of the efficacy of air purifiers using molecular techniques

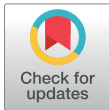
Finja Rausch, Franziska Tanneberger, Ahmed Abd El Wahed *, Uwe Truyen

Faculty of Veterinary Medicine, Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, Leipzig, Germany

* ahmed.abd_el_wahed@uni-leipzig.de

Abstract

The importance of air purifiers has increased in recent years, especially with the “coronavirus disease 2019” pandemic. The efficacy of air purifiers is usually determined under laboratory conditions before widespread application. The standard procedure for testing depends on virus cultivation and titration on cell culture. This, however, requires several days to deliver results. The aim of this study was to establish a rapid molecular assay which can differentiate between intact infectious and distorted non-infectious virus particles. Feline Coronavirus was selected as model for screening. First the samples were pretreated with enzymes (universal nuclease and RNase cocktail enzyme mixture) or viability dye (propidium monoazide) to eliminate any free nucleic acids. The ribonucleic acid (RNA) from intact virus was released *via* magnetic beads-based extraction, then the amount of the RNA was determined using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or reverse transcription recombinase-aided amplification (RT-RAA). All results were compared to the infectivity assay based on the calculation of the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀). The nuclease has eliminated 100% of the free Feline Coronavirus RNA, while propidium monoazide underperformed (2.3-fold decrease in free RNA). Both RT-RAA and real-time RT-PCR produced similar results to the infectivity assay on cell culture with limit of detection of 10² TCID₅₀/mL. Two UV-C air purifiers with prosperities of 100% inactivation of the viruses were used to validate the established procedure. Both real-time RT-PCR and RT-RAA were able to differentiate between intact virus particles and free RNA. To conclude, this study revealed a promising rapid method to validate the efficacy of air purifiers by combining enzymatic pretreatment and molecular assays.



OPEN ACCESS

Citation: Rausch F, Tanneberger F, Abd El Wahed A, Truyen U (2023) Validation of the efficacy of air purifiers using molecular techniques. PLoS ONE 18(1): e0280243. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243>

Editor: Yanpeng Li, Shanghai Public Health Clinical Center, Fudan University, CHINA

Received: November 7, 2022

Accepted: December 23, 2022

Published: January 9, 2023

Copyright: © 2023 Rausch et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All data are available in the paper.

Funding: The author(s) received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

The disinfection of room air by suitable filter systems has become increasingly necessary particularly during the “coronavirus disease 2019” (COVID-19) pandemic [1]. The main method is based on mechanical hindering of the microorganism particles (inertial, diffusion and interception effects) [2–5]. Based on the efficacy, mechanical filters are classified into: pre (> 10 μm), medium (1–10 μm), high efficiency (HEPA, >0.3–1 μm) and ultra-low particulate air (ULPA, 0.12–0.25 μm) filters [4–6]. HEPA filters are widely used, for example, in heating, ventilation and air conditioning (HVAC) systems in medical field or in aviation [7].

Another approach is the direct inactivation of microorganisms, e.g. by ultraviolet-C (UV-C), which has the property of degrading the nucleic acids [8]. UV-C light is used as stand-alone units named flow ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) lamps or in combination with mechanical filters [2, 3, 9, 10]. Upper-room UVGI is often used for room disinfection particularly in surgical rooms, where sterility is required [8]. In general, the approval of all kind of air purifiers is subject to high standards before commercialization [6, 11–16]. The general rule for mobile air cleaners is that they should reduce the concentration of viruses in the air of the occupied area by 90% (one \log_{10} step) within half an hour when used as intended [17].

The efficacy of all air purifiers is first tested under laboratory conditions. Infectious particles are aerosolized through an air purifier test chamber. Air sampling is conducted upstream and downstream of the air purifier on water-soluble gelatin filter attached to air pump. The differences in infectivity before and after the air purification can be determined using e.g. a cell culture system [18, 19]. A reduction of four log levels in 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) represents a virus titer reduction of 99.99% and is therefore considered effective for air purification [20]. However, the virus titer quantification is very time-consuming and requires a well-equipped laboratory with high sterility condition. Molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) or isothermal amplification technologies like recombinase-aided amplification (RAA) are rapid, sensitive, and specific methods for detecting pathogens [21]. Nevertheless, these techniques cannot distinguish between infectious and non-infectious virus particles as nucleic acid (NA) can persist up to three weeks after cell death [22, 23]. However, a technique to get rid of free NA before proceeding with the extraction step can help in differentiating between NA within intact virus particle or free-floating NA. A NA-intercalating dye such as ethidium monoazide bromide (EMA) or propidium monoazide (PMA) can penetrate distorted cells and binds covalently to NA, when photolyzed with bright visible light at a wavelength of 465–475 nm [24–29]. The NA-EMA/PMA-complex cannot be amplified during PCR [30]. Alternative approach is to degrade NA using nucleases. The benzonuclease (benzonase) was used for the differentiation between intact and heat inactivated viruses [31]. Benzonase is an endonuclease produced in *Escherichia coli* (*E. coli*) strain W₃₁₁₀ that cleaves the phosphodiester bond of RNA and DNA. The cleavage results in short NA fragments of three to five base pairs, which can no longer be amplified during PCR [32–34].

The aim of this study is to develop a protocol to speed up the efficacy testing of air purifiers based on a molecular assay. To distinguish between infectious intact virus particles and inactivated distorted virus particles, the sample was first treated with either PMA or universal nuclease to remove free NA; thereafter, the NA extraction procedure will assure the release of NA from intact particles. Feline Coronavirus (FCoV) was applied as a model virus and both RT-PCR and RT-RAA as molecular detection methods. The established protocol was used to test the efficacy of air purifiers in comparison to the infectivity assay based on the calculation of the TCID₅₀.

Materials and methods

Virus

A field isolate of FCoV (strain Munich) was used for all experiments. FCoV was propagated in Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) cells (catalogue number RIE 769, Friedrich-Loeffler-Institut, Greifswald, Germany) [35]. Cultivation was performed at 37°C and 5% CO₂ in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM, high-glucose, w/ stable glutamine, w/ sodium pyruvate (BIOWEST, Nuaille, France)), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, PAA Laboratories, Pasching, Austria), 1% l-glutamine, 1% nonessential amino acids, penicillin (100 IU/mL; Biochrom, Berlin, Germany), and streptomycin sulfate (100 lg/mL; Biochrom). The cultivation resulted in a virus titer of 10^{8.25} TCID₅₀/mL.

Molecular RNA standard

A synthetic molecular RNA standard (nucleotides 28584 to 29096 of the GenBank accession number DQ010921) was used for generating a standard curve during RT-PCR. For this purpose, a DNA strand was synthesized by Thermo Fisher Scientific GENEART (Regensburg, Germany) and transcribed into RNA using HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Germany) following the manufacturer's instructions. After RNA quantification using Qubit RNA BR Assay Kit from Thermo Fisher Scientific (Regensburg, Germany), a ten-fold serial dilution was prepared. Concentrations of 10^5 , 10^4 and 10^3 RNA molecules/ μ L of the standard were used for RT-PCR.

PMA

The viability dye PMA was purchased from Biotium Inc., CA, USA. It was already dissolved in water at 20 mM concentration and was stored at -20°C , defrosting was performed directly before use at room temperature. The reaction mixture of 100.5 μ L consisting of 0.5 μ L of PMA (100 mM) and 100 μ L of FCoV RNA was incubated in a dark chamber for 10 min. For photo-activation, the sample was exposed to a blue LED lamp (H-B3, UltraFire, NJ, USA) with a wavelength of 470–475 nm at a distance of 15 cm at 600 rpm for 30 min.

Nuclease and RNase

The Pierce Universal Nuclease for Cell Lysis (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) and the RNase cocktail enzyme mix (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA), both stored at -20°C , were used in this study. First, the total reaction volume of 56 μ L contained 40 μ L of rehydration buffer (Jiangsu Qitian Gene Biotechnology Co., Ningbo, China), 5 μ L of magnesium acetate (Jiangsu Qitian Gene Biotechnology Co., Ningbo, China), 6 μ L of universal nuclease, and 5 μ L of sample. In the first step, FCoV RNA equivalent to 10^8 TCID₅₀/mL was tested as representative of free RNA. In a second step, ten-fold serial dilution of FCoV cell culture supernatant (titer of 10^6 to 10^4 TCID₅₀/mL) was screened as representative of intact virus particle. In a third step, ten-fold serial dilution of FCoV cell culture supernatant (titer of 10^8 to 10^2 TCID₅₀/mL) enriched with 5 μ L of FCoV RNA was tested. The mixture was incubated at 600 rpm and 37°C for 30 min. The enzyme reaction was stopped by adding 5 μ L of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany).

The samples taken during testing of an air purifier were subjected to modified pretreatment with the universal nuclease, the RNase cocktail enzyme mix and a reaction buffer consisting of Tris (50 mM, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany), magnesium chloride (1 mM, Rapidozym Gesellschaft für Laborhandel und DNA Diagnostika mbH, Berlin, Germany) and bovine serum albumin (BSA, 0.1 mg/ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). The total reaction volume of 57.5 μ L was composed of 45 μ L of the reaction buffer, 6 μ L of the universal nuclease, 1.5 μ L of the RNase cocktail enzyme mix, and 5 μ L of the sample. This was followed by an incubation period at 450 rpm and 37°C for 60 min. The enzyme reaction was stopped by adding 5 μ L of EDTA and incubating the mixture at 60°C for 10 min.

Extraction

RNA extraction was carried out using the Dynabeads SILANE Viral NA Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) according to manufacturer's instructions with few modifications as following. Briefly, the sample volume was 56 μ L (reaction mixture containing only the universal nuclease) and 57.5 μ L (reaction mixture containing the enzyme mix), respectively, the wash steps were performed for one time, and the RNA was eluted in a final volume of 60 μ L.

Real-time RT-RAA

A previously published protocol for the detection of a highly conserved region of the FCoV 7b gene was used for real-time RT-RAA [36]. RT-RAA Nucleic Acid Amplification Kit (Fluorescent Method, Jiangsu Qitian Gene Technology Co., Ningbo, China) was used. The final reaction volume of 50 μ L contained 25 μ L of rehydration buffer, 2.5 μ L of magnesium acetate, 2.1 μ L of forward primer (10 μ M/ μ L), 2.1 μ L of reverse primer (20 μ M/ μ L), 0.6 μ L of probe (10 μ M/ μ L), 12.7 μ L of PCR clean water and 5 μ L of extracted RNA. The sequences and designations of the primers and the probe were as follows: FCoV RPA FP1 (forward primer) 5' - TCATCGCGCTGCCTACTCTTGTACAGAATGGTAAG-3'; FCoV RPA RP3 (reverse primer) 5' - ACTAGATCCAGACGTTAGCTCTCCATTGTTGGCTC-3'; FCoV RPA Probe 5' - ATC-TAAACTTCCATA (BHQ1—dT, Tetrahydrofuran and FAM—dT)GCAATAGGGTTGCTGTG-TACCTCCTATTACACG-Phosphate. The reaction mixture was added into the lid of the tube which contained freeze-dried reaction-pellets. After closing the tube, it was centrifuged, mixed and centrifuged again. The tube was placed into the T8-ISO device (Axxin, Fairfield, Australia) and incubated at 39°C for 15 min. A mixing and centrifuging step was conducted after 320 s.

Real-time RT-PCR

A previously published protocol for the detection of a highly conserved region of the FCoV 7b gene was used for real-time reverse transcriptase PCR [37]. QuantiTect Probe RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and the Stratagene Mx3005p QPCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, United States) were used. The reaction mixture of 20 μ L was composed of 10 μ L of QuantiTect Probe RT-PCR Master-Mix, 7.5 μ L of PCR clean water, 0.2 μ L of QuantiTect RT Mix, 0.5 μ L of forward primer (10 μ M/ μ L), 0.5 μ L of reverse primer (10 μ M/ μ L), 0.3 μ L of probe (10 μ M/ μ L) and 1 μ L of extracted RNA. The primers and the probe were as follows: FCoV1128f (forward primer) 5' - GATTGATTTGGCAATGCTAGATTT-3'; 5' - FCoV1229r (reverse primer) 5' - AACAACTCACTAGATCCAGACGTTAGCT-3'; probe 5' - 6FAM-TCCgCTATgACgAgCCAACAATggATMR-3' (40). The thermal cycling protocol consisted of a 30 min reverse transcriptase step at 50°C, an initial heat activation step at 95°C for 15 min and 40 cycles at 94°C for 15 s and at 60°C for 45 s.

Statistical analysis

The t test was used to compare the viability pretreatments with the controls. The data were considered significant with values of $p < 0.5$. The data analysis was performed with GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, US).

Design of the filter experiment

The test facility setup for the air purifier test was used as described by Wenke et al. (Fig 1) [18]. Two UV-C lamps (2036-4K, 36 Q; sterilAir, Weinfelden, Switzerland and UV-Air Protector, Weidenberg, Hans Precht GmbH & Co.KG) were tested. FCoV was aerosolized by an ATM 230 aerosolizer (Topas GmbH, Dresden, Germany) and passed through the air purifier test chamber with a volume flow rate of 2300.4 m^3/h . Air collection was performed by placing both an air sampler pump (Analyt-MTC GmbH, Müllheim, Germany) and water-soluble gelatin filters (Sartorius 12602-80-ALK, Sartorius AG, Göttingen, Germany) in front of and behind the air purifier. The gelatin filters were dissolved in 5 mL of DMEM at 37°C in 10 min. The modified pretreatment with universal nuclease and RNase cocktail enzyme mix was performed as described above. After RNA extraction, amplification was performed using RT-RAA as well as RT-PCR. Extracted samples without pretreatment served as control. Simultaneously, the

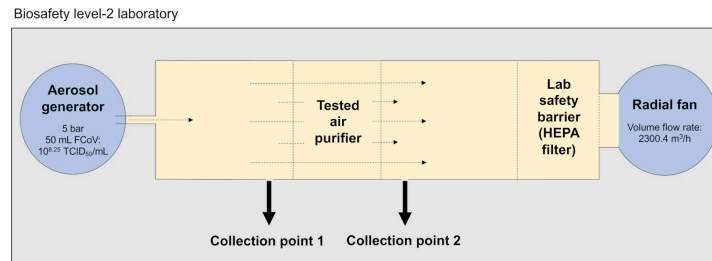


Fig 1. Air purifier testing cabinet.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243.g001>

samples were analyzed for infectivity by performing virus titration. For this purpose, 100 μ L of CRFK cells were added to each well of a 96-well plate. Samples were serially diluted and 100 μ L was added to each well of the 96-well plate. The virus-specific cytopathogenic effect (CPE) was assessed microscopically over a period of 6 days. Afterwards, the TCID₅₀ was calculated using the Spearman-Kaerber method. The retention efficacy of the air purifier was calculated using the following equation:

$$\text{Reduction (\%)} = \frac{\text{pathogen number behind the air purifier}}{\text{pathogen number in front of the air purifier}} * 100\%$$

Results

Result output of combining nucleases and the molecular assay

After adding a nuclease to a particular sample, three result outputs can be delivered. First, samples containing only intact virus particles give the same result, regardless of whether pretreatment with the nuclease was carried out or not (Fig 2A). The second outcome is obtained by samples containing a mixture of intact viruses and free NA. The nuclease degrades the free NA, but the intact viruses can still be detected. Therefore, the RT-RAA signal of the pretreated samples represent the concentration of the intact virus (Fig 2B). As a third option, the nuclease is applied to a sample containing only free NA. No NA was detected by RT-RAA in this case (Fig 2C).

PMA versus universal nuclease

The efficacy of the universal nuclease as well as the viability dye PMA was first tested with FCoV RNA in triplicate. The universal nuclease was able to degrade the entire RNA (Fig 2C). In contrast, only a 2.3-fold delay in the time threshold (tt) was observed on average when using PMA indicating less effectiveness (Fig 3). Due to the low performance of PMA, all further tests were carried out with the universal nuclease.

Effect of universal nuclease on infectious intact viruses

The effect of the universal nuclease on intact virus particles represented by a dilution series of a cell culture supernatant was verified in duplicate. In both RT-RAA and real-time RT-PCR, the dilution series with pretreatment shows almost the same results as the dilution series

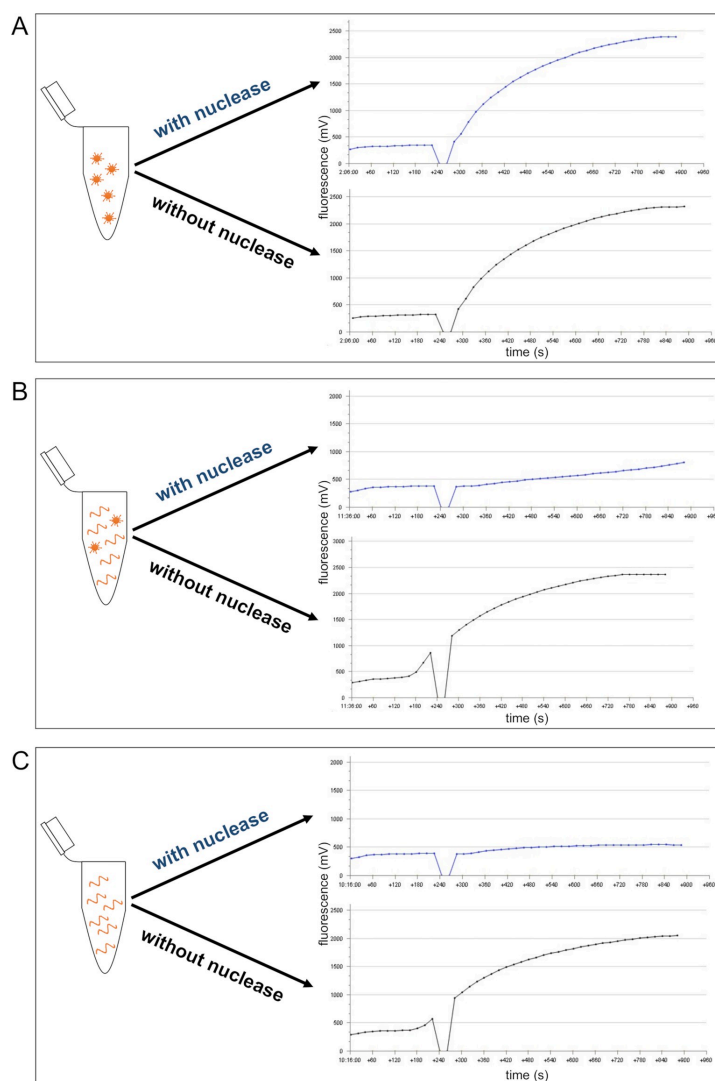


Fig 2. Result outputs by combining nucleases and RT-RAA assay. Pretreatment with nuclease of samples containing only intact virus particles did not interfere with the RT-RAA signals (A). Samples containing both intact virus particles and free NA give different results because the free NA are degraded by the nuclease (B). Samples containing only free NA give no signal when pretreated with nuclease (C).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243.g002>

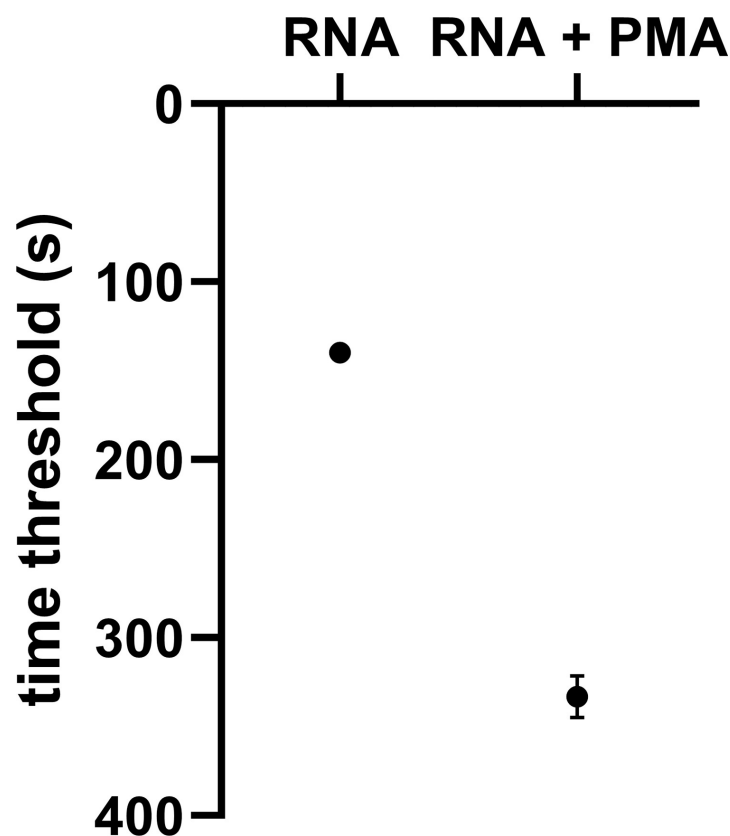


Fig 3. Effect of PMA on free FCoV RNA equivalent to 10^8 TCID₅₀/mL. Delay in time threshold after application of PMA was recorded. The difference between RNA and PMA pretreatment was statistically significant ($p < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243.g003>

without pretreatment (Fig 4), which means that the cell culture supernatant contains infectious intact virus particles that cannot be degraded by the universal nuclease.

Effect of universal nuclease on spiked samples with a combination of intact virus and free RNA

The dilution series of cell culture supernatant (i.e., intact virus particles) was enriched with FCoV RNA. The mixture was pretreated with universal nuclease. In both RT-RAA and real-time RT-PCR, only the RNA was amplified from the intact virus particle as the free RNA was degraded when pretreated with the universal nuclease (orange triangles in Fig 5). In case of samples containing intact virus particles, the same results were obtained indicating the success of the universal nuclease pretreatment (orange triangles and black dots in Fig 5).

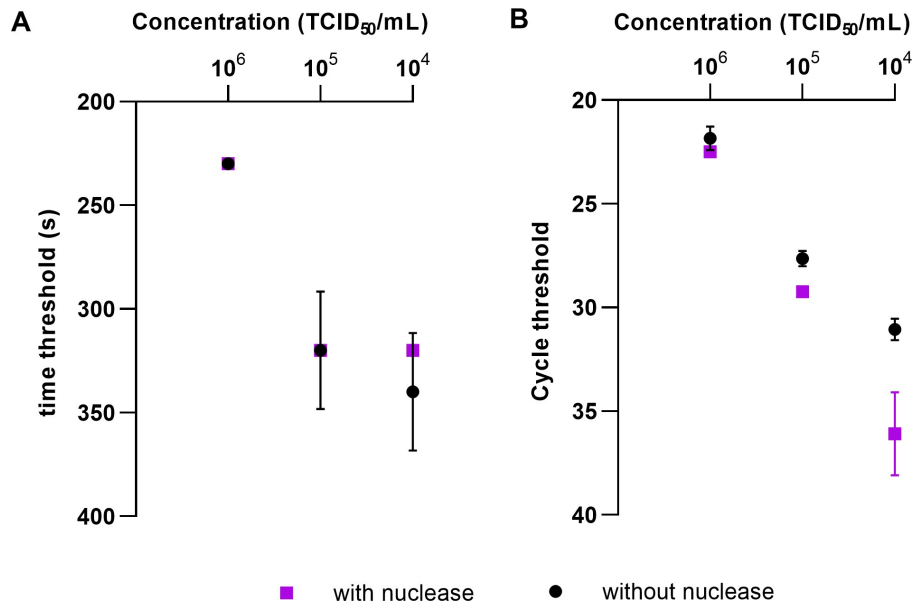


Fig 4. Effect of the universal nuclease on various concentration of infectious intact FCoV viruses. Similar time threshold with or without nuclease was detected (A), however, RT-PCR assay showed a decreased cycle threshold in nuclease pretreated samples, especially samples with lower TCID₅₀ (B). No statistically difference was observed between intact virus particles and intact virus particles pretreated with universal nuclease ($p = 0.7054$ (RT-RAA) and $p = 0.6163$ (RT-PCR)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243.g004>

Air purifier test

Two UV-C lamps were tested in the air purifier testing cabinet. The collected samples were pretreated with a mixture of universal nuclease and RNase cocktail enzyme mix. The pretreatments were carried out in duplicate.

The first UV-C lamp was able to inactivate the viruses with 100% efficacy. The samples collected in front of the air purifier (collection point #1) resulted in a signal in both RT-RAA (Fig 6A) as well as RT-PCR (Fig 6B), while no signal was detected in the samples collected after air purification (collection point #2). The same results were confirmed on the cell culture. The second UV-C achieved the same results as the first experiment (Fig 6C and 6D). The only difference measured between the two UV-C lamps was the total concentration of the FCoV at the collection point #1 ($10^{5.75}$ TCID₅₀/mL and $10^{2.5}$ TCID₅₀/mL, respectively). This indicates that the enzyme mixture works with various amounts of virus particles.

Discussion

Air purifiers play an important role in prevention of airborne viral diseases and must be tested according to official standards before commercial use. The gold standard method is determining the infectivity using cell culture-based approach, which is time-consuming [18, 19]. In this study, the efficacy of air purifiers was tested using a rapid protocol based on a molecular assay combined with nuclease pretreatment. By combining a RNase cocktail, a universal nuclease

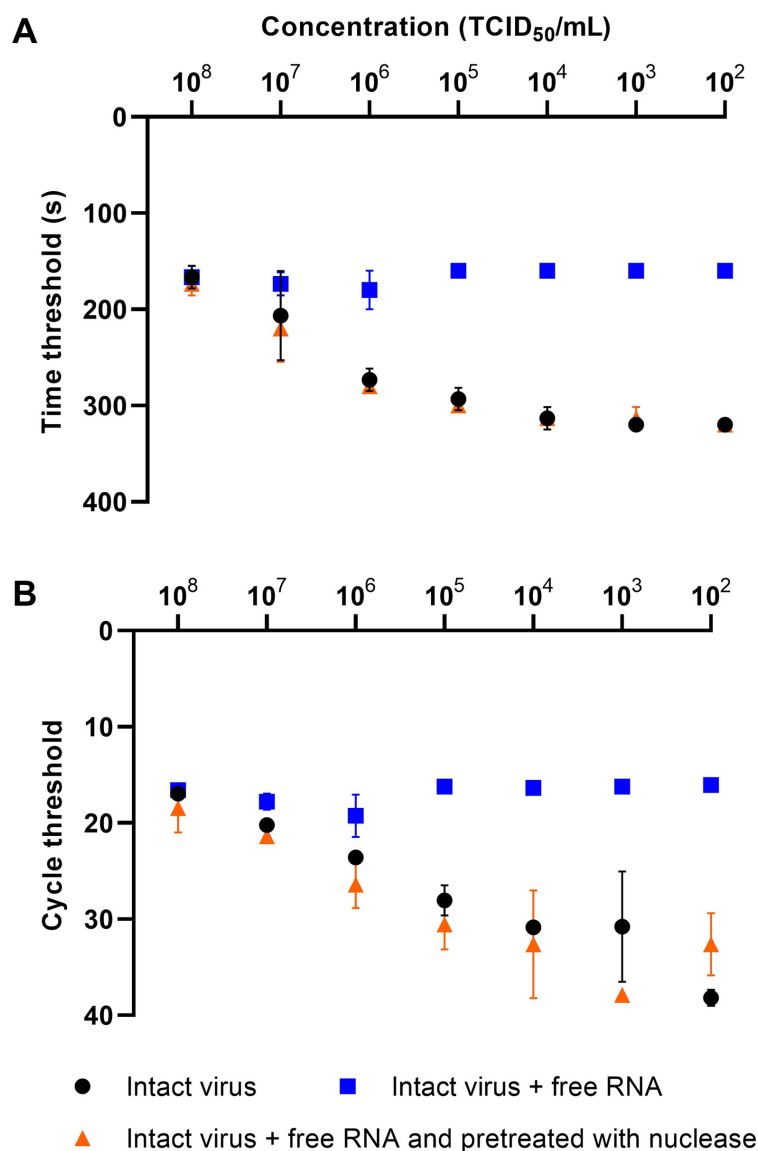


Fig 5. Effectiveness of the universal nuclease on spiked samples with free RNA. In both RT-RAA (A) and real-time RT-PCR (B), the free RNA was degraded when pretreatment with the universal nuclease was performed (orange triangles). The concentrations of those samples correspond to the concentrations of intact virus particles without free RNA and pretreatment; therefore, the orange triangles and black dots overlap. For both RT-RAA and RT-PCR, the differences between intact viruses plus free RNA and intact viruses plus free RNA pretreated with universal nuclease

were statistically significant ($p < 0.001$). The differences between the intact virus particles without enrichment and with enrichment of free RNA were also statistically significant ($p < 0.001$ (RT-RAA) and $p = 0.0035$ (RT-PCR)). No statistically difference was recorded between intact virus particles and intact virus particles plus free RNA pretreated with universal nuclease ($p = 0.8945$ (RT-RAA) and $p = 0.6827$ (RT-PCR)).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243.g005>

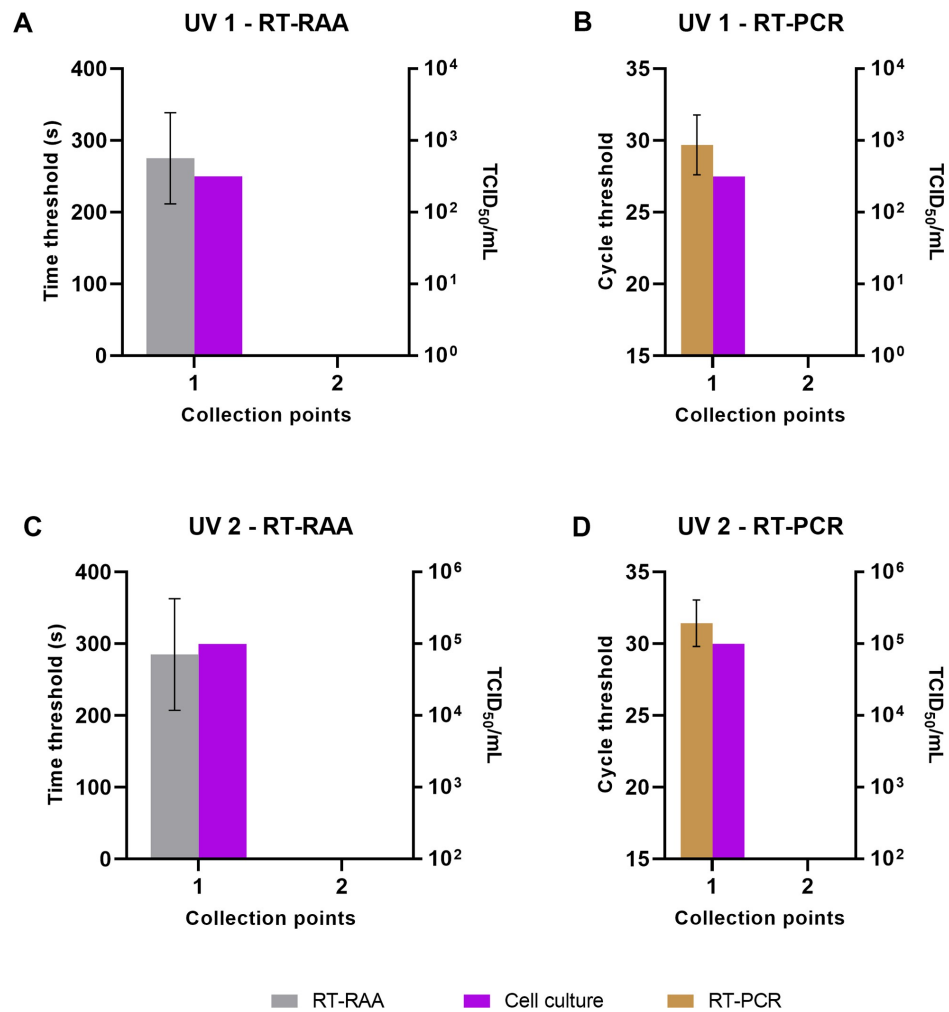


Fig 6. Effectiveness of two UV-C lamps in inactivating infectious virus particles. Collection point #1 represents samples taken in front of the air purifier, while collection point #2 represents samples collected after air purification. Samples collected before the air purification have the expected concentration of viruses in cell culture as well as in RT-RAA and real-time RT-PCR. Enzyme pretreatment of the samples from collection point #2 results in absence of signals in both RT-RAA (A and C) and real-time RT-PCR (B and D).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0280243.g006>

and RT-RAA, successful degradation of free RNA was achieved, allowing differentiation between intact infectious and distorted FCoV particles. These results were confirmed by determination of the TCID₅₀ in cell culture.

There are several methods to evaluate air purifiers, including animal experiment [38] as well as laboratory-based test chambers [39, 40]. To determine the efficacy of the air purifier, the samples collected upstream and downstream of the air purifier can be tested for the presence of infectious pathogens based on cell culture system. Culturing viruses requires trained personnel, well-equipped laboratory and require at least three days to evaluate the results [41]. In contrast, molecular methods require few hours in case of real-time RT-PCR or 15 minutes for RT-RAA. The real-time RT-PCR must be performed using an expensive thermal cycler, while the RT-RAA was conducted in a mobile suitcase lab [21, 36].

In the present study, a comparison was first made between the viability dye PMA and the universal nuclease. The PMA revealed a poor performance in our set up. PMA proved to be a promising approach for distinguishing between viable and non-viable bacteria [26] and has replaced the viability dye EMA, as the latter also leads to loss of DNA of viable cells and is, therefore, less specific concerning live-dead discrimination [26, 42, 43]. A major drawback of PMA is its inconsistency when applied to viruses [43, 44]. In our study, the PMA was incubated with free RNA, which resulted in a partial elimination of free NA. Similar results have been obtained by others [45, 46]. The poor performance of the PMA with RNA viruses was expected as PMA binds preferentially to double-stranded DNA [47]. In addition, there are many variables that need to be considered upon using PMA, e.g. the dye concentration, the pH and salt concentration of the sample, the type of the light source or the dye incubation conditions [43, 46, 48]. For example, light sources used in the previous studies were inconsistent, therefore, no optimal unified light exposure time is mentioned in the literature [49]. It is not yet fully understood how EMA or PMA prevents the amplification of nucleic acids. One theory is that the DNA is fragmented during irradiation with visible light [50]. Based on this, it is assumed that the length of the amplified target gene plays an important role [49]. In real-time fluorescence-based assay, like in our study, the amplicon size is small, therefore, a limited effect of PMA was observed. The situation is different upon applying conventional PCR with longer amplicon size.

The universal nuclease resulted in complete degradation of free RNA in our study. The search on PubMed revealed few results on the use of nuclease-like benzonase in viability assays of microorganisms. Two studies successfully applied enzymes to degrade free nucleic acids [33, 51]. Monteiro et al. performed a pretreatment of wastewater samples with the universal nuclease to measure the amount of infectious SARS-CoV-2 [51]. Amar et al. pretreated human skin microbiome samples with benzonase to remove NA of dead bacteria to ensure the sequencing of NA from live microbiota [33]. In another study to distinguish infectious from non-infectious human rotaviruses and noroviruses from fecal sample, benzonase application was not successful [31]. The author has no explanation for such effect.

The samples collected behind the air purifier of UV-C were completely inactivated. UV irradiation can damage the NA, while the protein coat remains intact and protects the NA [52]. This would prevent the enzymes from degrading the NA of these inactivated viruses. However, an UV exposure time exceeding 45 min increases the permeability of the envelope [53], in addition, high UV dose ($\leq 1250 \text{ J/m}^2$) are able to destroy the NA as well as the capsid [54].

In previous studies on the efficacy of air purifiers, a specific pathogen is often aerosolized and tested for infectivity at the end of the test procedure by culturing bacteria or viruses [18, 19, 39, 55, 56]. In our study, a rapid protocol to distinguish between intact infectious and distorted FCoV particles was developed to accelerate the efficacy testing, using a mixture of nucleases and real-time RT-PCR or RT-RAA. The nucleases removed

free NA so that after NA extraction only NA from intact virus particles could be detected by molecular assays. The approach could also be carried out with other pathogens in the future, extending its use to other areas besides air purifier testing.

Acknowledgments

Authors thank Dana Ruster and Mario Reinhardt, Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, Germany for expert technical support and Md Anik Ashfaq Khan, Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Leipzig University, Germany for support in performing the statistical analysis of the results.

Author Contributions

Conceptualization: Ahmed Abd El Wahed, Uwe Truyen.

Data curation: Finja Rausch, Ahmed Abd El Wahed.

Formal analysis: Finja Rausch, Franziska Tanneberger, Ahmed Abd El Wahed.

Funding acquisition: Uwe Truyen.

Investigation: Finja Rausch, Franziska Tanneberger, Uwe Truyen.

Methodology: Finja Rausch, Ahmed Abd El Wahed.

Project administration: Ahmed Abd El Wahed.

Resources: Ahmed Abd El Wahed, Uwe Truyen.

Software: Finja Rausch.

Supervision: Ahmed Abd El Wahed, Uwe Truyen.

Validation: Finja Rausch, Franziska Tanneberger.

Visualization: Finja Rausch.

Writing – original draft: Finja Rausch, Ahmed Abd El Wahed.

Writing – review & editing: Finja Rausch, Franziska Tanneberger, Ahmed Abd El Wahed, Uwe Truyen.

References

1. Dbouk T, Roger F, Drikakis D. Reducing indoor virus transmission using air purifiers. *Physics of Fluids*. 2021; 33(10):103301. <https://doi.org/10.1063/5.0064115> PMID: 34629834
2. Vasilyak L. Physical methods of disinfection (a review). *Plasma Physics Reports*. 2021; 47(3):318–27.
3. Matys J, Grzech-Leśniak K, Dominiak M. Disinfectants and devices for surface and air disinfection in dental offices. *Journal of Stomatology*. 2020; 73(4):200–5.
4. Liu G, Xiao M, Zhang X, Gal C, Chen X, Liu L, et al. A review of air filtration technologies for sustainable and healthy building ventilation. *Sustainable Cities and Society*. 2017; 32:375–96.
5. Wenke C. Integration von Zu- und Umluftfiltration in der Schweinehaltung zur Reduzierung der Belastung mit Krankheitserregern 2019. Available from: <https://ul.qucosa.de/api/qucosa%3A33842/attachment/ATT-0/>.
6. Anonymus. Schwebstofffilter (EPA, HEPA und ULPA)—Teil 1: Klassifikation, Leistungsprüfung, Kennzeichnung; (DIN EN 1822–1:2019–10). Berlin: Beuth-Verlag; 2019.
7. Brincat J-P, Sardella D, Muscat A, Decelis S, Grima JN, Valdramidis V, et al. A review of the state-of-the-art in air filtration technologies as may be applied to cold storage warehouses. *Trends in Food Science & Technology*. 2016; 50:175–85.
8. Reed NG. The history of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. *Public health reports*. 2010; 125(1):15–27. <https://doi.org/10.1177/003335491012500105> PMID: 20402193

9. Green CF, Scarpino PV. The use of ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) in disinfection of airborne bacteria. *Environmental Engineering and Policy*. 2001; 3(1):101–7.
10. Tysiąc-Miśta M, Dubiel A, Brzoza K, Burek M, Palkiewicz K. Air disinfection procedures in the dental office during the COVID-19 pandemic. *Med Pr*. 2021; 72(1):39–48. <https://doi.org/10.13075/mp.5893.01005> PMID: 33063773
11. Anonymus. Luftfilter für die allgemeine Raumlufttechnik—Teil 1: Technische Bestimmungen, Anforderungen und Effizienzklassifizierungssystem, basierend auf dem Feinstaubabscheidegrad (ePM₁₀); (DIN EN ISO 16890–1:2017–08). Berlin: Beuth-Verlag; 2017.
12. Anonymus. Messen von Innenraumluftverunreinigungen—Anforderungen an mobile Luftreiniger zur Reduktion der aerosolgebundenen Übertragung von Infektionskrankheiten; (VDI-EE 4300–14:2021–09). Düsseldorf: VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL)—Normenausschuss; 2021.
13. Anonymus. Entkeimung von Raumluft mit UV-Strahlung—UV-C-Sekundärluftgeräte; (DIN/TS 67506:2022–02). Berlin: Beuth-Verlag; 2022.
14. Anonymus. Schwebstofffilter und Filtermedien zur Abscheidung von Partikeln aus der Luft—Teil 1: Klassifizierung, Leistungsprüfung, Kennzeichnung; (ISO 29463–1:2017–09). Berlin: Beuth-Verlag; 2017.
15. Anonymus. Elektrostatik; Teil 4–7: Standard-Prüfverfahren für spezielle Anwendungen—Ionisation (IEC 61340-4-7:2017). Berlin: VDE Verlag GmbH; 2017.
16. Anonymus. Elektrofilter—Prozessluft- und Raumluftreinigung; (VDI-EE 3678 Blatt 2). Düsseldorf: VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL)—Normenausschuss; 2021.
17. Anonymus. Informationen zum Einsatz von mobilen Luftreinigern—Auszüge aus der Expertenempfehlung VDI-EE 4300 Blatt 14 Düsseldorf: VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft; 2021 [20.09.2022]. Available from: https://www.vdi.de/fileadmin/pages/mein_vdi/redakteure/publikationen/Informationen_zum_Einsatz_von_mobilen_Luftreinigern.pdf.
18. Wenke C, Pospiech J, Reutter T, Truyen U, Speck S. Efficiency of different air filter types for pig facilities at laboratory scale. *PLOS ONE*. 2017; 12(10):e0186558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186558> PMID: 29028843
19. Eisenöffel L, Reutter T, Horn M, Schlegel S, Truyen U, Speck S. Impact of UVC-sustained recirculating air filtration on airborne bacteria and dust in a pig facility. *PloS one*. 2019; 14(11):e0225047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225047> PMID: 31697778
20. Rabenau HF, Schwebke I, Blümel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, et al. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e. V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin. Robert Koch-Institut; 2015. Available from: <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/178/29aJnIrkfjK.pdf?sequence=1>.
21. Mondal D, Ghosh P, Khan MAA, Hossain F, Böhlken-Fascher S, Mattlashewski G, et al. Mobile suitcase laboratory for rapid detection of *Leishmania donovani* using recombinase polymerase amplification assay. *Parasites & Vectors*. 2016; 9(1):281. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1572-8> PMID: 27177926
22. Josephson KL, Gerba CP, Pepper IL. Polymerase chain reaction detection of nonviable bacterial pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993; 59(10):3513–5. <https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3513-3515.1993> PMID: 8250575
23. Masters C, Shallcross J, Mackey B. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*. 1994; 77(1):73–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03047.x> PMID: 7928784
24. Hixon SC, White WE Jr., Yielding KL. Selective covalent binding of an ethidium analog to mitochondrial DNA with production of petite mutants in yeast by photoaffinity labelling. *J Mol Biol*. 1975; 92(2):319–29. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80096-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80096-1) PMID: 5859041
25. Waring MJ. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*. 1965; 13(1):269–82. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(65\)80096-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80096-1) PMID: 5859041
26. Nocker A, Cheung CY, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods*. 2006; 67(2):310–20. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.04.015> PMID: 16753236
27. Rudi K, Moen B, Drømtorp SM, Holck AL. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Applied and environmental microbiology*. 2005; 71(2):1018–24. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1018-1024.2005> PMID: 15691961
28. Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques*. 2003; 34(4):804–8, 10, 12–3. <https://doi.org/10.2144/03344rr02> PMID: 12703305

29. Wang S, Levin RE. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. *J Microbiol Methods*. 2006; 64(1):1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.023> PMID: 15932774
30. Rudi K, Nogva HK, Moen B, Nissen H, Bredholt S, Møretør T, et al. Development and application of new nucleic acid-based technologies for microbial community analyses in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2002; 78(1):171–80. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00236-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00236-2) PMID: 12222632
31. Oristo S, Lee HJ, Maunula L. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PPA xx, benzonase and RN ase. *Journal of applied microbiology*. 2018; 124(4):1008–16. <https://doi.org/10.1111/jam.13737> PMID: 29464825
32. Zhu Y, Li M, Chen W, Peters A. The smart solution for DNA removal in biopharmaceutical production by benzonase endonuclease. *J Appl Virol*. 2013; 2:25–33.
33. Amar Y, Lagkouvardos I, Silva RL, Ishola OA, Foessel BU, Kublik S, et al. Pre-digest of unprotected DNA by Benzonase improves the representation of living skin bacteria and efficiently depletes host DNA. *Microbiome*. 2021; 9(1):123. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01067-0> PMID: 34039428
34. Miller MD, Tanner J, Alpaugh M, Benedik MJ, Krause KL. 2.1 A structure of Serratia endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Nat Struct Biol*. 1994; 1(7):461–8. <https://doi.org/10.1038/nsb0794-461> PMID: 7664065
35. Crandell RA, Fabricant CG, Nelson-Rees WA. Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro*. 1973; 9(3):176–85. <https://doi.org/10.1007/BF02618435> PMID: 4130570
36. Kobialka RM, Ceruti A, Bergmann M, Hartmann K, Truyen U, Abd El Wahed A. Molecular Detection of Feline Coronavirus Based on Recombinase Polymerase Amplification Assay. *Pathogens*. 2021; 10(10):1237. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101237> PMID: 34684186
37. Gut M, Leutenegger CM, Huder JB, Pedersen NC, Lutz H. One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. *Journal of virological methods*. 1999; 77(1):37–46. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00129-3](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00129-3) PMID: 10029323
38. Dee S, Otake S, Deen J. Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: Results from a 2-year study. *Virus research*. 2010; 154(1–2):177–84. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.07.022> PMID: 20667494
39. Roelants P, Boon B, Lhoest W. Evaluation of a Commercial Air Filter for Removal of Virus from the Air. *Applied Microbiology*. 1968; 16(10):1465–7.
40. Shi B, Ekberg LE, Langer S. Intermediate Air Filters for General Ventilation Applications: An Experimental Evaluation of Various Filtration Efficiency Expressions. *Aerosol Science and Technology*. 2013; 47(5):488–98.
41. Pollard JW, Walker JM. *Basic cell culture protocols*: Springer Science & Business Media; 1997.
42. Nocker A, Camper AK. Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72(3):1997–2004. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1997-2004.2006> PMID: 16517648
43. Elizaquível P, Aznar R, Sánchez G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *Journal of Applied Microbiology*. 2014; 116(1):1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.12365> PMID: 24119073
44. Monteiro S, Santos R. Enzymatic and viability RT-qPCR assays for evaluation of enterovirus, hepatitis A virus and norovirus inactivation: Implications for public health risk assessment. *Journal of Applied Microbiology*. 2018; 124(4):965–76. <https://doi.org/10.1111/jam.13568> PMID: 28833965
45. Bindari YR, Walkden-Brown SW, Gerber PF. Methods to prevent PCR amplification of DNA from non-viable virus were not successful for infectious laryngotracheitis virus. *PLOS ONE*. 2020; 15(5):e0232571. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232571> PMID: 32442180
46. Randazzo W, López-Gálvez F, Allende A, Aznar R, Sánchez G. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int J Food Microbiol*. 2016; 229:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.010> PMID: 27085970
47. Escudero-Abarca BI, Rawsthorne H, Goulter RM, Suh SH, Jaykus LA. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? *Food Microbiology*. 2014; 41:91–5. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.009> PMID: 24750817
48. Fittipaldi M, Codony F, Adrados B, Camper AK, Morató J. Viable real-time PCR in environmental samples: can all data be interpreted directly? *Microbial ecology*. 2011; 61(1):7–12. <https://doi.org/10.1007/s00248-010-9719-1> PMID: 20632000

49. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*. 2012; 91(2):276–89. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.08.007> PMID: 22940102
50. Soejima T, Iida K-i, Qin T, Taniai H, Seki M, Yoshida S-i. Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008; 46(7):2305–13. <https://doi.org/10.1128/JCM.02171-07> PMID: 18448692
51. Monteiro S, Rente D, Cunha MV, Marques TA, Cardoso E, Vilaça J, et al. Discrimination and surveillance of infectious severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 in wastewater using cell culture and RT-qPCR. *Science of The Total Environment*. 2022; 815:152914. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.152914> PMID: 34999067
52. Nuanualsuwan S, Cliver DO. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of Virological Methods*. 2002; 104(2):217–25. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00089-7](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00089-7) PMID: 12088831
53. Nocker A, Sossa KE, Camper AK. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *Journal of microbiological methods*. 2007; 70(2):252–60. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.014> PMID: 17544161
54. Nuanualsuwan S, Cliver DO. Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; 69(1):350–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.350-357.2003> PMID: 12514015
55. Zhang J, Huntley D, Fox A, Gerhardt B, Vatine A, Cherie J. Study of viral filtration performance of residential HVAC filters. *ASHRAE J*. 2020; 62(8):26–32.
56. Lee JH, Kim JY, Cho B-B, Anusha JR, Sim JY, Raj CJ, et al. Assessment of air purifier on efficient removal of airborne bacteria, *Staphylococcus epidermidis*, using single-chamber method. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2019; 191(12):720. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7876-3> PMID: 31691038

Diskussion

Das erstmals im Jahr 2019 auftretende Virus SARS-CoV-2 hat eine Pandemie ausgelöst, die bereits mehr als 6,5 Mio. Menschenleben gefordert hat (ANON. 2022). Wichtige Maßnahmen, um die weitere Verbreitung zu verhindern, sind unter anderem die Durchführung von Schutzimpfungen als auch das Tragen von Atemmasken und die Einhaltung weiterer Hygienevorschriften (HE et al. 2021). Auch die Bedeutung von Luftreinigern hat in den vergangenen zwei Jahren stark zugenommen. Speziell im Gesundheitswesen stellen sie eine wichtige Zusatzmaßnahme dar, um den Gehalt infektiöser Partikel in der Luft zu reduzieren (ZHAO et al. 2020). Bevor Luftreiniger in den Verkehr gebracht werden, werden sie nach festgelegten Prüfverfahren auf ihre Effektivität getestet. Beispielsweise schreibt die VDI-EE 4300 Blatt 14 vor, dass mobile Luftreiniger in der Lage sein müssen, die Viruslast in der Luft der Aufenthaltszone um 90% innerhalb einer halben Stunde zu reduzieren (ANON. 2021a). Zur korrekten Feststellung der Reduktion des Virustiters werden in der Regel aufwendige und zeitintensive Zellkultursysteme benötigt.

Ziel dieser Studie war es, die Effektivitätstestung von Luftreinigern mittels einer molekularen Methode zu vereinfachen. Hierfür wurden die gesammelten Luftproben zur Differenzierung zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Felinem Coronaviruspartikeln einer Enzymvorbehandlung unterzogen. Dies ermöglicht im Vergleich zur Zellkultur einen schnelleren Nachweis von ausschließlich infektiösen Viruspartikeln.

Inhalt der Publikation war zunächst die Etablierung einer geeigneten Methode, um die Virusinfektiosität zu bestimmen. Hierfür wurden sowohl eine Universalnuklease als auch der Farbstoff Propidiummonoazid (PMA) miteinander verglichen. Generell erfolgte zuerst eine Vorbehandlung der Probe mit Farbstoff oder Enzym, anschließend die Nukleinsäureextraktion und zuletzt der Nukleinsäurenachweis mittels RT-PCR oder RT-RAA.

Die Universalnuklease baute erfolgreich die freien Nukleinsäuren von FCoV ab. Es gibt bisher nur wenige Erkenntnisse zu Nukleasen, die für die Unterscheidung von infektiösen und nicht-infektiösen Mikroorganismen verwendet wurden. In einer kürzlich publizierten Studie wurden Abwasserproben mit der Universalnuklease vorbehandelt, wodurch vollständig freie SARS-CoV-2-RNA abgebaut wurde (MONTEIRO et al. 2022). In Vorversuchen wurden Abwasserproben mit hitzeinaktiviertem PEDV versetzt und mit der Universalnuklease vorbehandelt. Hierbei wurde eine Reduktion des PCR-Signals, aber nicht das erwartete Ausbleiben eines Amplifikationssignals erreicht. Der Unterschied zwischen den Proben war

die virale Ausgangskonzentration. Die mit inaktiviertem PEDV angereicherten Abwasserproben lagen bei einem Ct-Wert <25 , während die SARS-CoV-2-RNA-beihaltenden Abwasserproben Ct-Werte >30 und damit einen circa 100-fach niedrigeren Virustiter aufwiesen. MONTEIRO et al. (2022) nutzten eine Konzentration von 50 U der Universalnuklease zur Vorbehandlung der Proben. Diese Konzentration scheint daher für eine hohe Viruslast ungenügend zu sein. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Konzentration von 1500 U verwendet, um auch bei hohen Viruskonzentrationen gute Ergebnisse zu erzielen.

In einer weiteren Studie wurde durch den Einsatz der Benzonase erfolgreich die DNA toter Bakterien eliminiert, so dass anschließend nur die lebendigen Bakterien auf der Haut sequenziert wurden (AMAR et al. 2021). Der Einsatz der Benzonase wurde auch zur Unterscheidung von infektiösen und inaktivierten humanen Rota- und Noroviren getestet (ORISTO et al. 2018). Als Probenmatrix wurden sowohl Zellkulturmedium als auch Fäkalproben verwendet. Jedoch wurde die RNA inaktiverter Viren nicht vollständig abgebaut. Das Ergebnis der Fäkalproben war besser als mit dem Zellkulturmedium. Daher vermutet der Autor einen Inhibitor in der Zellkulturmatrix, welchen er jedoch nicht näher benennt und wozu auch keine weiteren Untersuchungen durchgeführt wurden (ORISTO et al. 2018).

Außerdem stellte der Autor fest, dass die Probeninaktivierung durch Hitze zu einem Genomabbau der Noroviren führte und infolge die Ergebnisse mit Benzonasenvorbehandlung verzerrte. Er weist darauf hin, dass der Einfluss anderer Inaktivierungsmethoden auf die Benzonasenvorbehandlung ebenfalls untersucht werden sollte (ORISTO et al. 2018).

Als weitere Methode für die Bestimmung der Virusinfektiosität wurde der Farbstoff PMA an freier RNA von FCoV getestet. Die Kombination eines Farbstoffs und der PCR wurde Anfang des 21. Jahrhunderts als eine schnelle und sensitive Alternative zur mikroskopischen oder durchflusszytometrischen Lebend-Tot-Differenzierung vorgestellt. Die ersten Versuche wurden mit Ethidiummonoazid-Bromid (EMA) durchgeführt (NOGVA et al. 2003). Jedoch fanden NOCKER and CAMPER (2006) heraus, dass die Vorbehandlung auch zu einer circa 60%-igen Reduktion der lebensfähigen Zellen führte. Aufgrund dieser unzureichenden Lebend-Tot-Differenzierung wurde EMA mit PMA verglichen und als eine vielversprechende Alternative festgehalten (NOCKER et al. 2006).

Die ersten Studien beschäftigten sich zunächst mit der Differenzierung von Bakterienzellen. Die Effizienz der Farbstoffe hängt bei Bakterien von der äußeren Zellstruktur ab. Während bei gramnegativen Bakterien die äußere Membran die wichtigste Permeabilitätsbarriere darstellt,

besitzen grampositive Bakterien als Barriere noch eine Peptidoglykanschicht (NOGVA et al. 2003). Dieser Strukturunterschied ermöglicht PMA ein vereinfachtes Eindringen in membranbeschädigte gramnegative Bakterien. Bei grampositiven Bakterien wurde hingegen beobachtet, dass tote Zellen fälschlicherweise detektiert wurden (ELIZQUÍVEL et al. 2014). Die erfolgreiche Anwendung der Farbstoffe an Viren kann ebenfalls eine schnelle und sensitive Methode zur Quantifizierung infektiöser Viren darstellen, da die bisherige Methode der Zellkultur langwierig und aufwendig ist und viele Viren sogar gar nicht kultivierbar sind (GRAIVER et al. 2010).

Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit lediglich eine 2,3-fache Reduktion des RT-RAA-Signals durch die Vorbehandlung freier FCoV-RNA mit PMA und nicht die vollständige Elimination erreicht. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien, die EMA oder PMA an Viren testeten, erzielt (GRAIVER et al. 2010, ELIZQUÍVEL et al. 2014). Es wurden verschiedene Gründe für die Unzuverlässigkeit diskutiert. Zum einen bindet PMA vorzugsweise an doppelsträngiger DNA und nicht einzelsträngiger RNA (ESCUDERO-ABARCA et al. 2014). Die Reaktionsbedingungen wie der pH-Wert oder die Salzkonzentration der Probe spielen ebenfalls eine wichtige Rolle (ELIZQUÍVEL et al. 2014). Zum Beispiel wird die Bindung an Nukleinsäuren durch eine erhöhte Salzkonzentration beeinflusst. Ursache dafür kann eine konkurrierende Bindung an die negativ geladene Nukleinsäure durch positiv geladene Natriumionen und den positiv geladenen Farbstoff sein (FITIPALDI et al. 2012). Dabei reagiert RNA empfindlicher auf die Zugabe von Salzen als DNA. Speziell Magnesium-Ionen verringern die Wechselwirkung (WARING 1965).

Eine weitere Ursache für falsch-positive Ergebnisse können variierende Inkubationsbedingungen in der Dunkelheit darstellen. Diese Phase dient der Aufnahme des Farbstoffs in die geschädigten Mikroorganismen. Die Inkubationszeiten in der Literatur variieren von 5 min bis 60 min (GRAIVER et al. 2010, ESCUDERO-ABARCA et al. 2014, RANDAZZO et al. 2016). Laut Literatur reichen 5 min häufig aus, jedoch scheint es von der Art des Mikroorganismus abzuhängen (FITIPALDI et al. 2012). So wurde für Hefen, die typischerweise in Wein vorkommen, eine optimale Inkubationszeit von 10 min festgestellt (ANDORRÀ et al. 2010).

Die Temperatur während der Inkubationszeit hat ebenfalls einen Einfluss auf die Aufnahme des Farbstoffs in den Mikroorganismus. Die meisten Studien nutzen Raumtemperatur. Einige Studien erzielten speziell mit EMA gute Ergebnisse bei geringen Temperaturen von 4 °C, was

wahrscheinlich auf die temperaturabhängige Membranfluidität zurückzuführen ist. Dies könnte die Lebend-Tot-Differenzierung von EMA verbessern, da die Ansammlung von EMA in lebensfähigen Zellen, welche zu falsch-negativen Ergebnissen führt, reduziert wird (FITTIPALDI et al. 2012).

Der nächste Schritt, die Photoaktivierung, führt zur kovalenten Bindung an die Nukleinsäuren und benötigt eine Lichtquelle, die Licht in einem Wellenlängenbereich von 460 nm bis 470 nm emittiert. Anfangs wurde auf Halogenlampen zurückgegriffen, jedoch haben sich inzwischen Leuchtdioden (LEDs) durchgesetzt, da diese den Vorteil besitzen, keine Hitze zu produzieren. Bisher wurden in den Studien verschiedene Leuchtquellen eingesetzt, die unterschiedliche Lichtspektren besitzen und Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren. Dies führt dazu, dass es in der Literatur keine definierte Belichtungszeit gibt, sondern diese von 2 min bis 20 min variiert (FITTIPALDI et al. 2012). Dies kann Auswirkungen auf die Zuverlässigkeit der Photoaktivierung haben.

Ein weiterer Grund für die unzuverlässige Wirkung der Farbstoffe liegt Studien zufolge an der Länge des zu amplifizierenden Zielgens (FITTIPALDI et al. 2012). Die Bindung des Farbstoffs führt zur DNA-Fragmentierung (SOEJIMA et al. 2007). Jede Modifikation des Zielgens verursacht die Unterdrückung der Amplifikation. Je länger das Amplikon, desto mehr Spaltstellen treten auf und desto stärker wird das Amplifikationssignal unterdrückt (SOEJIMA et al. 2008, FITTIPALDI et al. 2012). Die real-time PCR zielt in der Regel auf kurze Genabschnitte (<200 bp) ab, da die Sensitivität durch lange Amplikons abnimmt. Auch in dieser Studie umfasste das RT-RAA-Produkt nur 179 bp. Eine Studie, die den Einfluss der Länge des Amplifikationsfragments auf eine PMA-real-time PCR untersucht, zeigt, dass erst eine Amplikonlänge von 417 bp zur Suppression der DNA toter Zellen führt (MARTIN et al. 2013). In dieser Arbeit wurden die Proben durch den Einsatz von Luftreinigern inaktiviert, die mit UV-C-Technologie arbeiten. Die anschließende Behandlung der Proben erfolgte aus einer Kombination aus Universalnuklease und Mischung aus zwei RNasen (RNase A und RNase T1). Die Enzyme haben erfolgreich die freien Nukleinsäuren der durch UV-Licht inaktivierten Viren abgebaut. UV-C-Strahlung richtet sich in erster Linie gegen das virale Genom, da speziell Pyrimidinbasen UV-Strahlen absorbieren (NUANUALSUWAN and CLIVER 2002). Jedoch kann die Strahlung zu Konformationsänderungen des Viruskapsids führen (WETZ et al. 1983). In einer Studie über die Kapsidfunktionen von inaktivierten humanen Picornaviren und Felinem Calicivirus wurde festgestellt, dass bereits eine Dosis $\leq 1250 \text{ J/m}^2$ ausreichte, um das Kapsid zu

attackieren und die Viren empfindlich gegenüber RNasen in Verbindung mit Proteinase K zu machen (NUANUALSUWAN and CLIVER 2003). WETZ et al. (1983) konnten ebenfalls die Empfindlichkeit der Viruspartikel gegenüber RNasen nach einer UV-Bestrahlung mit einer Dosis von 288 J/m² nachweisen.

In früheren Studien wurde vor allem RNase A zum Abbau freier Nukleinsäuren genutzt, um eine Unterscheidung infektiöser und inaktivierter Viren zu ermöglichen (RÖNNQVIST et al. 2014, MONTEIRO and SANTOS 2018, ORISTO et al. 2018). Der alleinige Gebrauch von RNase erzielte jedoch unzureichende Ergebnisse, da ein Teil der freien Nukleinsäuren nicht abgebaut wurde. Dadurch würde die tatsächliche Menge infektiöser Viren überschätzt werden. ORISTO et al. (2018) nannten als mögliche Einflussfaktoren die Viruskonzentration, die Probenmatrix als auch die Art der RNase. Zum Beispiel erzielten sie mit Kotproben bessere Ergebnisse als mit Zellkulturproben, wofür jedoch keine Erklärung aufgezeigt wurde (ORISTO et al. 2018).

Um die Effizienz der Luftreiniger zu testen, wurde Felines Coronavirus (FCoV) als Surrogat für SARS-CoV-2 verwendet. Da von SARS-CoV-2 eine Gesundheitsgefährdung ausgeht und zudem ein Hochsicherheitslabor (Biosicherheitsstufe 3) benötigt wird, wurde bereits in anderen Studien FCoV als Surrogat genutzt (CAMERO et al. 2021, SILLER et al. 2021, TERIO et al. 2021). Die Arbeit mit FCoV verlangt lediglich ein Biosicherheitsstufe 2-Labor (ROMEO et al. 2022). Wie auch SARS-CoV-2 gehört FCoV taxonomisch zur Subfamilie *Orthocoronavirinae* (DE GROOT et al. 2011). Es wird der Gattung *Alphacoronavirus* zugeordnet (HASÖKSÜZ et al. 2020). Da Mitglieder der Familie der *Coronaviridae* über die gleichen zwei Hüllproteine (Spike-Protein und Membran-Glykoprotein) verfügen und sie auch alle Ähnlichkeiten in ihrer Größe besitzen, ist FCoV ein geeignetes Surrogatvirus für SARS-CoV-2 (DE GROOT et al. 2011). FCoV unterteilt sich in Serotyp I und Serotyp II. In dieser Arbeit wurde ein Virus des Serotyps II verwendet, der sich sehr gut in Zellkultur anzüchten lässt (PEDERSEN et al. 1984).

Der Einsatz von UV-C-Strahlung zur Luftdesinfektion erwies sich in dieser Studie als eine geeignete Methode, da eine Reduktionsrate von 100% erzielt wurde. In der praktischen Anwendung sollte die UV-C-Einheit mit einem Grobstaubfilter kombiniert werden, da sich ablagernder Staub negativ auf die Effektivität der UV-C-Quelle auswirken kann (EISENLÖFFEL et al. 2019). Der Einbau von UV-Filtern in Tierställen könnte eine etwas kostengünstigere Alternative zu den HEPA-Filtern darstellen, um die Luftqualität für Mensch und Tier zu verbessern.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Studie ein vielversprechendes Protokoll hervorgebracht hat, um infektiöse von geschädigten Viren zu unterscheiden. Durch die Kombination der Nukleasen mit molekularen Nachweismethoden wie der real-time PCR oder RAA kann die Wirksamkeitsprüfung von Luftreinigern stark beschleunigt werden. Gerade in Zeiten einer Pandemie kann dieses Protokoll somit einen wichtigen Beitrag zum effektiven Einsatz präventiver Schutzmaßnahmen leisten.

Zusammenfassung

Finja Rausch

Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit von UV-C-basierten Luftreinigern mithilfe molekularer Techniken

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Januar 2023

46 Seiten, 5 Abbildungen, 113 Literaturangaben, 1 Publikation

Schlüsselwörter: Luftreiniger; Propidiummonoazid, Nukleasen; Polymerasekettenreaktion; Rekombinase-basierte Amplifikation; Infektiosität; Felines Coronavirus

Einleitung: Die Bedeutung von Luftreinigern hat in den letzten Jahren zugenommen, insbesondere durch die COVID-19-Pandemie. Die Wirksamkeitsprüfung von Luftreinigern unterliegt bestimmten Standards und erfolgt unter Laborbedingungen. Nach der Luftreinigung müssen die gesammelten Luftproben auf ihre Restinfektiosität getestet werden. Dafür werden in der Regel zeitaufwendige Zellkultursysteme verwendet. Durch Kombination von Nukleasen mit molekularen Nachweismethoden wie der Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Rekombinase-basierte Amplifikation (RAA) können innerhalb von Stunden Ergebnisse erzielt werden, die eine Unterscheidung von infektiösen und geschädigten Viruspartikeln ermöglichen.

Ziel der Untersuchung: Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Protokoll zu entwickeln, das die Wirksamkeitsprüfung von Luftreinigern bei gleichbleibender Sensitivität beschleunigt, indem es zwischen Nukleinsäuren infektiöser Felines Coronaviren (FCoV) und geschädigter FCoV unterscheidet.

Material und Methoden: Zwei verschiedene Techniken, um freie Nukleinsäuren vor der Extraktion zu beseitigen, wurden miteinander verglichen. Als molekulare Nachweismethoden dienten die real-time Reverse Transkription (RT-)PCR und RT-RAA. Freie Ribonukleinsäure

(RNA) von FCoV wurde mit Propidiummonoazid (PMA) bzw. einer Universalnuklease vorbehandelt. Aufgrund der geringen Leistungsfähigkeit des PMA wurden weitere Experimente sowohl mit ausschließlich intakten Viren als auch mit einer Kombination aus intakten Viren und freier RNA unter alleiniger Verwendung der Universalnuklease durchgeführt. Schließlich erfolgte die Prüfung zweier UV-C-Luftreiniger im Luftfilterprüfstand. Es wurden Proben vor und nach der Luftreinigung gesammelt und mit einer Kombination aus Universalnuklease und RNasen vorbehandelt. Die Ergebnisse wurden mit dem Standard-Infektiositätstest basierend auf der Bestimmung der 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) verglichen.

Ergebnisse: Die Universalnuklease baute die freie RNA sowohl in den Proben, die nur freie RNA, als auch in Proben, die eine Kombination aus intakten Viren und freier RNA enthielten, vollständig ab. Bei der Vorbehandlung freier RNA mit PMA wurde dagegen lediglich eine 2,3-fache Reduktion der Nukleinsäuremenge erzielt. Die UV-C-Luftreiniger führten zu einer 100%-igen Reduktionsrate für FCoV; die Vorbehandlung der Proben nach Luftreinigung mit dem Enzymgemisch führten zu keinem Nachweissignal sowohl in der RT-PCR als auch in der RT-RAA. Das Ergebnis wurde mit der Zellkultur bestätigt.

Schlussfolgerung: Ein Protokoll, das auf der Kombination von Nukleasen mit einer molekularen Nachweismethode basiert, wurde zur Unterscheidung zwischen infektiösen und nicht-infektiösen Viruspartikeln entwickelt. Die Methode verkürzt die benötigte Zeit für eine Wirksamkeitsprüfung von Luftreinigern und kann dadurch einen wertvollen Beitrag zum schnellen und effektiven Einsatz von Präventionsmaßnahmen zum Schutz vor aerogen übertragbaren Infektionserregern leisten.

Summary

Finja Rausch

Investigations into the virucidal efficacy of UV-C-based air purifiers using molecular techniques

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in January 2023

46 pages, 5 figures, 113 references, 1 publication

Keywords: air purifier; propidium monoazide, nucleases; polymerase chain reaction; recombinase-aided amplification; infectivity; Feline Coronavirus

Introduction: The importance of air purifiers has increased in recent years, especially due to the COVID 19 pandemic. The efficacy testing of air purifiers is subject to certain standards and is carried out under laboratory conditions. After air purification, the collected air samples must be tested for residual infectivity. Time-consuming cell culture systems are usually used for this. By combining nucleases with molecular detection methods such as the polymerase chain reaction (PCR) or recombinase-aided amplification (RAA), results can be obtained within hours that allow infectious and distorted virus particles to be distinguished.

Objective: The aim of the present study was to develop a protocol that speeds up the efficacy testing of air purifiers while maintaining sensitivity by distinguishing between nucleic acids of infectious feline coronaviruses (FCoV) and distorted FCoV.

Material and Methods: Two different techniques to remove free nucleic acids before extraction were compared. Real-time reverse transcription (RT-)PCR and RT-RAA served as molecular detection methods. Free ribonucleic acid (RNA) of FCoV was pretreated with propidium monoazide (PMA) or universal nuclease. Due to the low performance of the PMA, further experiments were carried out both on exclusively intact viruses and on a combination of intact viruses and free RNA using only the universal nuclease. Finally, two UV-C air purifiers

were tested in the air purifier testing cabinet. Samples were collected before and after air purification and pretreated with a combination of universal nuclease and RNases. The results were compared with the standard infectivity assay based on the calculation of the 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀).

Results: The universal nuclease completely degraded the free RNA both in the samples containing only free RNA and in samples containing a combination of intact viruses and free RNA. In contrast, pretreatment of free RNA with PMA only achieved a 2.3-fold reduction in the amount of nucleic acid. The UV-C air purifiers resulted in a reduction rate of 100% for FCoV; pre-treatment of the samples after air purification with the enzyme mixture resulted in no detection signal in both RT-PCR and RT-RAA. The result was confirmed on cell culture.

Conclusion: A protocol based on the combination of nucleases with a molecular detection method was developed to distinguish between infectious and non-infectious virus particles. The method speeds up the efficacy testing of air purifiers and can contribute valuably to the rapid and effective use of preventive measures to protect against airborne infectious agents.

Literaturverzeichnis

Abd El Wahed A, El-Deeb A, El-Tholoth M, Abd El Kader H, Ahmed A, Hassan S, Hoffmann B, Haas B, Shalaby MA, Hufert FT and Weidmann M. A Portable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71642.

Afshari A, Ekberg L, Forejt L, Mo J, Rahimi S, Siegel J, Chen W, Wargocki P, Zurami S and Zhang J. Electrostatic Precipitators as an Indoor Air Cleaner—A Literature Review. *Sustainability*. 2020; 12(21): 8774.

Alonso C, Murtaugh MP, Dee SA and Davies PR. Epidemiological study of air filtration systems for preventing PRRSV infection in large sow herds. *Prev Vet Med*. 2013; 112(1): 109-117.

Amar Y, Lagkouvardos I, Silva RL, Ishola OA, Foessel BU, Kublik S, Schöler A, Niedermeier S, Bleuel R, Zink A, Neuhaus K, Schloter M, Biedermann T and Köberle M. Pre-digest of unprotected DNA by Benzonase improves the representation of living skin bacteria and efficiently depletes host DNA. *Microbiome*. 2021; 9(1): 123.

Amer A, Siti Suri A, Abdul Rahman O, Mohd HB, Faruku B, Saeed S and Tengku Azmi TI. Isolation and molecular characterization of type I and type II feline coronavirus in Malaysia. *Virol J*. 2012; 9(1): 278.

Andorrà I, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM and Mas A. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int J Food Microbiol*. 2010; 144(2): 257-262.

Anon. Grundlagen der Filtertechnik. HS-Luftfilterbau GmbH. 2002 (zitiert am 25.08.2022): 1-48, https://www.luftfilterbau.de/cms/upload/produkte/Grundlagen/PDF/Filtertechnik_0100.pdf.

Anon. Elektrofilter - Prozessluft- und Raumluftreinigung (VDI-EE 3678 Blatt 2). Düsseldorf: VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss. 2012

Anon. Leitfaden „Ultraviolettstrahlung künstlicher Quellen“. Fachverband für Strahlenschutz e.V. Schweiz 2013 (zitiert am 25.08.2022): 1-46, https://www.fs-ev.org/fileadmin/user_upload/04_Arbeitsgruppen/08_Nichtionisierende_Strahlung/02_Dokumente/Leitfaeden/fs-05-131-aknir_uv_strahlung-1.pdf.

Anon. Elektrostatik; Teil 4-7: Standard-Prüfverfahren für spezielle Anwendungen – Ionisation (IEC 61340-4-7:2017). Berlin: VDE Verlag GmbH. 2017a

Anon. Luftfilter für die allgemeine Raumlufttechnik - Teil 1: Technische Bestimmungen, Anforderungen und Effizienzklassifizierungssystem, basierend auf dem Feinstaubabscheidegrad (ePM); (DIN EN ISO 16890-1:2017-08). Berlin: Beuth-Verlag GmbH. 2017b

Anon. Schwebstofffilter und Filtermedien zur Abscheidung von Partikeln aus der Luft - Teil 1: Klassifizierung, Leistungsprüfung, Kennzeichnung (ISO 29463-1:2017-09). Berlin: Beuth-Verlag GmbH. 2017c

Anon. Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum quantitativen kulturellen Nachweis von Bakterien in der Luft - Verfahren nach Abscheidung in Flüssigkeiten (VDI 4253 Blatt 3). Düsseldorf: VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss. 2019a

Anon. Exposition am Arbeitsplatz - Messung von luftgetragenen Mikroorganismen und mikrobiellen Bestandteilen - Allgemeine Anforderungen (DIN EN 13098:2019-12). Berlin: Beuth-Verlag GmbH. 2019b

Anon. Schwebstofffilter (EPA, HEPA und ULPA) - Teil 1: Klassifikation, Leistungsprüfung, Kennzeichnung (DIN EN 1822-1:2019-10). Berlin: Beuth-Verlag GmbH. 2019c

Anon. Informationen zum Einsatz von mobilen Luftreinigern - Auszüge aus der Expertenempfehlung VDI-EE 4300 Blatt 14. VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft. 2021a (zitiert am 20.09.2022): 1-10, https://www.vdi.de/fileadmin/pages/mein_vdi/redakteure/publikationen/Informationen_zum_Einsatz_von_mobilen_Luftreinigern.pdf.

Anon. Messen von Innenraumluftverunreinigungen - Anforderungen an mobile Luftreiniger zur Reduktion der aerosolgebundenen Übertragung von Infektionskrankheiten (VDI-EE 4300-14:2021-09). Düsseldorf: VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss. 2021b

Anon. Worldometer. Weltweite Zahl der Todesfälle in Zusammenhang mit dem Coronavirus (COVID-19) seit Januar 2020 (Stand: 4. Oktober 2022). Statista GmbH. 2022 (zitiert am 04.10.2022), <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/1103240/umfrage/entwicklung-der-weltweiten-todesfaelle-aufgrund-des-coronavirus/>.

Anthony TR, Altmaier R, Jones S, Gassman R, Park JH and Peters TM. Use of Recirculating Ventilation With Dust Filtration to Improve Wintertime Air Quality in a Swine Farrowing Room. *J Occup Environ Hyg.* 2015; 12(9): 635-646.

Bae S and Wuertz S. Discrimination of Viable and Dead Fecal *Bacteroidales* Bacteria by Quantitative PCR with Propidium Monoazide. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(9): 2940-2944.

Bartlett JMS and Stirling D. A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: JMS Bartlett and D Stirling. *PCR Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 3-6.

Camero M, Lanave G, Catella C, Lucente MS, Decaro N, Martella V and Buonavoglia C. Evaluation of virucidal activity of fabrics using feline coronavirus. *J Virol Methods.* 2021; 295: 114214.

Caron GN-v, Stephens and Badley. Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *J Appl Microbiol.* 1998; 84(6): 988-998.

Cawthorn D-M and Witthuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol.* 2008; 105(4): 1178-1185.

Charry JM and Kavet R. *Air ions: Physical and Biological Aspects.* 1. Aufl. Boca Raton: CRC Press; 1987.

Cheung TKW and Poon LLM. Biology of Influenza A Virus. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1102(1): 1-25.

Cotton CA, Owen DM, Cline GC and Brodeur TP. UV disinfection costs FOR INACTIVATING *Cryptosporidium*. *J Am Water Works Assoc.* 2001; 93(6): 82-94.

Couch RB. Viruses and indoor air pollution. *Bull N Y Acad Med.* 1981; 57(10): 907-921.

Cutler TD and Zimmerman JJ. Ultraviolet irradiation and the mechanisms underlying its inactivation of infectious agents. *Anim Health Res Rev.* 2011; 12(1): 15-23.

Daniels SL. "On the ionization of air for removal of noxious effluvia" (Air ionization of indoor environments for control of volatile and particulate contaminants with nonthermal plasmas generated by dielectric-barrier discharge). *IEEE Trans Plasma Sci.* 2002; 30(4): 1471-1481.

de Groot R, Baker S, Baric R, Enjuanes L, Gorbalenya A, Holmes K, Perlman S, Poon L, Rottier P, Talbot P, Woo P and Ziebuhr J. Coronaviridae. In: AMQ King, MJ Adams, EB Carstens and EJ Lefkowitz. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Academic Press; 2011. p. 806-828.

Dee S, Otake S, Oliveira S and Deen J. Evidence of long distance airborne transport of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Res.* 2009; 40(4): 39.

Desrosiers R. Transmission of swine pathogens: different means, different needs. *Anim Health Res Rev.* 2011; 12(1): 1-13.

DeTraglia MC, Brand JS and Tometsko AM. Characterization of azidobenzamidines as photoaffinity labels for trypsin. *J Biol Chem.* 1978; 253(6): 1846-1852.

DIN-Normenausschuss Lichttechnik F. Pressemitteilung Norm DIN/TS 67506; Effektiv Viren und Bakterien in der Raumluft eliminieren. Berlin: DIN e.V., 06.12.2021, <https://www.din.de/resource/blob/848764/66cf9f9e951803de12ed79f47abe5adb/pressemitteilung-din-ts-67506-data.pdf>.

Egenolf-Jonkmanns B. Untersuchung von Additiven zur CO₂-Hydratbildung. [Dissertation med. vet]. Bochum: Ruhr-Universität Bochum; 2015.

Eisenlöffel L, Reutter T, Horn M, Schlegel S, Truyen U and Speck S. Impact of UVC-sustained recirculating air filtration on airborne bacteria and dust in a pig facility. *PLoS One*. 2019; 14(11): e0225047.

Elizaquível P, Aznar R and Sánchez G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. *J Appl Microbiol*. 2014; 116(1): 1-13.

Erllich HA. Polymerase chain reaction. *J Clin Immunol*. 1989; 9(6): 437-447.

Escudero-Abarca BI, Rawsthorne H, Goulter RM, Suh SH and Jaykus LA. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? *Food Microbiol*. 2014; 41: 91-95.

Fittipaldi M, Codony F, Adrados B, Camper AK and Morató J. Viable real-time PCR in environmental samples: can all data be interpreted directly? *Microb Ecol*. 2011; 61(1): 7-12.

Fittipaldi M, Nocker A and Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods*. 2012; 91(2): 276-289.

Flekna G, Štefanič P, Wagner M, Smulders FJM, Možina SS and Hein I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res Microbiol*. 2007; 158(5): 405-412.

Graiver DA, Saunders SE, Topliff CL, Kelling CL and Bartelt-Hunt SL. Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *J Virol Methods*. 2010; 164(1): 51-54.

Green CF and Scarpino PV. The use of ultraviolet germicidal irradiation (UVGI) in disinfection of airborne bacteria. *Environ Eng Policy*. 2001; 3(1): 101-107.

Guzman MI. An overview of the effect of bioaerosol size in coronavirus disease 2019 transmission. *Int J Health Plann Manage*. 2021; 36(2): 257-266.

Hasöksüz M, Kilic S and Saraç F. Coronaviruses and sars-cov-2. *Turk J Med Sci*. 2020; 50(9): 549-556.

He X, Hong W, Pan X, Lu G and Wei X. SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention. *MedComm*. 2021; 2(4): 838-845.

Hematian A, Sadeghifard N, Mohebi R, Taherikalani M, Nasrolahi A, Amraei M and Ghafourian S. Traditional and Modern Cell Culture in Virus Diagnosis. *Osong Public Health Res Perspect*. 2016; 7(2): 77-82.

Hixon SC, White WE, Jr. and Yielding KL. Selective covalent binding of an ethidium analog to mitochondrial DNA with production of petite mutants in yeast by photoaffinity labelling. *J Mol Biol*. 1975; 92(2): 319-329.

Holzapfel B and Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol Unserer Zeit*. 2007; 37(2): 120-126.

Jedrzejczak-Silicka M. History of cell culture. In: SJT Gowder. *New insights into cell culture technology*. London: IntechOpen; 2017. p. 1-41.

Joshi M and Deshpande J. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int J Biomed Res*. 2010; 2(1): 81-97.

Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR and Barer MR. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1998; 73(2): 169-187.

Klein PG and Juneja VK. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol*. 1997; 63(11): 4441-4448.

Kobayashi H, Oethinger M, Tuohy MJ, Hall GS and Bauer TW. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by ethidium bromide monoazide. *Lett Appl Microbiol*. 2009; 48(5): 633-638.

La A, Zhang Q, Levin DB and Coombs KM. The Effectiveness of Air Ionization in Reducing Bioaerosols and Airborne PRRS Virus in a Ventilated Space. *Trans ASABE*. 2019; 62(5): 1299-1314.

Lau A, Vizcarra A, Lo K and Luymes J. Recirculation of filtered air in pig barns. *Can Agric Eng*. 1996; 38: 297-304.

Legg R. Chapter 12 - Air Filters. In: R Legg. *Air Conditioning System Design*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 2017. p. 213-223.

Leland DS and Ginocchio CC. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20(1): 49-78.

Li J, Macdonald J and von Stetten F. Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *Analyst*. 2019; 144(1): 31-67.

Liu G, Xiao M, Zhang X, Gal C, Chen X, Liu L, Pan S, Wu J, Tang L and Clements-Croome D. A review of air filtration technologies for sustainable and healthy building ventilation. *Sustain Cities Soc*. 2017; 32: 375-396.

Martin B, Raurich S, Garriga M and Aymerich T. Effect of Amplicon Length in Propidium Monoazide Quantitative PCR for the Enumeration of Viable Cells of *Salmonella* in Cooked Ham. *Food Anal Methods*. 2013; 6.

Miller MD, Tanner J, Alpaugh M, Benedik MJ and Krause KL. 2.1 A structure of *Serratia* endonuclease suggests a mechanism for binding to double-stranded DNA. *Nat Struct Biol*. 1994; 1(7): 461-468.

Mizuno A. Electrostatic precipitation. *IEEE Trans Dielectr Electr Insul.* 2000; 7(5): 615-624.

Monteiro S, Rente D, Cunha MV, Marques TA, Cardoso E, Vilaça J, Coelho N, Brôco N, Carvalho M and Santos R. Discrimination and surveillance of infectious severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 in wastewater using cell culture and RT-qPCR. *Sci Total Environ.* 2022; 815: 152914.

Monteiro S and Santos R. Enzymatic and viability RT-qPCR assays for evaluation of enterovirus, hepatitis A virus and norovirus inactivation: Implications for public health risk assessment. *J Appl Microbiol.* 2018; 124(4): 965-976.

Mullenders LHF. Solar UV damage to cellular DNA: from mechanisms to biological effects. *Photochem Photobiol Sci.* 2018; 17(12): 1842-1852.

Murchison EP. RNAases. In: S Maloy and K Hughes. *Brenner's Encyclopedia of Genetics.* 2. Aufl. San Diego: Academic Press; 2013. p. 270.

Nebe-von-Caron G, Stephens PJ, Hewitt CJ, Powell JR and Badley RA. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J Microbiol Methods.* 2000; 42(1): 97-114.

Nestle M and Roberts WK. An Extracellular Nuclease from *Serratia marcescens*: I. Purification and some properties of the enzyme. *J Biol Chem.* 1969; 244(19): 5213-5218.

Nichols NM and Yue D. Ribonucleases. *Curr Protoc Mol Biol.* 2008; 84(1): 3.13.11-13.13.18.

Nocker A and Camper AK. Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72(3): 1997-2004.

Nocker A, Cheung CY and Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods.* 2006; 67(2): 310-320.

Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK and Brousseau R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods.* 2009; 76(3): 253-261.

Nocker A, Sossa-Fernandez P, Burr MD and Camper AK. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73(16): 5111-5117.

Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H and Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques.* 2003; 34(4): 804-808, 810, 812-803.

Nuanualsuwan S and Cliver DO. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *J Virol Methods.* 2002; 104(2): 217-225.

Nuanualsuwan S and Cliver DO. Capsid Functions of Inactivated Human Picornaviruses and Feline Calicivirus. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(1): 350-357.

Núñez A, Amo de Paz G, Rastrojo A, García Ruiz AM, Alcamí A, Gutiérrez-Bustillo AM and Moreno Gómez DA. Monitoring of airborne biological particles in outdoor atmosphere. Part 1: Importance, variability and ratios. *Int Microbiol.* 2016; 19(1): 1-13.

Oristo S, Lee HJ and Maunula L. Performance of pre-RT-qPCR treatments to discriminate infectious human rotaviruses and noroviruses from heat-inactivated viruses: applications of PMA/PMA xx, benzonase and RN ase. *J Appl Microbiol.* 2018; 124(4): 1008-1016.

Parshionikar S, Laseke I and Fout GS. Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR To Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76(13): 4318-4326.

Pedersen NC, Black JW, Boyle JF, Evermann JF, McKeirnan AJ and Ott RL. Pathogenic differences between various feline coronavirus isolates. *Adv Exp Med Biol.* 1984; 173: 365-380.

Pitkin A, Deen J and Dee S. Use of a production region model to assess the airborne spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 2009; 136(1-2): 1-7.

Pushpawela B, Jayaratne R, Nguy A and Morawska L. Efficiency of ionizers in removing airborne particles in indoor environments. *J Electrostatics.* 2017; 90: 79-84.

Randazzo W, López-Gálvez F, Allende A, Aznar R and Sánchez G. Evaluation of viability PCR performance for assessing norovirus infectivity in fresh-cut vegetables and irrigation water. *Int J Food Microbiol.* 2016; 229: 1-6.

Reed NG. The history of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. *Public Health Rep.* 2010; 125(1): 15-27.

Richards FM and Wyckoff HW. Bovine Pancreatic Ribonuclease. In: PD Boyer. *The Enzymes.* New York und London: Academic Press; 1971. p. 647-806.

Ritz CW, Mitchell BW, Fairchild BD, Czarick M and Worley JW. Improving In-House Air Quality in Broiler Production Facilities Using an Electrostatic Space Charge System. *J Appl Poult Res.* 2006; 15(2): 333-340.

Romeo A, Iacovelli F, Scagnolari C, Scordio M, Frasca F, Condò R, Ammendola S, Gaziano R, Anselmi M, Divizia M and Falconi M. Potential Use of Tea Tree Oil as a Disinfectant Agent against Coronaviruses: A Combined Experimental and Simulation Study. *Molecules.* 2022; 27(12): 3786.

Rönnqvist M, Mikkilä A, Tuominen P, Salo S and Maunula L. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the Persistence of Noroviruses Even When Combined with Pre-PCR Treatments. *Food Environ Virol.* 2014; 6(1): 48-57.

Rudi K, Moen B, Drømtorp SM and Holck AL. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(2): 1018-1024.

Schielke A, Filter M, Appel B and Johne R. Thermal stability of hepatitis E virus assessed by a molecular biological approach. *Virol J.* 2011; 8(1): 487.

Schochetman G, Ou C-Y and Jones WK. Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis.* 1988; 158(6): 1154-1157.

Schulz J, Bao E, Clauss M and Hartung J. The potential of a new air cleaner to reduce airborne microorganisms in pig house air: preliminary results. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2013; 126(3-4): 143-148.

Sheridan GEC, Masters CI, Shallcross JA and Mackey BM. Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an Indicator of Viability in *Escherichia coli* Cells. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(4): 1313-1318.

Siller P, Reissner J, Hansen S, Kühl M, Bartel A, Schmelzeisen D, Gries T, Roesler U and Friese A. Innovative Textiles Used in Face Masks: Filtration Efficiency and Self-Disinfecting Properties against Coronaviruses. *Nanomaterials.* 2021; 11(8): 2088.

Soejima T, Iida K-i, Qin T, Taniai H, Seki M, Takade A and Yoshida S-i. Photoactivated Ethidium Monoazide Directly Cleaves Bacterial DNA and Is Applied to PCR for Discrimination of Live and Dead Bacteria. *Microbiol Immunol.* 2007; 51(8): 763-775.

Soejima T, Iida K-i, Qin T, Taniai H, Seki M and Yoshida S-i. Method To Detect Only Live Bacteria during PCR Amplification. *J Clin Microbiol.* 2008; 46(7): 2305-2313.

Spronk G, Otake S and Dee S. Prevention of PRRSV infection in large breeding herds using air filtration. *Vet Rec.* 2010; 166(24): 758.

Struhl K. Ribonucleases. *Curr Protoc Mol Biol.* 1989; 8(1): 3.13.11-13.13.13.

Terio V, Lorusso P, Castrica M, Pandiscia A, Miraglia D, Balzaretta CM, Tantillo G and Decaro N. Survival of a SARS-CoV-2 Surrogate on Flow-Pack Polyethylene and Polystyrene Food Trays at Refrigeration and Room Temperature Conditions. *Appl Sci.* 2021; 11(9): 3977.

Vasilyak L. Physical methods of disinfection (a review). *Plasma Phys Rep.* 2021; 47(3): 318-327.

Waring MJ. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol.* 1965; 13(1): 269-282.

Wenke C. Integration von Zu- und Umluftfiltration in der Schweinehaltung zur Reduzierung der Belastung mit Krankheitserregern. [Dissertation med. vet.]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2019.

Wenke C, Pospiech J, Reutter T, Altmann B, Truyen U and Speck S. Impact of different supply air and recirculating air filtration systems on stable climate, animal health, and performance of fattening pigs in a commercial pig farm. *PLoS One*. 2018; 13(3): e0194641.

Wetz K, Zeichhardt H, Willingmann P and Habermehl K-O. Dense Particles and Slow Sedimenting Particles Produced by Ultraviolet Irradiation of Poliovirus. *J Gen Virol*. 1983; 64(6): 1263-1275.

White TJ, Arnheim N and Erlich HA. The polymerase chain reaction. *Trends Genet*. 1989; 5: 185-189.

Zhang Q and Jenkins PL. Evaluation of ozone emissions and exposures from consumer products and home appliances. *Indoor Air*. 2017; 27(2): 386-397.

Zhao B, Liu Y and Chen C. Air purifiers: A supplementary measure to remove airborne SARS-CoV-2. *Build Environ*. 2020; 177: 106918.

Zhao Y, Chai L, Richardson B and Xin H. Field Evaluation of an Electrostatic Air Filtration System for Reducing Incoming Particulate Matter of a Hen House. *Trans ASABE*. 2018; 61(1): 295-304.

Zhao Y, Richardson B, Takle E, Chai L, Schmitt D and Xin H. Airborne transmission may have played a role in the spread of 2015 highly pathogenic avian influenza outbreaks in the United States. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 11755.

Zhu Y, Li M, Chen W and Peters A. The smart solution for DNA removal in biopharmaceutical production by benzonase endonuclease. *J Appl Virol*. 2013; 2: 25-33.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung des Themas und die tolle Betreuung bedanken.

Weiterhin danke ich Dr. Ahmed Abd El Wahed für die Unterstützung in der Planung und Durchführung des Projektes.

Herzlicher Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, die mich stets ermunterten und bei Problemen halfen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für das stets offene Ohr und die mentale Unterstützung bedanken.