

Abschlussbericht zum Vorhaben
„Entwicklung und Evaluierung eines
Prüfstandards für die Wirksamkeit
von Luftreinigern zur Reduktion der
Virenfracht in Innenraumluft“
(FP0469)

Laufzeit

01.11.2021 – 29.02.2024

Berichtszeitraum

01.11.2021 – 29.02.2024

Bericht vom 29.06.2024

Dr. Annette Clauß

PD Dr. Jochen Schulz

M. Sc. Vivian Natascha Lochte



Kurzfassung

Die Standardisierung von Prüfverfahren ist im Bereich des Arbeitsschutzes entscheidend, um die Einhaltung von Sicherheitsnormen zu überwachen und Gesundheitsrisiken genau zu bewerten sowie geeignete Schutzmaßnahmen zu ergreifen. Da es in Deutschland keine einheitlichen Prüfstandards für die Wirksamkeit von Luftreinigern gegen luftgetragene Pathogene, insbesondere Viren, gibt, besteht Bedarf an einem Standardverfahren. Dieses Verfahren soll verschiedene Technologien umfassen und auch Nebenprodukte sowie arbeitsschutzrelevante Parameter berücksichtigen.

In einem Forschungsvorhaben, das das Fraunhofer WKI, Fachbereich Materialanalytik und Innenluftchemie, in Kooperation mit dem Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchführt hat, wurde eine entsprechende Prüfmethodik für mobile Luftreiniger entwickelt und anhand verschiedener Gerätetypen evaluiert. Die Prüfung der Reinigungsleistung eines Geräts unter definierten Randparametern basiert auf einem Emissionsprüfkammerverfahren. Für den Nachweis kultivierbarer Viren und Viren-RNA in der Prüfkammerluft wird ein Impingement-Verfahren eingesetzt. Für die Messung von Viruslasten in Prüfkanälen werden ebenfalls Probenahmeverfahren beschrieben.

Abstract

Standardization of test methods is essential in the field of occupational health and safety to monitor compliance with safety standards and to accurately assess health risks and take appropriate protective measures. Since there are no uniform test standards in Germany for the effectiveness of air purifiers against airborne pathogens, especially viruses, there is a need for a standard procedure. This procedure should cover different technologies and also take into account by-products and parameters relevant to occupational health and safety.

In a research project of the Fraunhofer WKI, Department for Material Analysis and Indoor Air Chemistry, in cooperation with the Institute for Animal Hygiene, Animal Welfare and Animal Ethology of the University of Veterinary Medicine Hannover (Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover), a test method for mobile air purifiers was developed and evaluated using different types of devices. The testing of the cleaning performance of a device under defined boundary parameters is based on an emission test chamber method. An impingement method is used to detect cultivable viruses and viral RNA in the test chamber air. Sampling methods are also described for measuring viral loads in test channels.

Inhalt

Kurzfassung	2
Abstract	2
Abkürzungsverzeichnis	4
1. Einführung	6
1.1. Stand der Wissenschaft und Technik	7
1.1.1. Luftgetragene Viruspartikel	7
1.1.2. Funktionsweisen von Luftreinigungsgeräten	8
1.1.3. Bewertungsgrundlagen für die Effektivität von Luftreinigern	9
2. Vorhabenziele	10
3. Arbeitsplan	10
4. Ausführliche Darstellung der durchgeführten Forschungsarbeiten und Ergebnisse	12
4.1. Prüfkammer	12
4.2. Prüfkanal	14
4.3. Auswahl von Luftreinigungsgeräten	15
4.4. Surrogate - Prüforganismen	18
4.4.1. Auswahl der Surrogate	18
4.4.2. Herstellung der Suspension	18
4.4.3. Einsatz der Suspensionen	18
4.5. Prüfbioaerosol-Herstellung	21
4.6. Sammel- und Nachweisverfahren (AP 3)	24
4.6.1. Probenahme in der Prüfkammer	25
4.6.2. Probenahme im Prüfkanal	30
4.7. Emissionsprüfungen	35
4.7.1. Ozon	36
4.7.2. Stickoxide	40
4.7.3. Zugluft	42
4.7.4. Schall	45
4.7.5. UV C-Strahlung	46
4.8. Bewertungsmaßstab für Virenreduktion	49
5. Ergebnisse des Gesamtvorhabens	56
8. Projektveröffentlichungen	61
Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte	62
<i>Literaturverzeichnis</i>	63
Abbildungsverzeichnis	67
10. Anhang	69
<i>Prüfbericht Messung UV C Strahlung am Prüfstand der BG ETEM</i>	69

Abkürzungsverzeichnis

ACGIH	American Conference of Governmental Industrial Hygienists
AGI30	All-Glass-Impinger (Abstand Boden – kritische Düse: 30 mm)
AGW	Arbeitsplatzgrenzwert
AHAM	Association of Home Appliance Manufacturers
AP	Arbeitspaket
ASR	Arbeitsstättenregel
ASTM	American Society for Testing and Materials
BSA	bovines Serumalbumin
BG ETEM	Berufsgenossenschaft Energie Textil Elektro Medienerzeugnisse
BImSchV	Bundes-Immissionsschutzverordnung
CADR	Clean Air Delivery Rate
CARm	Clean Air Delivery Rate for microbial pollutants
CFM	Cubic Feet per Minute
CFU	Colony Forming Units
COVID 19	Coronavirus Disease 2019
CPD	CyclobutanPyrimidin-Dimer
dB	Dezibel
DGUV	Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung
DIN	Deutsches Institut für Normung
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (und Zellkulturen)
EE	Expertenempfehlung
EN	Europäische Norm
FP	Feinpartike
FMPS	Fast Mobility Particle Sizer
FNL	DIN-Normenausschuss Lichttechnik
GSP	Gesamtschwebstoffprobenahme
H13	HEPA-Filter Klasse 13
H14	HEPA-Filter Klasse 14
HADR	Hygienic Air Delivery Rate
HEPA	High Efficiency Particulate Air
IOM	Institute of Occupational Medicine
ISO	International Organization for Standardization
ITTN	Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie
KBE	Koloniebildende Einheit
LärmVibrationsArbSchV	Lärm- und Vibrations-Arbeitsschutzverordnung
MAIC	Fachbereich Materialanalyse und Innenluftchemie
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MRR	Microbial Reduction Rate, mikrobielle Reduktionsrate
ND	Natural Decay, natürliche Abklingrate
OAF	Open Air Factor
OPS	Optical Particle Sizer
PBE	Plauebildende Einheit
PBS	Phosphate Buffered Saline (Pufferlösung)
PFU	Plaque Forming Units
ppb	Parts per Billion
ppm	Parts per Million

PTFE	Polytetrafluorethylen
rel. LF	relative Luftfeuchtigkeit
RL	Richtlinie
RLT	Raumluftechnik
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
S2	Sicherheitsstufe 2
SARS-CoV 2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SLAG	Sparging Liquid Aerosol Generator
SM(G)	Salz-Magnesium-(Gelatine)Pufferlösung
SOA	Secondary Organic Aerosol
SOP	Standard Operating Procedure
ss	single stranded, Einzelstrang-
ds	double stranded, Doppelstrang-
TA	Technische Anleitung
TRGS	Technische Regeln für Gefahrstoffe
TSB	Tryptic Soy Broth
TYG(B)	Tryptone Yeast Extract Glucose (Broth),
UFP	Ultrafeinpartikel
UV	Ultraviolett
VDI	Verein Deutscher Ingenieure

1. Einführung

Die Standardisierung von Prüfverfahren spielt, wie in vielen anderen auf Qualität, Sicherheit und Effizienz angewiesenen Branchen auch, im Bereich des Arbeitsschutzes eine wesentliche Rolle. Standardisierte Prüfverfahren stellen sicher, dass Sicherheitsausrüstung wie Helme, Schutzbrillen, Sicherheitsschuhe und andere persönliche Schutzausrüstungen den erforderlichen Vorgaben entsprechen. Die Einhaltung von Arbeitsplatzsicherheitsvorschriften und -normen kann mithilfe standardisierter Prüfverfahren leichter überwacht und nachgewiesen werden. Dies hilft auch, Unternehmen gegen rechtliche Konsequenzen abzusichern. Die standardisierte Prüfung von Arbeitsumgebungen, beispielsweise in Bezug auf Luftqualität oder Lärmbelastung, gestattet eine genauere Bewertung von Risiken für die Gesundheit der Mitarbeiter. Dies ermöglicht es Arbeitgebern, geeignete Maßnahmen zur Risikominderung zu ergreifen und die Gesundheit ihrer Belegschaft zu schützen.

Die Übertragung von atemwegsassoziierten Krankheitserregern wie SARS-CoV2 oder Influeza-Viren erfolgt hauptsächlich durch die Inhalation Erreger-haltiger Partikel, wie zahlreiche Studien belegen[1-4]. Diese Partikel gelangen beim Ausatmen, Sprechen, Husten oder Niesen einer infizierten Person in die Luft. Dabei wird die Erreger-beladene Luft mit der Umgebungsluft vermischt und rasch verdünnt. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die Verdünnung in der Außenluft groß genug, um bei ausreichendem räumlichem oder zeitlichem Abstand das Übertragungsrisiko gegenüber dem Risiko in Innenräumen deutlich zu verringern. Ob dies allein auf die starke Verdünnung oder auch auf Umwelteinflüsse (Temperatur, Luftfeuchte, Open-Air-Effekt (OAF)) zurückzuführen ist, ist noch nicht hinreichend geklärt, unterstreicht aber die Notwendigkeit, gerade vor dem Hintergrund zukünftiger Infektionsgeschehen wirksame Maßnahmen zur Senkung des Infektionsdrucks in Innenräumen zu identifizieren und weiterzuentwickeln.

Einen wesentlichen Beitrag dazu können raumlufttechnische Anlagen (RLT) und Luftreiniger leisten [5, 6]. RLT-Anlagen sind ventilatorgestützte Anlagen, die mindestens eine der Funktionen Filtern, Heizen, Kühlen, Befeuchten oder Entfeuchten bereitstellen. Je nach Raumgestaltung und bestehendem Lüftungskonzept können verschiedene Verfahren von Vorteil sein. Die Innenraumlufthygiene-Kommission (IRK) des Umweltbundesamtes (UBA) führte in ihrer Ergänzung der Stellungnahme des UBA zum Einsatz von mobilen Luftreinigern an Schulen [7] aus, dass der Einsatz mobiler Luftreiniger in Schulen sinnvoll sein kann, jedoch für viele Geräte derzeit noch keine ausreichend belastbaren erhobenen Daten vorliegen. Darüber hinaus sind bestimmte Voraussetzungen bei der Geräteauswahl und den Aufstellbedingungen zu beachten, sowie auch neben raumluftchemischen, mikrobiologischen und aerosolphysikalischen Aspekten Belange des Arbeitsschutzes zu berücksichtigen. So ist z. B. bekannt, dass falsche oder unsachgemäß betriebene Geräte sogar zu einer Anreicherung von Krankheitserregern in Innenräumen führen können [8]. Gängige Luftreinigungssysteme für Innenräume nutzen verschiedene Möglichkeiten, um die Viruskonzentration in der Raumluft zu reduzieren. Während

Maßnahmen wie Luftaustausch mit Außenluft (Verdünnung) und Filtration oder elektrostatische Abscheidung darauf abzielen, die Viruspartikelkonzentration insgesamt zu reduzieren, werden beispielsweise Ozonisierung, Ionisierung/Plasmaerzeugung oder UV-Bestrahlung der behandelten Luft oder der Partikel-abscheidenden Bauteile zur Inaktivierung von Viren eingesetzt. Bei den letztgenannten physikalischen Verfahren können grundsätzlich Nebenreaktionsprodukte, wie Stickoxide oder auch Ozon, entstehen. Daher sollte vor dem Einsatz solcher Geräte in öffentlichen oder privaten Räumen geklärt werden, ob Reaktionsprodukte in gesundheitlich relevanten Konzentrationen auftreten können. Ein weiteres Problem bei der Bewertung von Luftreinigungsgeräten ist der Nachweis der Abscheidung und Inaktivierung von Viren. Filter wie HEPA-Filter werden z.B. mit definierten Feststoff- oder Ölpartikeln geprüft [9]. Bioaerosole besitzen jedoch sehr unterschiedliche Eigenschaften hinsichtlich elektrischer Ladung, Form, Größe und Tenazität. Darüber hinaus ändern sich diese Eigenschaften im luftgetragenen Zustand in Abhängigkeit von den Umgebungsparametern. Ab einer bestimmten Größenordnung können Viren beispielsweise HEPA-Filter passieren. Allerdings ist es fraglich, inwieweit die Abscheideraten von luftgetragenen Viren mit denen von Standardpartikeln vergleichbar sind. Bei physikalischen oder chemischen Inaktivierungsverfahren (z. B. UV-Bestrahlung oder Ozonisierung) ist zudem das Dosis-Wirkungs-Prinzip zu berücksichtigen.

Für die Bewertung der Wirksamkeit von Luftreinigern existieren zwar bereits mehrere internationale Normen, diese unterscheiden sich jedoch in ihren technischen Ansätzen oft erheblich und sind in der Regel nur für eine oder wenige Schadstoffarten definiert. Dies hat zur Folge, dass die auf dem Markt erhältlichen Raumluftreiniger nicht einheitlich geprüft und somit nicht vergleichend bewertet werden können. Eine Norm zur Prüfung der Wirksamkeit von Innenraumluftreinigern existiert in Deutschland bislang nicht. Angewandte Prüfnormen für die Wirksamkeit von Luftreinigern, wie die chinesische GB/T 18801:2015 oder die US-amerikanische ANSI/AHAM AC-1:2015, beinhalten ebenfalls keine genormten Prüfverfahren zur Überprüfung der Wirksamkeit von Geräten, deren Reinigung auf UV-Bestrahlung oder dem Einsatz von Ozon oder Plasma basiert, obwohl gerade diese Verfahren im Rahmen der Strategien in der vergangenen COVID-19-Pandemie im Fokus standen [z.B. [10-12]]. Es fehlt daher an Verfahrensvorschriften, die neben der Bewertung der Gesundheitsgefährdung durch aus Luftreinigern freigesetzten Stoffen auch die Wirksamkeit solcher Geräte hinsichtlich der Abscheidung oder Inaktivierung luftgetragener Pathogene prüfen und somit belastbare und reproduzierbare Ergebnisse für eine Validierung liefern können.

1.1. Stand der Wissenschaft und Technik

1.1.1. Luftgetragene Viruspartikel

Virushaltige Partikel gehören zu den Bioaerosolen. Als Bioaerosol gelten alle im Luftraum befindlichen Ansammlungen von Partikeln, denen Pilze (Sporen, Konidien, Hyphenbruchstücke), Bakterien, Viren und/oder Pollen sowie deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte (z. B. Endotoxine, Mykotoxine) anhaften bzw. diese beinhalten oder bilden [13]. Partikel

in einem Bioaerosol haben in der Regel einen aerodynamischen Durchmesser im Größenbereich von 0,01 µm bis 100 µm. Auch größere Partikel können generiert werden, diese sedimentieren in Abhängigkeit von ihrem aerodynamischen Durchmesser allerdings relativ schnell. Kleine Bioaerosolpartikel können hingegen sehr lange in der Luft verbleiben und auch über weite Strecken transportiert werden. Zur Ausbreitungscharakterisierung von Bioaerosolen, genauso wie für die Abscheidung in Filteranlagen, sind daher die Sedimentationsgeschwindigkeit und die Depositionsgeschwindigkeit der enthaltenen Partikel von Bedeutung, da diese Einfluss darauf haben, wie schnell Bioaerosolpartikel z. B. durch Absinken oder Anlagerung auf Oberflächen wieder aus der Luft entfernt werden. Bioaerosolpartikel mit einem aerodynamischen Durchmesser bis 20 µm werden beispielsweise bei für Innenräume typischen Strömungsgeschwindigkeiten um 0,1 m/s über längere Zeit in der Schwebelage gehalten [14] und schnell im ganzen Raum verteilt. Wird die Raumluft nicht ausgetauscht (Lüften) oder gefiltert (Lüftungsanlage oder Luftreiniger), kommt es mit der Zeit zu einer Anreicherung, die im Falle von SARS-CoV-2 das Infektionsrisiko erhöht.

Das SARS-CoV-2 hat eine Größe von ca. 100 nm [15]. Exhalierter Aerosolpartikel sind hingegen zunächst größer, schrumpfen aber bei Raumluftbedingungen schnell durch den Verlust von freiem Wasser [16]. Neben Husten und Niesen gelten bezüglich der Ausbreitung von SARS-CoV-2 auch Sprechen und Singen [17, 18] als maßgebliche Mechanismen zur Emission von Viren in Form von Bioaerosolen. Dabei werden bis zu mehreren hunderttausend Bioaerosolpartikel pro Liter Luft erzeugt [19], die jedoch in der Regel größer sind als die allein durch den Atemluftstrom generierten Partikel. Nach Asadi et al. [20] haben die dabei entstehenden Bioaerosolpartikel eine Größe von ca. ≤ 1000 nm, wobei die Partikelzahl, nicht aber die –größe mit steigender Sprechlautstärke zunimmt. Pro Stunde atmet eine erwachsene Person durchschnittlich etwa 750 Liter ein und aus [21], so dass eine infizierte Person ein Bioaerosol mit einer beachtlichen Virusfracht erzeugen kann.

In vielen Studien zu Bioaerosolen bleibt aus methodischen Gründen (v. a. unzureichende Sammelverfahren) der Nanometerbereich weitgehend unberücksichtigt [22]. Sehr kleine Partikel verhalten sich allerdings in vielen Belangen anders als Partikel im Mikrometerbereich [23-25]. Im Partikelgrößenbereich von 100 nm ist bei kurzen Distanzen die Diffusion ein wichtiger Prozess zur Verteilung im Raum [21]. Dies gilt ebenso für Aerosole in ruhender Luft. Gleichzeitig werden kleine Partikel zusätzlich maßgeblich von Luftströmen beeinflusst. Mit Filtern ausgestattete Luftreiniger nutzen neben elektrostatischen Effekten auch diese Brownsche Molekularbewegung, um gerade kleine Partikel wirksam zu entfernen [26]. Größere Partikel dagegen impaktieren aufgrund ihrer größeren Trägheit in den Filtern [21].

1.1.2. Funktionsweisen von Luftreinigungsgeräten

Neben der Filtration (Entfernung aus dem Luftstrom) ist die Inaktivierung eine weitere Möglichkeit die Infektionsgefahr durch luftgetragene Viren zu senken. Dass die UV-C-Bestrahlung (254 nm) von Viren zu deren Inaktivierung führen kann, ist lange bekannt [27]. Verschiedene

UV-Bestrahlungsverfahren werden in Luftreinigern bereits eingesetzt [28] [29] [10]. Diese sind aufgrund der potentiellen Schädigung der menschlichen Haut und der Augen nicht offen im Raum anwendbar, solange sich Personen im Raum befinden. In der Praxis wird der Luftstrom daher üblicherweise an einer eingehausten UV-C Quelle vorbeigeführt. Über Verweilzeit und Strahlungsstärken können die Dosen, die luftgetragene Erreger erfahren, ermittelt werden. Offene UV-Anwendungen erscheinen unter bestimmten Bedingungen jedoch auch in mit Personen besetzten Räumen möglich. Buonanno et al. [12] zeigten, dass luftgetragene humane Coronaviren bei Bestrahlung mit Strahlung der Wellenlänge 222 nm abgetötet werden können. Der Einsatz von 222 nm findet in der Praxis zur Luftreinigung zwar noch keine breite Anwendung, wird aber aufgrund der geringeren Gesundheitsgefährdung für den Menschen als mögliche Alternative bei offenem Einsatz angesehen.

1.1.3. Bewertungsgrundlagen für die Effektivität von Luftreinigern

Für die Bewertung der Effektivität von Luftreinigern hat sich international die Clean Air Delivery Rate (CADR) etabliert, die standardisiert über Abklingraten in einer Prüfkammer bestimmt wird [30]. Die CADR gibt an, wieviel Kubikmeter an gereinigter Luft der Luftreiniger pro Stunde zur Verfügung stellt und entspricht somit dem Produkt von Filtereffizienz und Volumenstrom, den das Gerät umwälzt. Oftmals wird nur die CADR bei höchster Lüfterstufe angegeben, die in der Regel aufgrund hoher Geräusentwicklung nur kurz zur Anwendung kommt. Einige Innenraumluftreiniger verfügen über Automatikmodi, welche den Volumenstrom eigenständig basierend auf vom Gerät durchgeführten Partikelkonzentrationsmessungen regeln. Entscheidend ist also nicht allein eine möglichst hohe Filtereffizienz, sondern vor allem die Kombination mit einem ausreichenden Luftumsatz. Wenn die Reduktion des Volumenstroms durch den höheren Druckverlust nach Einsatz höherer Filterklassen den Zugewinn an Filtereffizienz übersteigt, sinkt letztlich die CADR [31], während Geräuschemissionen und Energieverbrauch bei den meisten Geräten ansteigen.

Für den Betrieb von Luftreinigern sind grundsätzlich zwei Einsatzzeiträume möglich: während der Nutzung eines Raums und somit bei Aufenthalt von Personen (z.B. während des Schulunterrichts oder Besprechungen) oder in Pausen ohne Belegung des Raumes. Im letzteren Fall wären Geräuschemissionen, aber auch mögliche Reaktionsprodukte wie Stickoxide oder Ozon weniger relevant. Befindet sich unter den Anwesenden eine Person, die infektiöse Partikel exhaliert, stellt sich im ersten Fall mit der Zeit eine Gleichgewichtskonzentration an Viren im Raum ein [32]. Diese liegt umso niedriger, je höher die CADR des Luftreinigers ist, kann allerdings niemals bei null liegen. Werden die Viren im Raum gleichmäßig verteilt, so ist die resultierende Gleichgewichtskonzentration nur von der Menge der exhalierten Viren und der pro Zeiteinheit entfernten Menge an Viren abhängig. Letztere hängt nur von der CADR, nicht aber vom Raumvolumen ab. Dies wird am besten in einer dynamisch betriebenen Prüfkammer nachgebildet. Im zweiten Fall werden die Belegungspausen dazu genutzt, um eine vorhandene Ausgangskonzentration zu reduzieren. Dies geht umso schneller, je höher die Luftwechselrate

ist. Diese ergibt sich als Quotient aus CADR und Raumvolumen. Gängige Prüfnormen empfehlen daher einen Luftwechsel von circa drei bis sechs pro Stunde, wovon der höhere Wert auch im Kontext der COVID-19-Pandemie empfohlen wurde [33].

2. Vorhabenziele

Da es bislang keine verbindlichen Vorgaben für die Prüfung der Wirksamkeit von Luftreinigern zur Reduktion der Virenfracht in Innenraumluft gibt, die eine vergleichende Bewertung von Luftreinigungsgeräten mit unterschiedlichen Technologien ermöglichen, sollte in dem Vorhaben ein Standardverfahren für die Prüfung von Luftreinigern entwickelt und evaluiert werden, das sich auf alle Luftreiniger unterschiedlicher Technologien anwenden lässt und wenige technische Hürden beinhaltet, um eine breite Anwendung zu ermöglichen. Neben der Prüfung der Effizienz der Viren- und Partikelentfernung sollte das Verfahren das Auftreten möglicher Nebenprodukte, wie Ozon oder Stickoxide und weitere arbeitsschutzrelevante Parameter, wie die Betriebslautstärke, Zugluftentstehung oder austretende UV-Strahlung beinhalten. Das Verfahren sollte sich auf mobile Luftreiniger für Arbeitsplätze und Schulen mit den auf dem Markt verfügbaren verschiedenen Technologien zur Reduktion der Virusfracht konzentrieren.

3. Arbeitsplan

Das Projekt war über eine Laufzeit von zwei Jahren in 4 Arbeitspakete (AP) mit 3 Meilensteinen gegliedert. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Zeitplanung mit den einzelnen Arbeitspaketen und die zugehörigen Meilensteine.

Die Kammerversuche wurden vom Fachbereich Materialanalytik und Innenluftchemie (MAIC) am Fraunhofer WKI in Braunschweig übernommen. Laborarbeiten wie die mikrobiologische Analyse wurden im mikrobiologischen S2-Labor am Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie (ITTN) der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt.

Das Projekt wurde kostenneutral verlängert, ansonsten gab es keine wesentlichen Abweichungen zum vorgesehenen Zeitplan. Aufgetretene Verzögerungen durch z. B. technische Defekte von Geräten konnten kompensiert werden.

Tabelle 1: Arbeitspakete im zeitlichen Verlauf laut Antrag

Arbeitspakete	verantwortlicher Projekt-partner	Jahr 1				Jahr 2			
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8
AP 1 "Kammer"				M1					
AP 1a Einrichtung und Optimierung der Testkammer	MAIC								
AP 1b Installation / Kalibrierung der Sensoren	MAIC								
AP 1c Zusammenschau auf dem Markt erhältlicher Geräte unterschiedlicher Verfahren zur Luftreinigung	MAIC								
AP 1d Auswahl und Installation repräsentativer Luftreinigungsgeräte	MAIC								
AP 1e Festlegung einer standardisierten Operationsweise der Testkammer für Luftreinigungsgeräte	MAIC								
AP 2 "Prüfbioaerosol"						M2			
AP 2a Literaturrecherche	MAIC/ITTN								
AP 2b Vorversuche zur Einstellung des Prüfaerosols mit MS2-Phagen	ITTN								
AP 2c Erarbeitung eines Anwendungsprotokolls für Zweistoffdüse	MAIC/ITTN								
AP 2d Erarbeitung eines Anwendungsprotokolls für Bubble-Burst-Generator	MAIC/ITTN								
AP 2e Vergleich der Verfahren und Auswahl des geeigneteren	ITTN								
AP 2f Festlegung der Kenngrößen des ausgewählten Verfahrens	MAIC/ITTN								
AP 3 "Sammelverfahren"								M3	
AP 3a Literaturrecherche	MAIC/ITTN								
AP 3b Erarbeitung eines Anwendungsprotokolls für Filtrationsverfahren	ITTN								
AP 3c Erarbeitung eines Anwendungsprotokolls für Impingement-Verfahren	ITTN								
AP 3d Erarbeitung eines Anwendungsprotokolls für Fliehkraftabscheider-Verfahren	ITTN								
AP 3e Vergleich der Sammelmethode und Auswahl des geeignetsten Verfahrens	ITTN								
AP 3f Festlegung der Kenngrößen des ausgewählten Verfahrens	MAIC/ITTN								
AP 4 "Prüfstandard"									
AP 4a Erarbeitung eines Testprotokolls anhand der ausgewählten Verfahren und Kenngrößen	MAIC/ITTN								
AP 4b Validierung des Testprotokolls	MAIC/ITTN								
AP 4c Ableitung eines Prüfstandards für Innenluftreiniger	MAIC/ITTN								

M1: Operationsweise der Bioaerosolprüfkammer für die Testung von Luftreinigern optimiert

M2: Anwendungsprotokoll für die Generation eines Viren-Aerosols für die Testung von Luftreinigern erstellt

M3: Verfahren für den Nachweis einer Virenreduktion durch die Luftreiniger festgelegt und evaluiert

4. Ausführliche Darstellung der durchgeführten Forschungsarbeiten und Ergebnisse

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden die Darstellung der durchgeführten Arbeiten und erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst in Themenblöcken nach den entsprechenden Arbeitspaketen (s. Tabelle 1) vorgenommen.

4.1. Prüfkammer

In AP 1 wurde eine Emissionsprüfkammer für den Betrieb als Bioaerosoltestkammer für die Installation von verschiedenen Luftreinigungsgeräten eingerichtet und optimiert (AP 1a). Dabei mussten die verschiedenen Dimensionen und Anbringungsorte der zu untersuchenden Luftreiniger berücksichtigt werden. Für ein Wandgerät musste ein Gestell gebaut werden, welches eine wandständige Positionierung erlaubte. Tischgeräte wurden ebenfalls auf diese Weise in der vom Hersteller angegebenen Höhe positioniert. Mit Ausnahme der wandständigen Installation wurden alle Luftreiniger mittig auf dem Boden der Kammer stehend positioniert. Die verwendeten Gestelle aus Aluminium-Profilen (Item Industrietechnik GmbH) hatten keine geschlossenen Seiten, um möglichst wenig Strömungshindernisse zu generieren.

Die Prüfungen wurden in einer Edelstahlemissionsprüfkammer mit einem Gesamt-Innenvolumen von 30 m³ durchgeführt (s. a. Abbildung 1a). Diese Dimensionierung ist geeignet, das Luftvolumen von klassischen Büroräumen zu simulieren. Die klimatischen Parameter Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit in der Prüfkammerluft waren regelbar und wurden standardmäßig auf 23 ± 2 °C und 50 ± 5 % rel. LF eingestellt. Die Prüfkammer kann in zwei Grundeinstellungsarten betrieben werden: dynamisch, mit Zuführung von gefilterter und konditionierter Zuluft von außen (hier zur Einstellung von Temperatur und Luftfeuchtigkeit im Vorfeld der Versuche genutzt) oder statisch, im Umluftbetrieb. Im Umluftbetrieb wird die Luft durch Lochbleche geführt, welche die gesamte Decken- und Bodenfläche einnehmen. Auf diese Weise wird eine gute Luftdurchmischung und eine gleichmäßige Verteilung zudosierter Substanzen im gesamten Luftraum gewährleistet. Die Untersuchungen der Luftreinigungsgeräte erfolgten grundsätzlich im Umluftbetrieb in zwei verschiedenen Modi: (1) mit Umluftführung, (2) ohne kontinuierliche Umwälzung. In Modus 2 wurde die Umluft nach Zuführung und Durchmischung der Testsubstanzen ausgeschaltet. Somit wurde die Prüfkammerluft nicht mehr gleichmäßig im Prüfraum verteilt und ausschließlich durch die Luftführung der Reinigungsgeräte bewegt. Mit dieser Betriebsart wurde das Vermögen der getesteten Innenluftreiniger geprüft, die zu reinigende Luft selbständig anzusaugen und die gereinigte Luft anschließend im gesamten Raum wieder zu verteilen. Bei einer zu schwachen Lüftungsleistung eines Geräts kann es zur Entstehung sogenannter „clean-air-bubbles“ kommen. Dies bezeichnet gereinigte Luft ausschließlich in unmittelbarer Umgebung des Gerätes. Um repräsentative Daten zu erheben, erfolgte die Luftprobenahme zur Bestimmung der Konzentrationen luftgetragener Substanzen daher in einigem Abstand (mindestens 1 Meter) zum Luftreiniger und versetzt zur Luftaustrittsöffnung (sofern anwendbar) des mittig in der hinteren Hälfte der Kammer (Ausnahme: Wandgeräte) positionierten Gerätes (Abbildung 1b+c).

Die Luftprobenahme erfolgte über Edelstahlsonden und Silikonschläuche, die durch Probenahmeports in der Seitenwand der Emissionsprüfkammer geführt wurden. Die Luftproben wurden in einer Höhe von 100 bis 120 cm entnommen, dies entspricht dem Einatembereich sitzender Personen [34]. Neben den Bioaerosolproben wurden kontinuierlich Partikel-, Stickoxid- und Ozonkonzentrationen in der Kammer erfasst. Dies erfolgte mittels Fast Mobility Particle Sizer (FMPS 3091, TSI) für Ultrafeinpartikel, Optical Particle Sizer (OPS 3300, TSI) für Feipartikel und den UV Absorptionsmonitoren APNA-370 (Horiba Europe GmbH) für Stickoxide und APOA-370 (Horiba Europe GmbH) für Ozon.



Abbildung 1 a-c: a geöffnete 30 m³ Edelstahl-Prüfkammer; b Ansicht Prüfling in Kammer positioniert; c schematische Darstellung der Positionen, Blick von oben auf den Kammerboden (LR Luftreiniger, D Phagendosierung, ▶ Probenahmeports in der Kammerwand)

In der VDI-EE 4300 Blatt 14 [35] wird empfohlen, dass Luftreiniger die Konzentrationen luftgetragener Viren innerhalb von 30 Minuten um eine Log-Stufe reduzieren sollen. In Abbildung 2 ist zu erkennen, dass alle geprüften Luftreiniger im Modus 1, mit zusätzlicher kontinuierlicher Durchmischung der Kammerluft, diese Vorgabe erfüllen. Wird aber der Umluftbetrieb der Kammer ausgeschaltet, werden die Konzentrationen mit einigen Luftreinigern nicht mehr innerhalb von 30 Minuten auf 10 % der Ausgangskonzentration reduziert. Es ist daher davon auszugehen, dass die kammerseitige Umwälzung, sei es durch vermehrte Partikelsenken in der Luftführung oder Unterstützung des Luftreinigers in der Luftbewegung, zu einer Überschätzung der eigentlichen Luftreinigerleistung führt. Daher wurde die Prüfkammer für die vergleichende Luftreinigerprüfung zur Evaluation der Prüfmethode in Modus 2 (ohne Umwälzung der Kammerluft nach Dosierung) betrieben.

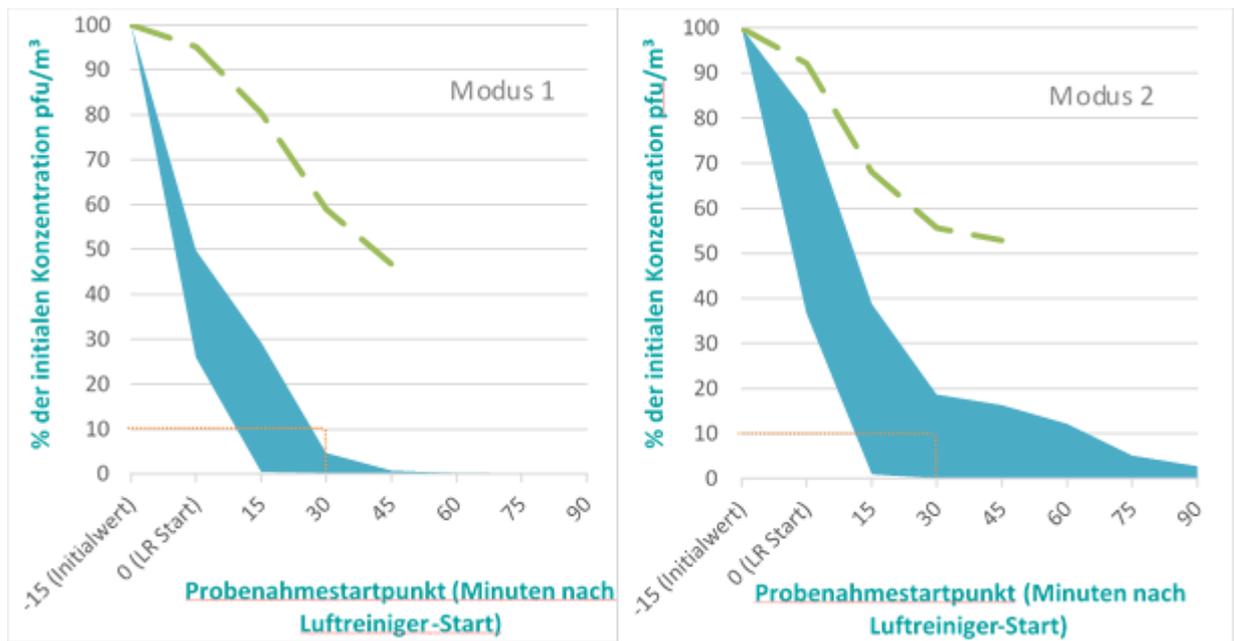


Abbildung 2: Bereich der in der Luft gefundenen Surrogat-Konzentrationen (pfu/m³ MS2) als Prozentsatz der Anfangskonzentration (absolute Minima und Maxima aller Messungen von 11 verschiedenen Luftreinigern) über die Zeit in der Prüfkammer mit (Modus 1) und ohne zusätzliche Luftumwälzung (Modus 2); die grüne Linie stellt die natürlichen Abklingrate dar („natural decay“, ND, ohne Luftreiniger, beispielhaft dargestellt durch die Ergebnisse einer Messreihe), die orangefarbene Linie die in der VDI-EE 4300 Blatt 14 geforderte Reduktion um eine Logstufe.

Zur Reinigung wurde die Prüfkammer nach jeder Messreihe über mindestens 12 Stunden auf 80°C ausgeheizt, um Kontaminationen und Memory-Effekte zu vermeiden. In regelmäßigen Abständen wurde die Prüfkammer außerdem durch Ozonierung desinfiziert. Zur Kontrolle der Reinigung wurde vor jeder neuen Messreihe eine Blindprobe entnommen (s. a. 4.6 und Tabelle 3).

4.2. Prüfkanal

Für Vorversuche zum Einstellen unterschiedlicher Kenngrößen und für Messungen in Luftströmen wurde ein Prüfkanal nach Vorgaben der VDI Richtlinie 4258 [36] aufgebaut. Die zehn Meter lange Messstrecke (Abbildung 3a) wurde mit Unterdruck betrieben und konnte auf unterschiedliche Luftgeschwindigkeiten eingestellt werden. An mehreren Stellen wurden Luftproben entnommen und Messgeräte für physikalische Kenngrößen (Luftdruck, Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit, Luftgeschwindigkeit) im Prüfkanal und im umgebenden Laborraum angebracht. Dies ermöglichte eine kontrollierte und gezielte Durchführung von Messungen. Zusätzlich wurde durch das Anbringen zweier Nanopartikelzähler die Menge an Nanopartikeln in der Luft bestimmt. Die in den Prüfkanal eingehende Luft wurde über einen H13 Filter vorgereinigt. Die Abluft wurde vor dem Verlassen des Prüfkamrals durch UV-C Strahlung und einer

H14 Filter-Endstufe dekontaminiert. Die ausströmende Luft wurde auf Virusrückstände getestet. Die Verneblung der Prüforganismen erfolgte nach VDI Richtlinie 4258 [36, 37] mit einer Zweistoffdüse (medizinischer Vernebler), die Probenahme unter anderem nach VDI Richtlinie 4252 Blatt 2 [38] in einer Out-stack Anordnung (Prüfkomponenten werden außerhalb des Prüfkanals aus der Luft abgeschieden, s. Abbildung 3b + c). Die Sonden zur Luftprobenahme hatten eine optimierte und gleichbleibende Position im Luftstrom. Eine gleichmäßige Verteilung der Luft ohne Verwirbelungen und damit eine gleichmäßige Verteilung der Prüforganismen vor der Messposition wurde durch eingebaute Strömungsgleichrichter gewährleistet. Generell kann in Prüfkanälen mit unterschiedlichen Luftvolumenströmen bzw. Luftgeschwindigkeiten gerechnet werden. Plausibel wäre daher, dass sich in Abhängigkeit vom Sammelverfahren (AP3) ein sichtbarer Verdünnungseffekt abzeichnet, wenn der Volumenstrom erhöht wird. Zur Prüfung der Hypothese wurden die Untersuchungen mit verschiedenen Sammelverfahren bei zwei verschiedenen Luftgeschwindigkeiten (1 m/s und 3 m/s) durchgeführt.

Die Reinigung der Messstrecke und der fest verbauten Sonden erfolgte nach jedem Messtag mit 113 ppm Ozon für 60 Minuten. Vor erneuter Messung wurde die Dekontamination der Strecke per Blindwertprobe überprüft.



Abbildung 3 a-c: a) Edelstahl-Prüfkanal in S2-Labor am Standort ITTN; b + c) Probenahmen mit Sammelköpfen und Impingern an vorläufigem baugleichen Prüfkanal aus mineralfaserverstärkten Polypropylen-Kanalgrundrohren zur Findung der optimalen Messpositionen

4.3. Auswahl von Luftreinigungsgeräten

Anhand einer Recherche zu auf dem Markt verfügbaren Innenluftreinigern und angewendeten Reinigungsmechanismen (AP1c) wurden zu jedem Gerätetypus repräsentative und kommerziell erhältliche Luftreiniger ausgewählt und angekauft (AP 1d). Auf dem Markt werden viele verschiedene Verfahren zur Luftreinigung beworben und angeboten. Filtrationsverfahren mit Vor-, HEPA- und Nachfilter sind am häufigsten zu finden. Daneben finden UV-basierte

Verfahren zunehmend Verwendung. Auch bei den Filtrationsgeräten wird teilweise auf zusätzliche Verfahren, wie Photolyse durch UV-Strahlung oder thermische Inaktivierung innerhalb der Filterstufen, zurückgegriffen. Einige Geräte setzen auch mehrere Wirkprinzipien zur Luftreinigung in Kombination ein. Ozonierung, UV-C-Bestrahlung (222 nm) oder andere Verfahren sind nur sehr vereinzelt oder (noch) gar nicht zu finden. Die Wirkprinzipien der auf dem Markt erhältlichen Luftreinigungsgeräte für Innenräume sind (in absteigender Häufigkeit):

- Filtration (ungeladene Vliesstofffilter oder Elektretfilter)
- UV-C (253-260 nm)
- Elektrostatische Abscheider (Elektrofilter)
- Ionisation/Plasma
- Ozon
- sonstige (z. B. Hydroxylradikale)
- UV-C (222 nm)

Die anzuschaffenden Geräte mussten ausreichend dimensioniert für die Luftreinigung in einem Standardbüro (ca. 30 m³) sein. Außerdem sollte die Abscheideeffizienz und die Betriebssicherheit herstellerseitig bereits belegt sein.

Zur Erfüllung des Kriteriums „kommerziell erhältlich“ sollte das Gerät bei einer Recherche in entsprechenden Katalogen¹ oder mit den Suchbegriffen „Luftreiniger“, „Innenluftreiniger“, „Raumlufreiniger“ ggf. in Kombination mit den Wirkungsmechanismen (z. B. „UV“ oder „Ozon“) in Suchmaschinen zu finden sein. Darüber hinaus sollte ein Kaufpreis angegeben sein oder die Möglichkeit, ein Angebot anzufordern, bestehen.

Bei einer empfohlenen [7, 39, 40] Luftwechselrate von mindestens 4 bis 6 h⁻¹ ergab sich für einen Raum mit einem Volumen von 30 m³ ein erforderlicher Luftumsatz von 120 bis 180 m³/h. Die Spanne der Luftwechselraten war bei den auf dem Markt verfügbaren Geräten sehr groß. Obwohl die Leistung der Lüfter (und damit die Luftwechselrate) in der Regel positiv mit dem Schalldruckpegel verknüpft ist, gab es große Unterschiede in den herstellerseitigen Angaben zur Lautstärke der Luftreiniger (dB (A)_Wert). Trotzdem sollte das ausgewählte Gerät nicht „überdimensioniert“ für die Prüfkammer sein und die maximale Luftwechselrate 600 m³/h nicht übersteigen. Der angegebene Schalldruckpegel wurde bei der Auswahl der Geräte nicht berücksichtigt. Bei den nicht auf Filtration beruhenden Geräten finden sich mitunter auch Luftwechselraten unterhalb von 120 m³/h. Wird die Luft in der Luftreinigungseinheit keimtötend behandelt (z. B. Ozonierung oder UV-Bestrahlung), so kann bei einem hohen Luftdurchsatz die Verweildauer und damit die Einwirkzeit zu kurz sein, so dass bei den Gerätespezifikationen eher niedrigere Luftwechselraten zu finden sind. Hier wird herstellerseitig statt oder zusätzlich zu der Luftwechselrate oft eine Raumgröße angegeben, für die das Gerät geeignet sein soll.

Unter den in Deutschland auf den Markt erhältlichen Luftreinigungsgeräten wurden insgesamt 10 Geräte für das Projekt ausgewählt. Ein weiteres Gerät wurde vom Hersteller zusätzlich

¹ Online-Kataloge von Vertriebern, Listen aus Verbraucher-Tests

kostenfrei zur Verfügung gestellt, so dass insgesamt 11 Geräte für die Untersuchungsreihen zur Verfügung standen. Es wurden keine reinen Filtrationsgeräte gewählt und Filtrationstechnik nur in Kombinationen mit anderen Wirkprinzipien berücksichtigt. Tabelle 2 zeigt die ausgewählten Geräte anonymisiert ohne Herstellernennung und Produktname. Bei großen Preisunterschieden innerhalb einer Geräteklasse mit demselben Wirkprinzip wurde jeweils ein Luftreiniger aus der hohen und der niedrigen Preiskategorie einbezogen. Überlegung dabei war, dass schlechtere Verarbeitung und mangelhafte Gehäuseabschirmung günstigerer Geräte ggf. ein Austreten von Strahlung oder chemischen Reaktionsprodukten begünstigen könnten. Hohe Preisunterschiede gab es vor allem bei den auf UV-Strahlung basierten Geräten (< 500 € bis > 5000 €). Günstigstes Gerät der getroffenen Auswahl war ein Luftreiniger mit HEPA 13-Filter, zusätzlicher UV-Strahlungsbehandlung der Filtereinheit und Ionisator für ca. 100 € (Gerät h).

Tabelle 2: ausgewählte Innenluftreiniger

Bezeichnung	Wirkprinzip						
	Filtration	UV-Strahlung	Elektrostat	Plasmagenerator / Ionisator	Ozon	Hydroxyl-generator	max. Luftumsatz [m ³ /h] (Raumgröße nach Herstellerangaben)
a	x			x			470
b		x					300
c		x					300
d		x					200
e		x			x		55 (30 m ²)
f			x				550
g	x	x		x	x		(100 m ²)
h	x	x		x			200
i	x			x		x	300
j	x	x					400
k		x			x	x	30 (40 m ²)

Bis zum Ende der Versuchsreihen war auf dem deutschen Markt kein Luftreiniger mit UV-Strahlung der Wellenlänge 222 nm verfügbar. Im Ausland werden diese bereits vereinzelt vertrieben. Möglicherweise sind demnächst auch in Deutschland solche Geräte erhältlich. Es ist durch die Ähnlichkeit zu den Geräten mit UV-Strahlung der Wellenlänge 354 nm davon auszugehen, dass das Prüfverfahren auf diese Geräte ebenfalls ohne Einschränkung anzuwenden

ist. Gegen Ende der Versuchsreihen kamen zeitlich dicht hintereinander zwei Luftreiniger auf den Markt, die die Luft durch in die Raumluft abgegebene Hydroxylradikale behandeln. Diese (Geräte i und k) wurden ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen.

4.4. Surrogate - Prüforganismen

4.4.1. Auswahl der Surrogate

Es wurden in Prüfkammer und Prüfkanal zwei unterschiedliche Organismen als Stellvertreter für luftgetragene Viren eingesetzt. Zusätzlich wurde die Surrogatauswahl in der Prüfkammer noch um einen Vertreter aus der Gruppe der Bakterien ergänzt. In der Prüfkammer wurden ausschließlich Surrogate der Risikogruppe 1 vernebelt. Um die Sicherheit des Laborpersonals zu erhöhen und die Bearbeitung in S1 Laboren zu ermöglichen, wurden nicht pathogene und etablierte Surrogatviren ausgewählt. Der unbehüllte Coliphage MS2 (DSM 13767) besitzt eine ssRNA und eine Größe von 30 nm. Der Bakteriophage ist ein etabliertes Surrogat für Noroviren und für einige pathogene respiratorische Viren. Zusätzlich wurden Tests mit dem dsRNA Bakteriophagen Phi6 (DSM 21518) durchgeführt. Mit seiner Größe von 85 nm und der behüllten Struktur ähnelt es unter anderem Influenzaviren und wurde in den letzten Jahren auch als Surrogat für luftgetragene Coronaviren verwendet.

4.4.2. Herstellung der Suspension

Die MS2 Phagensuspension wurde nach ISO Verordnung 10705-2 [41] im Lyseverfahren hergestellt. Phi6 wurde von Agarplatten abgeschwemmt. Hier wurden 5ml Salz-Magnesium-Puffer auf eine Platte mit die Oberfläche vollständig bedeckenden Phagenplaques gegeben und 40 Minuten bei 100 rpm geschwenkt. 10 ml beider Phagen-Suspensionen wurden jeweils mittels Dialyse aufgereinigt. Die Dialyse erfolgte in Membranschläuchen aus Cellulose Esther mit einer Molekulargewichtsgrenze von 1000 kd (Spectra/Por Biotech CE) über Nacht bei 4 °C in 1 Liter deionisiertem Wasser. *Staphylococcus xylosus* wurde über 24 Stunden auf CASO-Agar angezogen, mehrere frische Kolonien in physiologische Kochsalzlösung überführt und durch Zentrifugation aufkonzentriert bis eine Suspension mit einer Zelldichte etwa 1×10^7 CFU erreicht wurde.

4.4.3. Einsatz der Suspensionen

Die jeweilige erhaltene Suspension wurde direkt in die Prüfkammer vernebelt, für die Vernebelung im Prüfkanal wurden die Phagen auf ca. 10^9 eingestellt. Die Verdünnung erfolgte für MS2 in deionisiertem Wasser, für Phi6 wurde Salz-Magnesium-Puffer mit 0,01% BSA (bovines Serumalbumin) verwendet. Vernebelt wurden zwischen 7 und 9 ml der Phagensuspensionen. Ausgewertet wurden die Proben der Vernebelung des MS2 Phagen im Zweischichtagarverfahren nach ISO 10705-2 [41] mit *E. coli* (DSM5210). Die Proben mit Phi6 wurden entsprechend mit 3 ml Tryptic Soy Broth (TSB) und ohne Zugabe von Calciumglucose über die Agarplatten

gegeben. Als Host wurde hier *Pseudomonas sp.* (DSM21482) verwendet. Die Petrischalen, die für die Ausplattierung von Phi6 eingesetzt wurden, war außerdem mit mit Agar versetztem TSB vorbeschichtet. Aliquote aus Impingern und den Waschpuffern zur Elution der Filter wurden für die RNA Quantifizierung eingesetzt. Zur Aufreinigung der RNA wurde das QIAamp viral RNA Mini Kit von Qiagen verwendet, die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Durchführung der qPCR wurde das Invitrogen™ SuperScript™ III One-Step RT-PCR System mit Platinum™ Taq DNA Polymerase von ThermoFisher verwendet. Das Protokoll der qPCR und die Primer wurden hinsichtlich MS 2 nach Dreier et al. [42, 43] und hinsichtlich Phi6 gemäß Kleesiek et al. [44] erstellt.

Die Ausgangskonzentration der Surrogate in der Prüfkammer wurden rechnerisch gemäß folgender Gleichung ermittelt:

$$\text{Formel 1} \quad K_R = K_S \times V_S \div V_R$$

mit K_R = Konzentration der Surrogate in der Prüfkammerluft in PFU/m³ oder CFU/m³
 K_S = Konzentration der Surrogatsuspension in PFU/ml oder CFU/ml
 V_S =Volumen der vernebelten Surrogatsuspension in ml
 V_R =Luftvolumen der Prüfkammer in m³

Die Menge der vernebelten Surrogatsuspension wurde gravimetrisch durch Auswiegen des befüllten Verneblerkopfes vor und nach der Dosierung bestimmt.

Die Ausgangskonzentrationen der Surrogate fielen in der Prüfkammer unterschiedlich aus. Die mittlere rechnerische Ausgangskonzentration lag für mit dem medizinischen Vernebler dosierte MS2-Phagen bei 2x10¹⁰ PFU/m³ (Median), für Phi6-Phagen bei 2x10⁹ PFU/m³ (Median) und für *Staphylococcus xylosus* bei 2x10⁶ CFU/m³ (Median).

Per Messung wurden um etwa 90 % niedrigere Werte für die Ausgangskonzentrationen ermittelt (s. 4.6). Dadurch wurde bei effektiven Luftreinigern und niedrigen Ausgangskonzentrationen die untere Nachweisgrenze (2x10² PFU/m³ bzw. CFU/m³) bereits nach kurzer Zeit erreicht. Die natürlichen Konzentrationsabnahmen (natural decay, ND) verliefen bei allen drei Surrogaten ähnlich (Abbildung 4) und nach 60 Minuten wurden etwa 50 % der Ausgangskonzentrationen erreicht. War der Luftreiniger in Betrieb, fielen die Konzentrationen vergleichsweise schnell ab. Nach 30 Minuten lagen die Konzentrationen luftgetragener *Staphylococcus xylosus* in der Kammerluft bereits dicht an der unteren Nachweisgrenze, obwohl die Reduktion insgesamt bei dem robusten Surrogat keine zwei Log-Stufen betrug. Die Abklingkurven der beiden Viren-Surrogate verliefen steiler, hier wurde bereits innerhalb von 15 Minuten die Konzentration um etwa 90 % gesenkt.

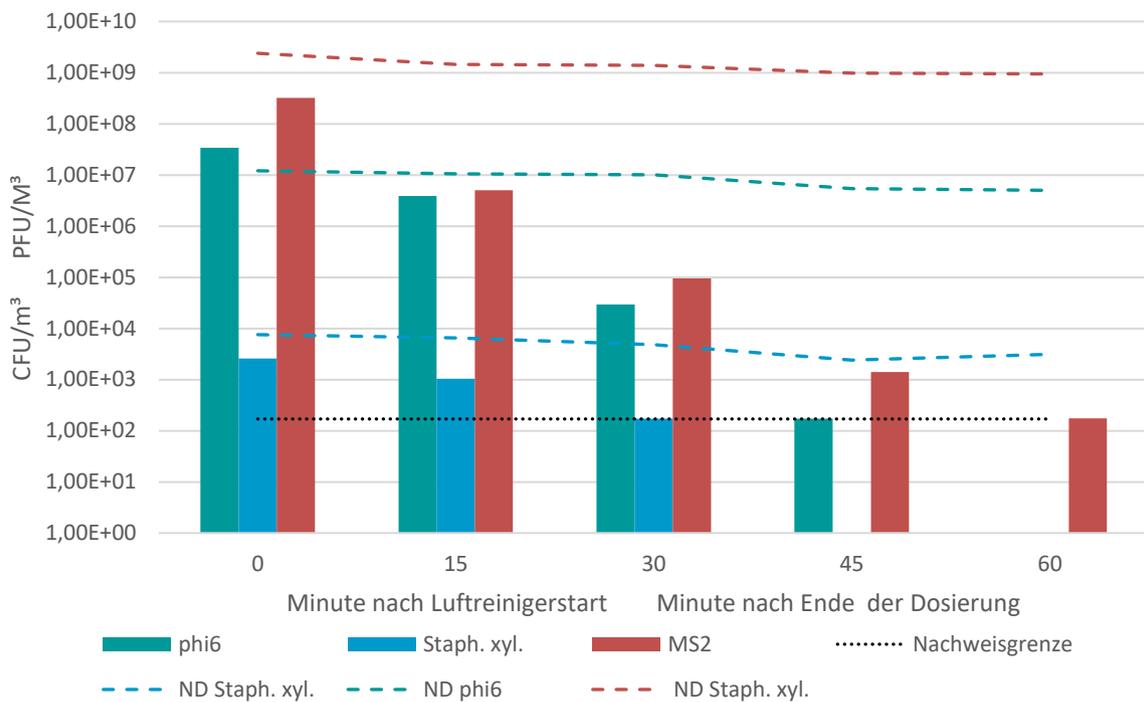


Abbildung 4: die mit Impingement erhaltenen mittleren Konzentrationen der drei in der Prüfkammer verwendeten Surrogate im Vergleich, mit (Säulen) laufendem Luftreiniger (UV-C-Gerät) und ohne (Linien; ND, natural decay).

Die Unterschiede in den Konzentrationsverläufen waren zwischen den Luftreinigertypen größer als im Vergleich der Surrogate. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Konzentrationsverläufe PFU/m³ für die beiden Virus-Surrogate bei Verwendung unterschiedlicher Luftreiniger-Typen. Bei UV-basierten Luftreinigern wurde phi6 etwas schneller inaktiviert als der gegenüber UV-Strahlung robuste MS2 [45]. Generell kann aber vermutlich davon ausgegangen werden, dass die beiden Surrogate gleichermaßen als Prüforganismen geeignet sind, auch wenn MS2 durch seine leichtere Anzucht im Labor und die einfache Handhabung das Surrogat der Wahl sein sollte.

Darüber hinaus wurde in der zweiten Projektphase damit begonnen, Influenza A und B Viren als mögliche Surrogate für Studien unter S2 Bedingungen zu testen. Zunächst wurde neben der klassischen Methode zur Virusgewinnung über angebrütete Hühnereier, die Verwendung von Zellkulturen etabliert, um infektiöses Virus z.B. aus Impingementproben nachzuweisen. Die Virusgewinnung über Hühnereier stellt unverändert den „Goldstandard“ für die Virusproduktion und den Nachweis der Infektiosität dar. Die Vermehrung des Virus, Anzucht der Zellen und die Quantifizierung über den 50% tissue culture infectious dose (TCID50)-Assay sind ausführlich in der anhängenden SOP beschrieben, die für die Arbeitsabläufe am ITTN verfasst wurde. Prinzipiell kann die Zellkultur sowohl zur Virusstock-Produktion als auch für den quantitativen Nachweis infektiöser Influenzaviren eingesetzt werden. In diesem Vorhaben wurden

MDCK (Madin-Darby canine kidney) –Zellen mit Verdünnungen von Influenza A Viren zur Bestimmung der TCID50 infiziert. Der Nachweis über die Zellkultur hat das Potential, Viruslasten infektiöser Viruspartikel zu bestimmen und stellt eine Alternative zur Detektion im Ei dar.

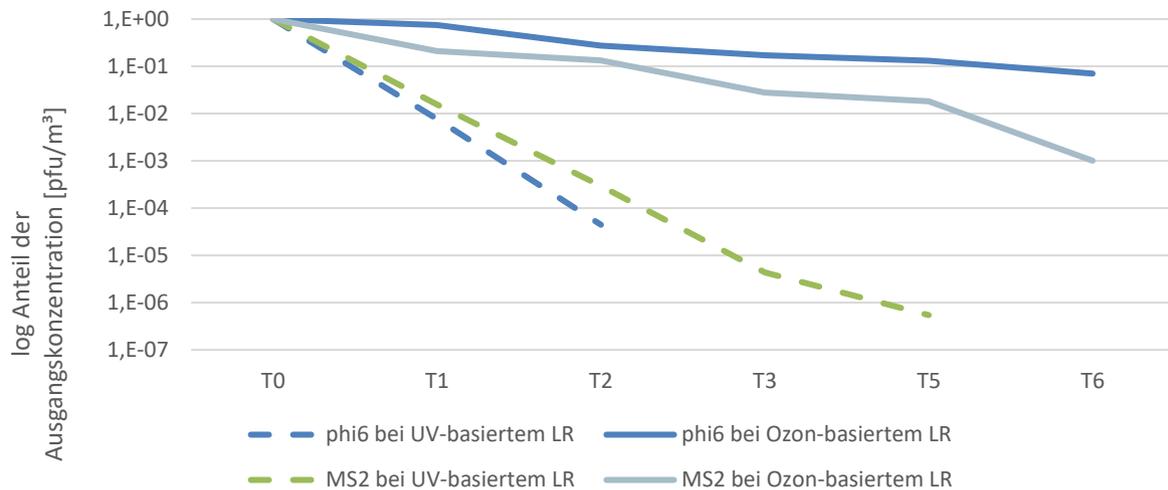


Abbildung 5: Vergleich der Konzentrationsverläufe luftgetragener Phagen in der Prüfkammer bei laufendem Luftreiniger zweier unterschiedlicher Typen als Anteil der Konzentrationen zum Zeitpunkt des Luftreiniger-Starts (T0)

4.5. Prüfbioaerosol-Herstellung

AP 2 beschäftigte sich mit dem Bereich „Prüfbioaerosol“ und sollte mit einem Anwendungsprotokoll für eine Zweistoffdüse (AP 2c) und einen Bubble-Burst-Generator (VDI-Richtlinie 4258 Blatt 2) (AP 2d) abgeschlossen werden. Die eingesetzten medizinischen Vernebler (Zweistoffdüsen) (PariBoy® Pro, Pari, Starnberg) zeigten mit dem entwickelten Anwendungsprotokoll eine gute und stetige Performance. Das MS2-Phagen-Prüfbioaerosol konnte stabil in der Kammerluft gehalten und eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme (Natural Decay) in der Kammer gemessen werden. Der Bubble-Burst-Generator (Sparging Liquid Aerosol Generator (SLAG), CH Technologies, USA) war für eine Dosierung des Bioaerosols in niedrigeren Konzentrationen über einen längeren Zeitraum gedacht. Mit diesem sollte im Gegensatz zu der kurzzeitigen Dosierung sehr hoher Konzentrationen des medizinischen Verneblers (etwa einem Superspreader vergleichbar) eine kontinuierliche Freisetzung durch z. B. einen subklinisch infizierten Vektor simuliert werden. Allerdings gelang es nicht, den Bubble-Burst-Generator deutlich länger zu betreiben als den medizinischen Vernebler. Während nach 30 Minuten die maximale Füllmenge des medizinischen Verneblers meist auf weniger als 1 ml Restmenge aufgebraucht war, war nach maximal 40 Minuten die poröse Scheibe des Bubble-Burst-Generators mit ansteigender Flüssigkeit durch nicht vernebelte und sich an den Gefäßwänden niederschlagende Tropfen, überspült und nicht mehr funktionsfähig. Damit scheint der medizinische Vernebler in der Anwendung das geeignetere Verfahren zu sein. Außerdem ist er das deutlich günstigere und in der Handhabung einfachere Gerät. In der Prüfkammer ließen sich

beide Verneblertypen deutlich länger betreiben als im Prüfkanal. In dieser wurden die zur Verfügung stehenden Reservoirs an Surrogatsuspension schneller aufgebraucht bzw. war der Behälter schneller mit nicht vernebelter Suspension gefüllt. Dies lässt sich mit dem in dem Prüfkanal herrschenden Unterdruck begründen.

Die Größenverteilung der Ultrafeinpartikel in der Prüfkammer verschob sich bei beiden Verneblertypen (Abbildung 6 und Abbildung 7) im Laufe einer 90-minütigen Abklingzeit leicht zu größeren Partikeldurchmessern, unabhängig davon, welche Surrogate vernebelt wurden. Unmittelbar nach Vernebelung mit dem Bubble-Burst-Generator waren 93 % der Ultrafeinpartikel größer als 30 nm, konnten also einen oder mehrere der ca. 30 nm durchmessenden MS2-Phagen enthalten. Bei Vernebelung mit dem medizinischen Vernebler galt das für 84 % der Ultrafeinpartikel. Das initiale Größenspektrum des medizinischen Verneblers unmittelbar nach Dosierungsende war bei allen verwendeten Surrogaten recht ähnlich und variierte im Peak (größter prozentualer Anteil je Größenkanal) zwischen 45,4 nm und 60,4 nm (Abbildung 8). Der Bubble-Burst-Generator hatte dabei ein engeres Spektrum an Partikeldurchmessern als der medizinische Vernebler (Abbildung 7). Die Partikelanzahl, die generiert werden konnte, war beim medizinischen Vernebler höher.

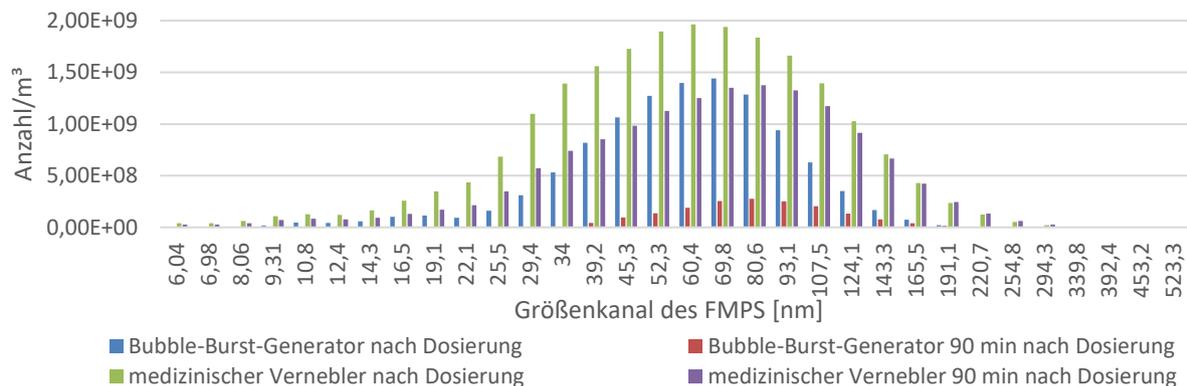


Abbildung 6: Ultrafeinpartikelanzahl und -größenverteilung nach Vernebelung von MS2-Phagen mit zwei verschiedenen Bioaerosolgeneratoren in der Prüfkammer.

Um zu zeigen, dass das gewählte Prüfverfahren im Hinblick auf mögliche zukünftige Infektionsgeschehen auch auf andere luftgetragene Pathogene übertragen werden kann, wurden *Staphylococcus xylosus* als Surrogate für luftgetragene Bakterien eingesetzt (s. 4.4). Dies ist insbesondere für die Bioaerosolherstellung, aber auch für die Sammelverfahren aufgrund der unterschiedlichen Partikelgrößenklassen von Bedeutung.

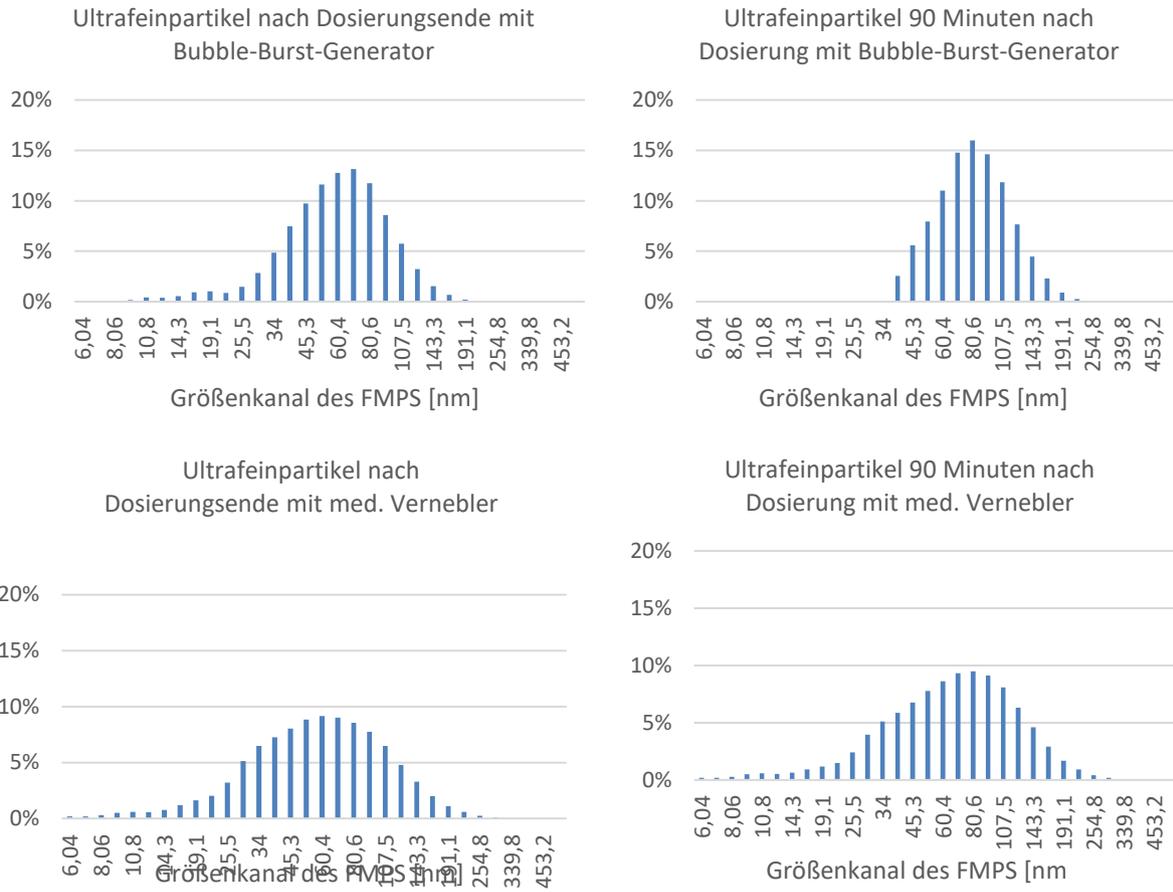


Abbildung 7: Vergleich der Größenverteilung der von zwei verschiedenen Bioaerosolgeneratoren erzeugten Ultrafeinpartikel direkt nach Vernebelung von MS2-Phagen und nach 90 Minuten Abklingzeit in der Prüfkammer

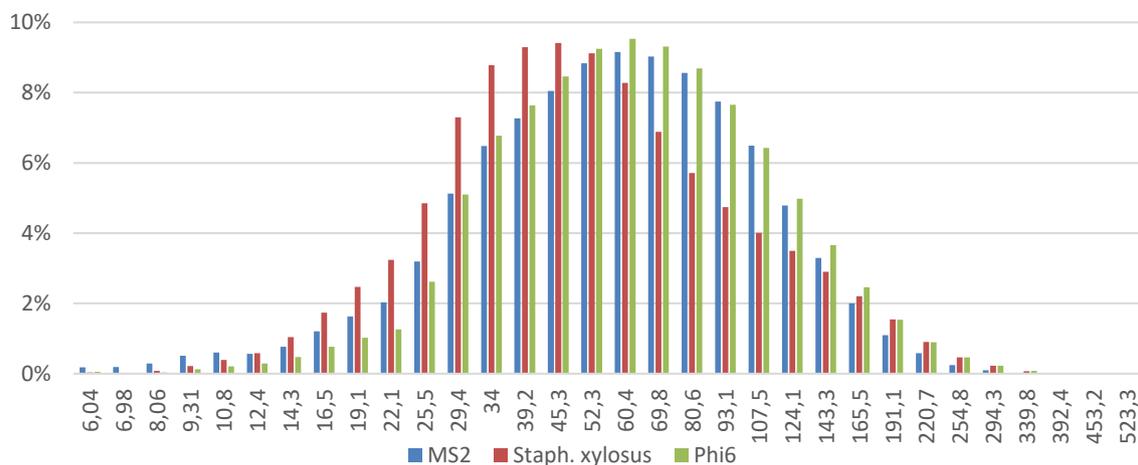


Abbildung 8: Größenverteilung der Ultrafeinpartikel in der Kammerluft unmittelbar nach Ende der Surrogatdosierung bei Vernebelung von MS2-Phagen, Staphylococcus xylosum oder Phi 6-Phagen mit dem medizinischen Vernebler.

Bei der Anzahl der generierten Feinpartikel konnte keine Verschiebung des Spektrums zu größeren Partikeldurchmessern nach 90 Minuten Abklingzeit festgestellt werden. Die Partikelzahlen sanken in allen Größenfraktionen gleichmäßig ab (Abbildung 9). Auffällig ist, dass die Partikelzahlen bei zudosierter Phi6-Lösung insgesamt eine Log-Stufe höher lagen als für MS2-Suspension. Dies kann mit einem höheren Anteil an Festbestandteilen in der für phi6 verwendeten Pufferlösung begründet werden.

Der große Unterschied im Durchmesser der eingesetzten Surrogate scheint einen deutlich geringeren Einfluss auf das Partikelgrößenspektrum zu haben, auch wenn die Anzahl größerer Feinpartikel bei *Staphylococcus* im Vergleich zu MS2 etwas höher ist. Dies ist vor allem bei Korrelationsberechnungen zwischen Partikelanzahl (UFP oder FP) und PFU/CFU oder RNA/DNA Kopiezahlen zu beachten, da ein Großteil der Partikel anscheinend kein Surrogat enthält.

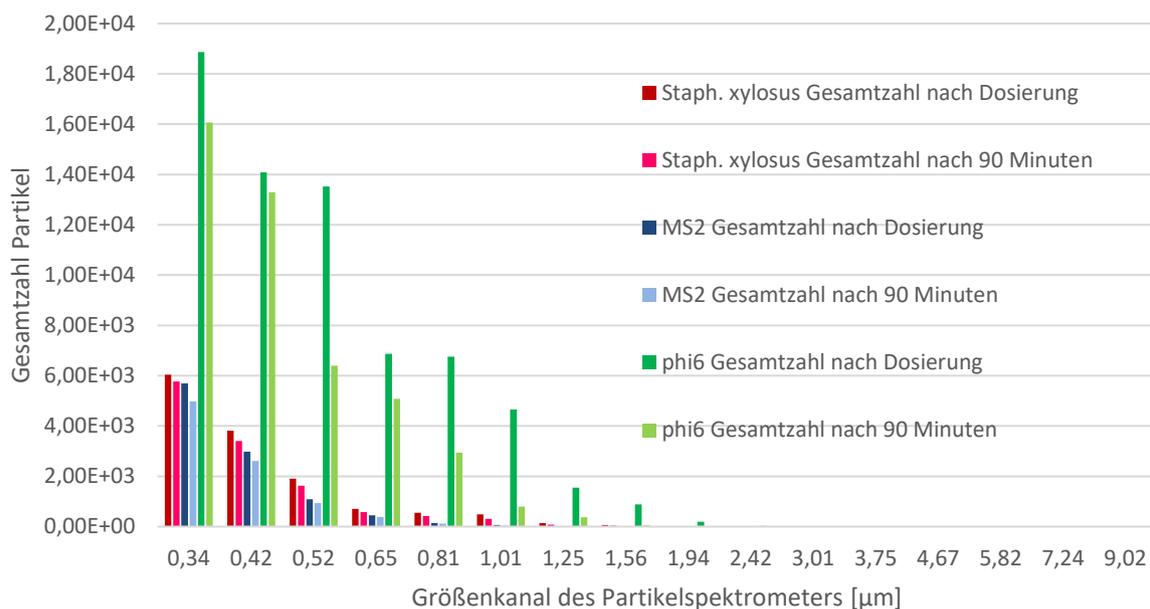


Abbildung 9: Größenverteilung der Feinpartikel in der Kammerluft unmittelbar nach Ende der Surrogatdosierung bei Vernebelung von MS2-Phagen, Staphylococcus xylosus oder Phi 6-Phagen mit dem medizinischen Vernebler, Ergebnisse des Optischen Partikelgrößensmessgeräts (OPS)

4.6. Sammel- und Nachweisverfahren (AP 3)

Messverfahren für die Wiederfindung der aerosolisierten Viren und die Bestimmung der Virenreduktion während und nach Einsatz der Luftreiniger waren Bestandteil von AP 3. Anhand der erhaltenen Ergebnisse zu den Sammelverfahren in Prüfkanal und Prüfkammer sollte das zuverlässigste und im Hinblick auf die Durchführung einfachste/praxisnächste Verfahren ausgewählt werden (AP 3e). Phagen und Bakterienkonzentrationen wurden in Kultur-Verfahren

aus gesammelten Luftproben ermittelt. Die Sammlung der Viren fand in pufferbefüllten Impingern, mit Fliehkraftabscheidern (Coriolis® μ) und auf Filter (GSP-, IOM- Messköpfe, ViraPore-Filterkassetten) statt. Für MS2 wurden die AGI-30 mit 30 ml PBS gefüllt, für Phi6 wurden 30 ml SM-Puffer mit Gelatine vorbereitet. Je nach Aufbau des Impingers musste hier beachtet werden, dass das SMG stärker Blasen schlägt und eventuell eine Anpassung der Durchlaufmenge erforderlich wurde. Hinter dem ersten Impinger wurde eine zweite Waschflasche mit Ethanol-Glycerin-Lösung angeschlossen, um durch den ersten Impinger durchschlagende Surrogate abzuscheiden und zu inaktivieren. Die Luftprobenahme erfolgte aktiv mit Hilfe einer Vakuumpumpe mit einer Durchflussrate von 11 l/min und einem Probenahmenvolumen von 165 Litern l. Vorversuche hatten ergeben, dass ein Durchfluss leicht unter der für AGI30 vorgesehenen Durchflussrate von 12 l/min [46] die Durchlässigkeit für Phagen verringert. Wurden Bakterien als Prüfkomponenten eingesetzt, wurde die Durchflussrate auf 12 bis 12,5 l/min erhöht und durch die kritische Düse der AGI30 reguliert.

4.6.1. Probenahme in der Prüfkammer

Der Einlass der Impinger wurde mit einer durch Probenahmeports der Kammerwand geführten Edelstahlsonde so verlängert, dass die Ansaugöffnung 10 cm in die Prüfkammer hineinragte. In der Prüfkammer wurden IOM-, GSP- und die ViraPore-Filterköpfe mit einer Durchflussrate von 3,5 l/min betrieben. Im Gegensatz zur Out-Stack Anordnung des Prüfkanals konnten die Filterköpfe (ViraPore-Kassetten „open face“, IOM-Sammelköpfe) direkt im Luftraum der Prüfkammer positioniert werden. Dafür wurden sie jeweils durch die Probenahmeports eingeführt. Die Probenahme erfolgte aktiv mit einer Durchflussrate von 3,5 Litern pro Minute (SKC-Pumpen) und einem Probevolumen von 52,5 Litern. Die GSP-Filterköpfe waren zu breit, um vollständig durch die Probenahmeports der Prüfkammer geschoben zu werden und wurden nur so dicht wie möglich in den Ports positioniert und rückseitig abgedichtet.

In AP3 wurde Impingement als am besten geeignetes Sammelverfahren bewertet und daher für die aktive Probenahme von Bioaerosolen in der Prüfkammer verwendet. Insgesamt wurden in der Prüfkammer über 700 Bioaerosolproben mit Impingement entnommen.

Tabelle 3: Bioaerosolproben in der Prüfkammer

Probebezeichnung	Entnahmezeitpunkt	Anmerkung
Vernebler-Start	Stammlösung vor Surrogatdosierung	Konzentrationen sollten schon bekannt sein, hier wird der Einfluss des Verneblers auf die Konzentrationen geprüft
Blindwert	nach Aufbau, vor Surrogatdosierung	zur Überprüfung der vorangegangenen Desinfektion
T initial	nach Surrogatdosierung, vor Luftreinigerstart	Erfassung der Ausgangskonzentration, zusätzlich auch rechnerische Ausgangskonzentration aus Probe „Vernebler-Start“ und „Vernebler- Ende“ und vernebelter Menge Stammlösung (Ein- und Auswaage)
T 0	Minute 0 bis Minute 14	abnehmende Konzentrationen im zeitlichen Verlauf erfassen, mit laufendem Luftreiniger in Prüfung oder natürliche Reduktion „natural decay“ T0 bis T6 für CADR-Berechnung
T 1	Minute 15 bis Minute 29	
T 2	Minute 30 bis Minute 44	
T 3	Minute 45 bis Minute 59	
T 4	Minute 60 bis Minute 74	
T 5	Minute 75 bis Minute 89	
T 6	Minute 90 bis Minute 104	optional, Surrogatkonzentrationen möglicherweise schon unterhalb der unteren Nachweisgrenze zur längeren Verfolgung der Geräte-Emissionen
T 7	Minute 105 bis Minute 119	
T 8	Minute 120 bis Minute 134	
Vernebler-Ende	Stammlösung nach Surrogatdosierung in Vernebler-Reservoir	Nachweis gleichbleibender Konzentrationen, keine Aufkonzentration oder Verdünnung während des Dosierungsprozesses

Impinger und Filter wurden für jeweils 15 Minuten beaufschlagt. Vor der Dosierung wurde zunächst eine Probe für den Blindwert gezogen, anschließend folgte die 30minütige Zudosierung der Phagen oder Bakterien. Stickstoff- und Ozonmonitore sowie FMPS und OPS liefen kontinuierlich ab der Blindwertprobe. Die alle 10 bzw. alle 20 Sekunden erhaltenen Werte wurden mit einem sekundengenauen Zeitstempel versehen. Die Bioaerosolmessung aus der Kammerluft mit Impingern oder Filterköpfen erfolgte in direkt aufeinanderfolgenden Probenahmen im Anschluss an die Dosierung. In Tabelle 3 sind die standardmäßig entnommenen Bioaerosolproben in der Prüfkammer aufgeführt. Bei den Messreihen zur natürlichen Abklingrate begannen die Probenahmen direkt mit T0 und ebenso, wenn die technischen Voraussetzungen fehlten, den Luftreiniger von außen zu starten.

Die Probenahmezeiten wurden mit der entsprechenden Uhrzeit protokolliert, um die Bioaerosolproben den Partikel- und Gas-Proben zeitlich zuordnen zu können. Letztere wurden in tabellarischer Form mit den berechneten Mittelwerten für jeweils eine Minute aufgearbeitet, für die Bioaerosolproben ergaben Sammlung und mikrobiologische Analyse letztlich einen Mittelwert für jeweils 15 Minuten. Die Konzentrationen der Surrogate in der vernebelten Suspension wurden für jeden Messdurchgang mitbestimmt, indem Aliquots aus dem Vernebler vor und nach Dosierung mit analysiert wurden. So konnte auch nachgewiesen werden, dass keine Aufkonzentrierung der Surrogate in dem Vernebler auftritt und sie mit dem eingesetzten Vernebler in gleichmäßigen Mengenverhältnissen dosiert werden. Die mikrobiologische Analyse erfolgte in einem Labor der Schutzstufe 2 durch Auswiegen der Impingerlösungen und Überführung in Verdünnungsreihen, um auswertbare Konzentrationen zu erhalten. Für jede Probe wurden drei bis vier Verdünnungsstufen weiterbearbeitet. Dies entspricht einem Wertebereich von drei bis vier Zehnerpotenzen. Konnte ein Luftreiniger in seiner Effizienz nicht sicher eingeschätzt werden, wurden entsprechen mehr oder direkt alle Verdünnungsstufen von 10^0 bis 10^{-7} weiterbearbeitet. Die behandelten Proben wurden dann mit dem jeweiligen Wirtsorganismus für die Phagen in log-Phase zusammengeführt, im Zweischichtagar-Verfahren ausplattiert und für 24 Stunden bei 36 °C bebrütet. Anschließend konnten die Konzentrationen aktiver Phagen in der Probe durch Auszählung der Plaques bestimmt werden.

In einer zum ersten Vergleich der Sammelverfahren durchgeführten parallelen Luftprobenahme mit vier verschiedenen Sammelverfahren (Abbildung 10) zeigte sich eine eingeschränkte Anwendbarkeit des Coriolis® μ -Sammlers. Ohne verfügbare Sonde, um Luftproben durch die Probenahmeports der Kammer zu entnehmen, mussten die drei vorhandenen Coriolis® μ -Geräte in der Kammer stehen und über eine einprogrammierbare Startverzögerung in Reihe gesetzt werden. Das Probenahmevolumen betrug 500 Liter. Aufgrund der maximalen Startverzögerung von 100 Minuten und dem frühesten Start 30 Minuten nach Start der Dosierung für das erste Gerät (Minute 0) ergab sich ein Probenahme-Intervall von 30 Minuten, um die drei möglichen Probenahmen in der maximal abzudeckenden Zeit zu verteilen. Die durchgängig sehr geringe Wiederfindungsrate mit dem Coriolis® μ -Sammler (Abbildung 10) ließ vermuten, dass die Phagen mehrheitlich dem Luftstrom folgen und nicht in die Sammelflüssigkeit abgeschieden werden. Damit schien die die Fliehkraftabscheidung kein geeignetes Sammelverfahren für luftgetragene Viren zu sein. Aus diesem Grund wurde die Sammlung mit dem Coriolis® μ -Sammler nicht weiter optimiert und AP 3d beendet.

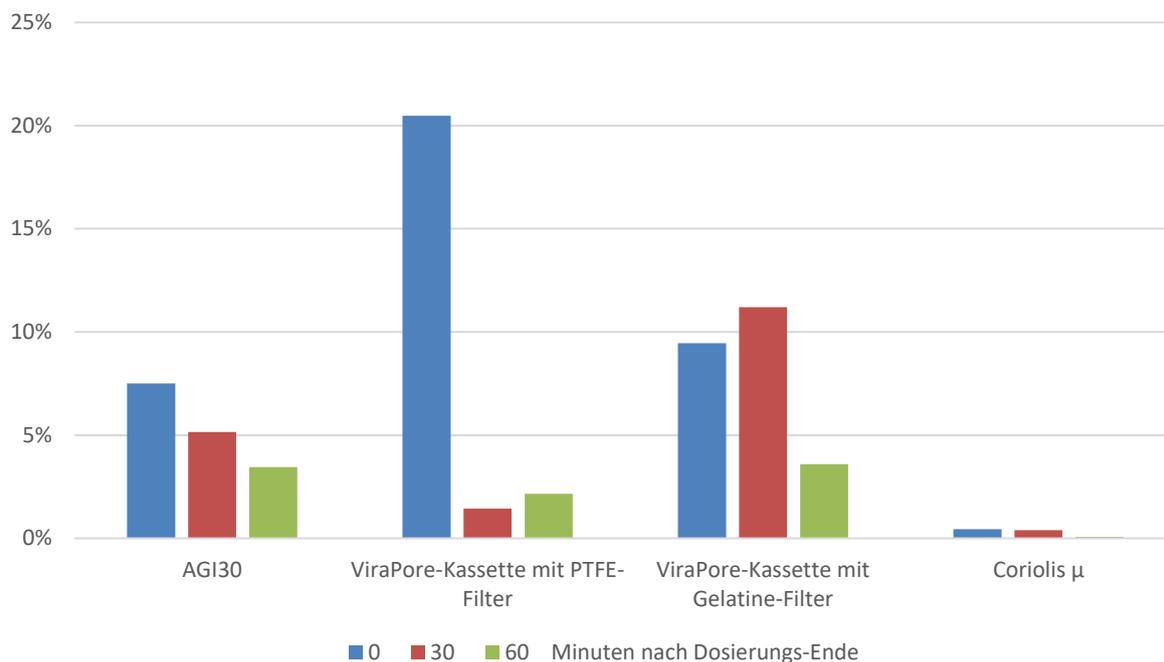


Abbildung 10: Erhaltene PFU/m³ MS2 als Prozentanteile der rechnerischen Ausgangskonzentration aus Parallelmessungen mit Impingern, Filtern und Fliehkraftabscheidern in der Prüfkammer in Modus 2 (ohne Umwälzung der Kammerluft) ohne laufenden Luftreiniger (natural decay)

Auch für das Impingement als Sammelmethode für Viren ist in der Literatur beschrieben, dass Phagen und auch Nanopartikel im Luftstrom verbleiben und nur in sehr geringem Maße in der Sammelflüssigkeit abgeschieden werden [47, 48]. Nach den entsprechenden Vorversuchen wurde daher die Durchflussgeschwindigkeit für den AGI-30 Impinger auf 11 L/min gesenkt, um die Verweil- und Flüssigkeitskontaktdauer leicht zu erhöhen.

Mit der rechnerischen Ausgangskonzentration an MS2-Phagen in der Kammerluft konnte für alle Sammelmethoden eine Wiederfindungsrate zu T0 (Zeitpunkt unmittelbar nach Surrogat-Dosierung) bzw. Sammeleffizienz bestimmt werden. Abbildung 11 zeigt die Lage- und Streuungsmaße bei Sammlung auf Gelatinefilter, PTFE-Filter (Teflon-Filter) und in AGI30 Impinger. Bei Teflon- und Gelatinefiltern schwankten die erhaltenen Konzentrationen PFU/m³ in einem weiteren Bereich, während Impingement-Ergebnisse weniger streuten. Da die Fliehkraftabscheider keine verwertbaren Resultate lieferten, wurden sie nur einmal vergleichend zur Sammlung eingesetzt. Die drei Filterkopf-Systeme IOM-Filterkopf, GSP-Filterkopf und ViraPore-Kassette zeigten keinen Unterschied in den abgeschiedenen PFU-Konzentrationen, daher wurden Gelatine- und PTFE-Filter vergleichend mit einbezogen.

In Abbildung 12 sind exemplarisch die Konzentrationsverläufe von MS2 in der Prüfkammer in Modus 2 mit laufendem Luftreiniger gezeigt. In dieser Beispielmessung sind die Ergebnisse für Ausgangskonzentration (Ti) und Endkonzentration (T6) zwar (zufällig) ähnlich, der Kurvenverlauf ist aber sehr unterschiedlich und schwankt bei den beiden Filtersystemen stark.

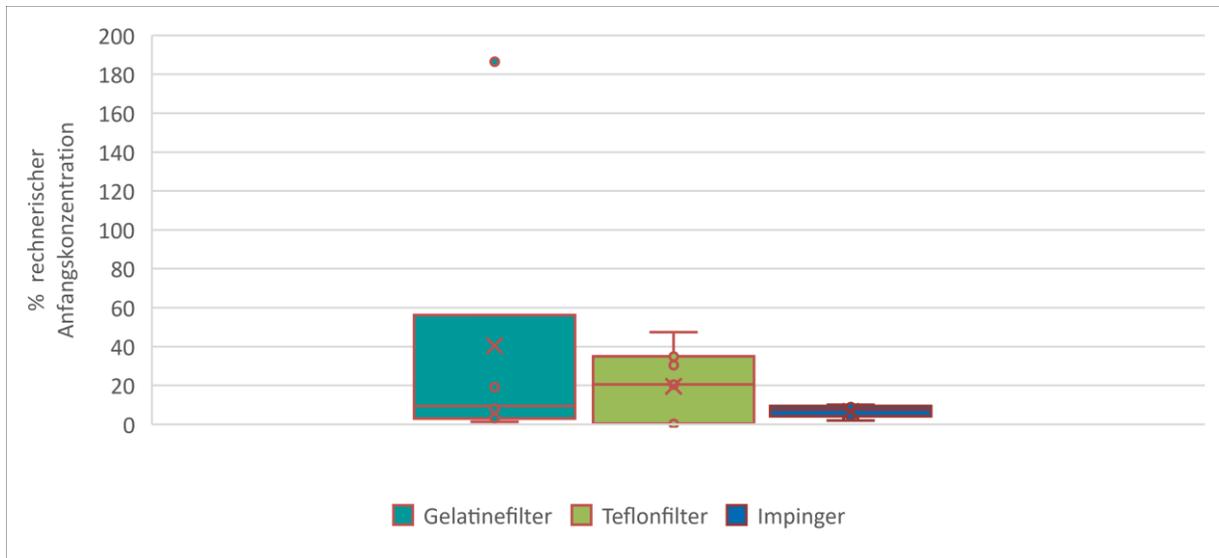


Abbildung 11: Wiederfundrate MS2-Phagen in 30m³-Kammer zu Probenahmezeitpunkt T0; Lage- und Streuungsmaße aus allen „natural decay“-Messungen in Modus 2 (ohne Umwälzung der Kammerluft)

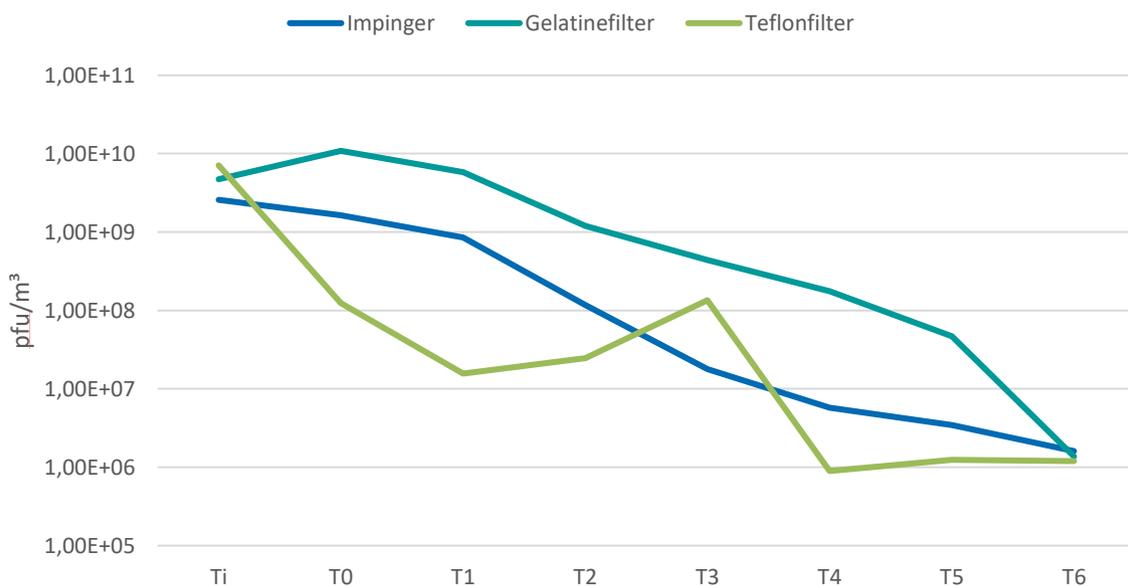


Abbildung 12: mit drei verschiedenen Sammelmethode erhaltene Konzentrationsverläufe PFU/m³ MS2 in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger

Die mit Impingement erhaltenen Ergebnisse zeigten eine kontinuierliche Reduktion. Dies galt für alle Messreihen mit Impingement. Trotz der niedrigen Sammeleffizienz konnten mit Impingement gut reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Dies erleichterte bei Wiederholungsmessungen auch die genauere Einschätzung der erforderlichen Verdünnungsstufen, so dass Impingement für Prüfkammer und Prüfkanal die Sammelmethode der Wahl darstellte.

4.6.2. Probenahme im Prüfkanal

Für die Prüfkanalmessungen befand sich zum Anschluss an die jeweiligen Sammeleinheiten eine fest verbaute gekrümmte Edelstahlsonde mittig im Luftstrom (s. a. Abbildung 3). Die Probenahme im Prüfkanal mit den Filtern erfolgte abweichend zu den Prüfkammer-Messungen bei 5 l/min. Die übrigen Mess- und Probenaufbereitungsverfahren entsprachen denen der Prüfkammer-Messungen.

In allen im Prüfkanal entnommenen Proben wurden, zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Sammelverfahren und zur Darstellung von Abweichungen des jeweiligen Sammelverfahrens, sowohl die PFU- als auch RNA Konzentrationen gemessen. Daraus konnten dann Anwendungsempfehlungen für die in der Praxis einsetzbaren Verfahren abgeleitet werden. Die Untersuchungen im Prüfkanal zeigten, dass im bewegten Luftstrom das Impingement signifikant höhere Ausbeuten an kultivierbaren MS2- und Phi6-Viren (Mediane) gegenüber Gelatinefiltern aufwies (Abbildungen 13 bis 16).

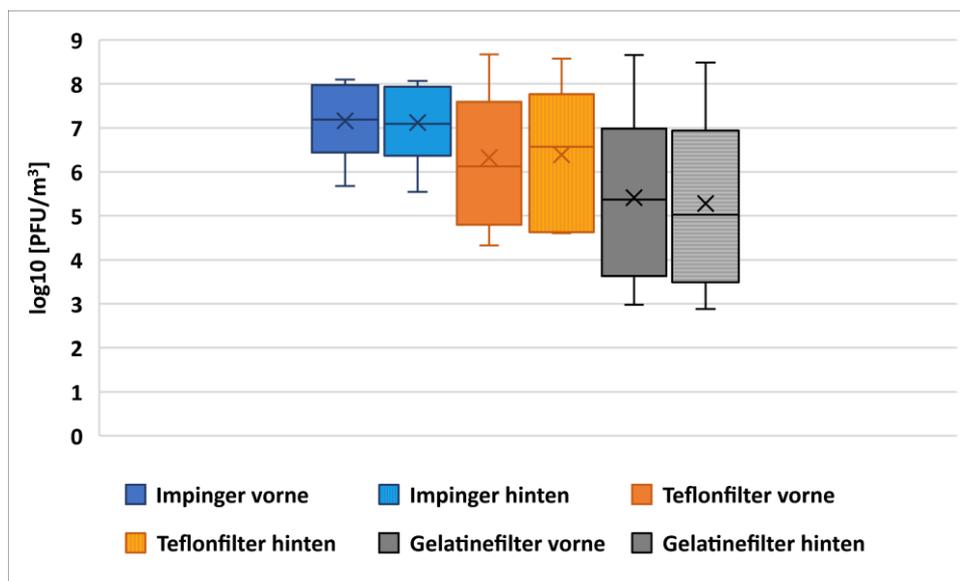


Abbildung 13: Konzentrationen von MS2 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.

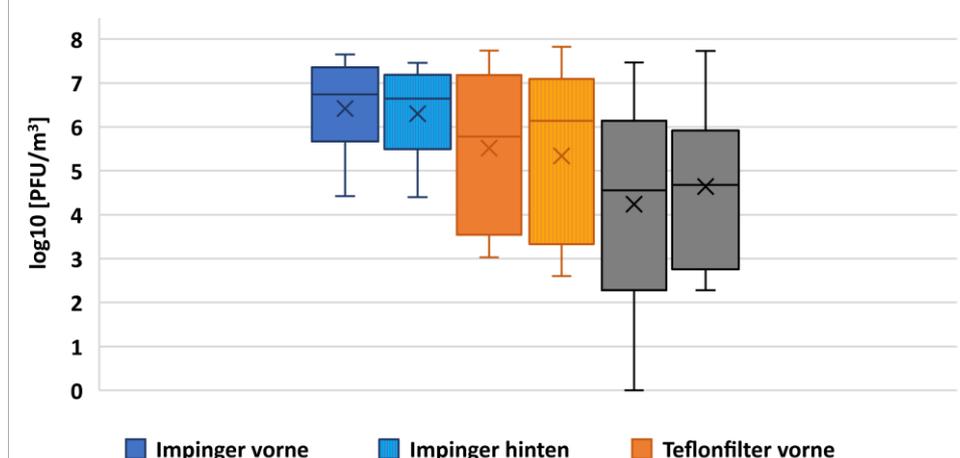


Abbildung 14: Konzentrationen von MS2 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.

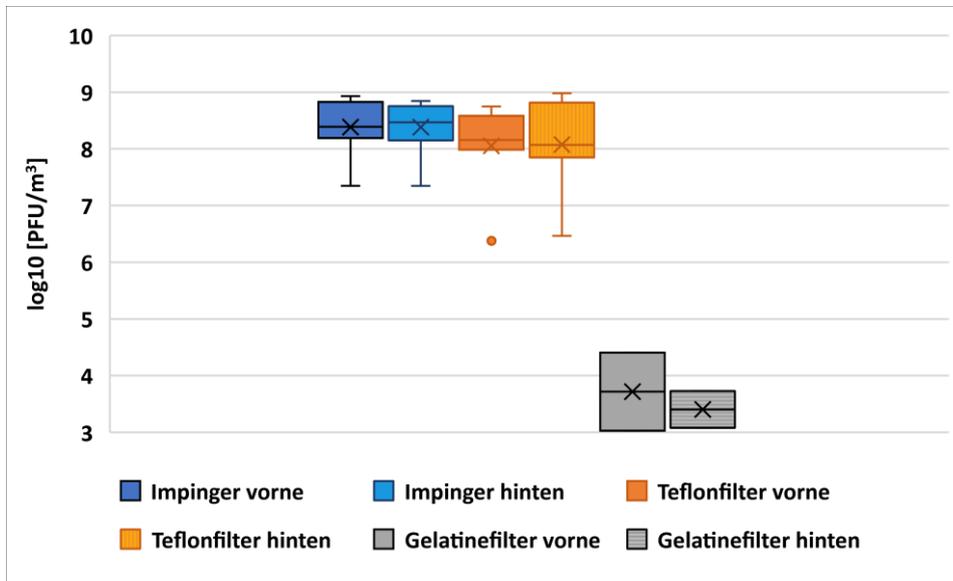


Abbildung 15: Konzentrationen von Phi6 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.

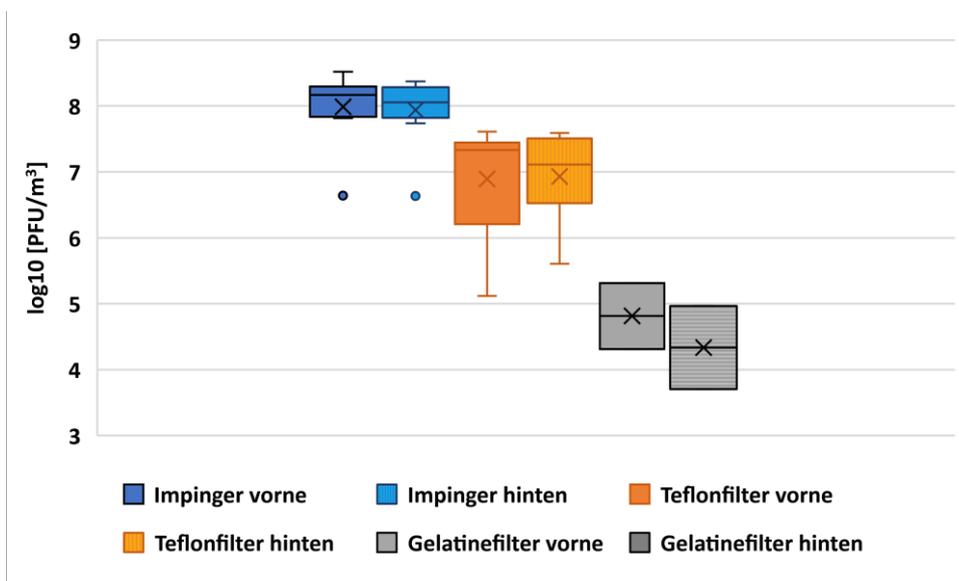


Abbildung 16: Konzentrationen von Phi6 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.

Zudem waren beim Impingement im Vergleich zu den Filtrationsverfahren die Abweichungen der Messwerte zum Median deutlich geringer. Die Gelatinefilter wurden in Filterhalter eingelegt, deren Erfassungskegel in Ausmaß und Durchmesser des Lufteintrittes dem Erfassungskegel des Probenahmekopfes GSP 3,5 (DGUV) entsprach. Ob die Sammeltechnik, der Sammelstress oder die Rückgewinnung der Viren bei der Aufarbeitung der Filter einen Einfluss auf die Konzentrationen kultivierbarer Viruspartikel nahmen, ist nicht klar. Die Mediane in den Abbildungen 17 bis 20 deuten an, dass die Anzahl der RNA Kopien aus den Gelatinefilter eher auf dem gleichen Niveau liegen, wie die Anzahlen aus den Impingern. Das könnte zumindest ein Hinweis darauf sein, dass die Anzahl der gesammelten Viruspartikel auf den Gelatinefiltern

verhältnismäßig ähnlich war und die Diskrepanz nicht wesentlich durch Sammeleffizienz von Partikeln beeinflusst wurde. Das Impingement schien höhere kultivierbare Viruszahlen gemessen zu haben (Mediane), als Kassetten von ViraPore, die mit Teflonfiltern ausgestattet waren (Abbildung 13 bis Abbildung 16).

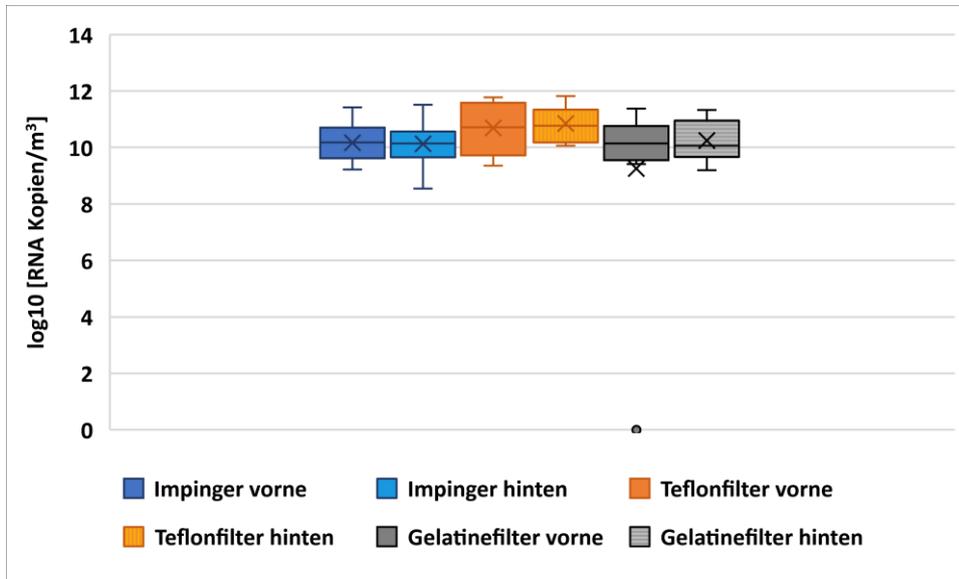


Abbildung 18: Konzentrationen von MS2 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.

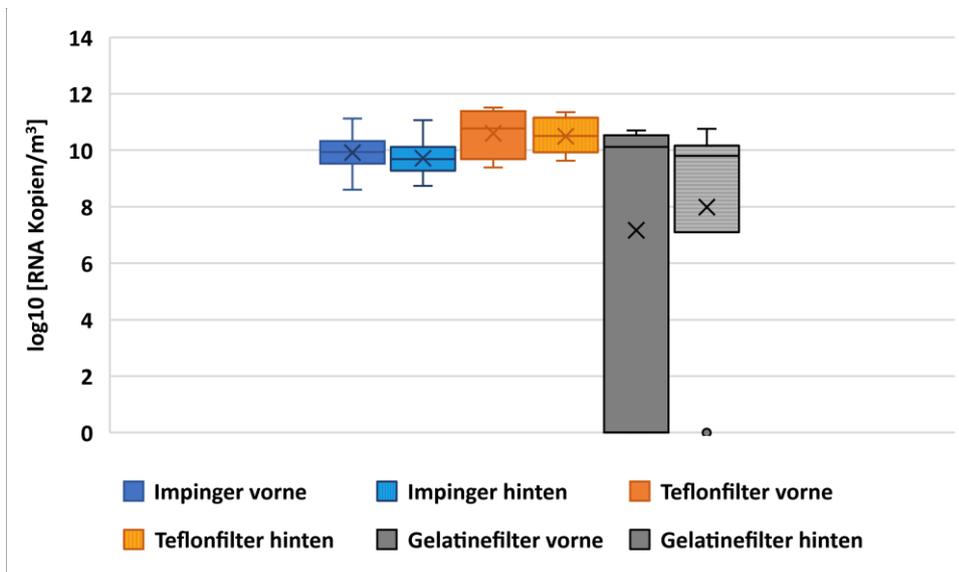


Abbildung 17: Konzentrationen von MS2 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.

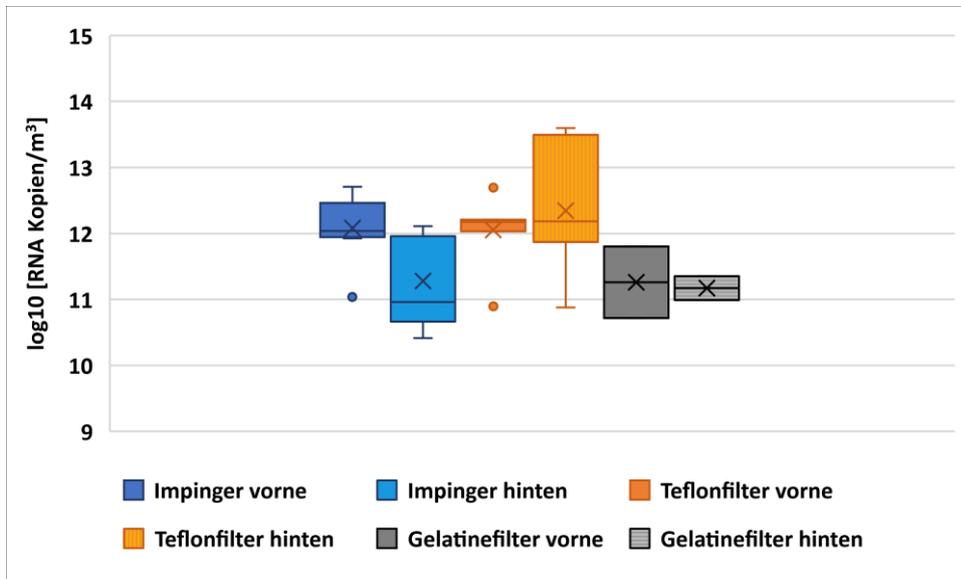


Abbildung 19: Konzentrationen von Phi6 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.

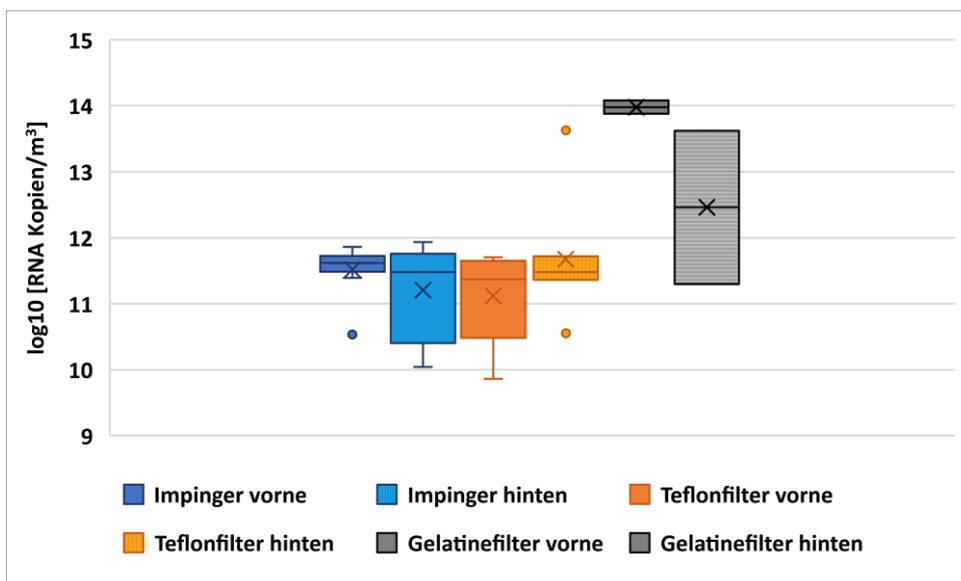


Abbildung 20: Konzentrationen von Phi6 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.

Allerdings waren die Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% lediglich bei einem Luftstrom von 3 m/s und dem Surrogat Phi6 signifikant (Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich der Probenahmeverfahren an zwei Messorten (v = vorne; h = hinten) und bei zwei verschiedenen Luftgeschwindigkeiten im Prüfkanal. Ergebnisse mit signifikanten Unterschieden bei Anwendung des Kruskal Wallis Test mit anschließendem post-hoc Dunn's Test (Signifikanz bei $P < 0,05$). Signifikant höhere Ausbeuten sind in roter Schrift dargestellt.

Einheit; Geschw.	Probenahme	Median	Probenahme	Median	P-Wert
MS2 PFU/m ³ ; 1m/s	Impinger v	15.500.000	Gelatine v	738.950	0.01147
MS2 PFU/m ³ ; 1m/s	Impinger h	12.300.000	Gelatine h	466.100	0.009969
MS2 PFU/m ³ ; 3m/s	Impinger v	5.480.000	Gelatine v	72.665	0.006134
MS2 PFU/m ³ ; 3m/s	Impinger h	4.430.000	Gelatine h	185.645	0.02952
Phi6 PFU/m ³ ; 3m/s	Impinger v	147.000.000	Teflon v	21.500.000	0.004113
Phi6 PFU/m ³ ; 3m/s	Impinger h	113.000.000	Teflon h	12.900.000	0.004718
MS2 RNA Kopien/m ³ ; 1m/s	Impinger h	13.800.000.000	Teflon h	58.800.000.000	0.01622
MS2 RNA Kopien /m ³ ; 3m/s	Impinger v	8.610.000.000	Teflon v	58.900.000.000	0.02397
MS2 RNA Kopien /m ³ ; 3m/s	Impinger h	4.870.000.000	Teflon h	32.300.000.000	0.003276
Phi6 RNA Kopien/m ³ ; 1m/s	Impinger h	91.500.000.000	Teflon h	1.520.000.000.000	0.005054

Vergleiche der RNA-Kopiezahlen zwischen den Impingern und den Filterkassetten zeigten zudem, dass Teflonfilter teilweise signifikant höhere RNA Ausbeuten lieferten als der Impinger. Dies konnte für beide Surrogate gezeigt werden. Zur Beurteilung der Ergebnisse der Virus- und der RNA-Messungen wurden im Vorfeld bei ähnlichem Versuchsaufbau Partikelmessungen im

Luftstrom vor und während der Vernebelung durchgeführt. Durch die rasche Austrocknung der vernebelten Tröpfchen waren keine Anstiege in Partikelgrößen der Fraktionen $> 3,0 \mu\text{m}$ erkennbar. Bei Annahme von Partikeln, z. B. der Größe $3 \mu\text{m}$ (aerodynamischer Durchmesser), dem Düsenquerschnitt der Probenahmesonde ($0,09 \text{ m}$), der mit ca. 0° Abweichung zum Luftstrom stand, und den eingestellten Luftgeschwindigkeiten, liegt die Stokes Zahl deutlich unter $0,01$. Mit der Stokes Zahl wird angegeben, wie stark eine Partikel aufgrund seiner Trägheit Strömungen abweicht, wenn es einer Änderung der Strömungsrichtung oder -geschwindigkeit ausgesetzt ist. Eine Stokes Zahl von unter 1 bedeutet, dass Partikel der Strömung gut folgen, ohne stark abzulenken. Eine Anpassung der Einsauggeschwindigkeiten für eine isokinetische Probenahme war daher nicht nötig. Auch Verluste durch Impaktion an Kanal- oder Sondenwänden sind bei so kleinen Partikeln vernachlässigbar. Während der Untersuchungen im Prüfkanal wurden die Nanopartikelkonzentrationen bis zur unteren Grenze von 4 nm (aerodynamischer Durchmesser) an beiden Messpositionen erfasst. Für den Phagen MS2 konnten mittlere bis gute Korrelationen (signifikant nach Kendalls τ) zwischen Nanopartikeln und PFU sowie Nanopartikeln und RNA Kopien bei beiden Luftgeschwindigkeiten beobachtet werden. Bei den Untersuchungen mit Phi6 als Surrogat konnten solche Korrelationen nicht beobachtet werden. Phi6 wurde aus einer Pufferlösung mit Salzen und Proteinzusatz vernebelt (s. 4.5), während MS2 aus reinem Wasser freigesetzt wurde. Vermutlich haben Einflüsse durch die verschiedenen Suspensionen die Partikelbildung und Anzahlen beeinflusst. Die Nanopartikelzahlen lagen beispielsweise bei der Vernebelung von Phi6 etwa eine Log-Stufe höher, was wahrscheinlich durch die Festbestandteile der Pufferlösung verursacht wurde. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse des Feinpartikelspektrums in der Prüfkammer bei Vernebelung von phi6-Stammlösung im Vergleich zu den anderen Surrogaten gestützt (s.a. Abbildung 9). Etwaige Einflüsse, sei es bei Messungen im Prüfkanal oder in der Prüfkammer, müssen beachtet werden, wenn ein Zusammenhang zwischen Partikelfraktionen und Viruskonzentrationen untersucht werden soll.

4.7. Emissionsprüfungen

Die Überprüfung möglicher sekundärer Emissionen der Geräte fand für die Parameter Ozon und Stickoxide während des Betriebs der Luftreiniger in der Prüfkammer statt. Die hier aufgeführten Ergebnisse wurden aus Messungen in Modus 2 (ohne zusätzliche Umwälzung der Kammerluft) und mit MS2-Phagen als Surrogat erhalten. Es gab keinen Unterschied zu Werten aus Messungen mit anderen Surrogaten. In Modus 1 (mit kontinuierlicher Umwälzung der Kammerluft zusätzlich zur Luftbewegung des Luftreinigers) fielen die Konzentrationen beider Parameter erwartungsgemäß etwas niedriger aus. Andere Messungen, wie zum Beispiel die Erhebung des Schalldruckpegels, konnten in der Edelstahl-Prüfkammer nicht sinnvoll durchgeführt werden. Auch Messungen zu UV-Strahlung und Zugluft wurden aus Gründen der leichteren Zugänglichkeit zu allen Seiten der Geräte in einem möblierten Testraum (90 m^3) durchgeführt.

4.7.1. Ozon

Ozon ist ein sehr reaktives Molekül, das mit allen biologischen Systemen reagiert. Ozon beeinflusst Struktur und Funktion des menschlichen Atemtrakts in vielfältiger Weise und ist insbesondere bei hohen Konzentrationen mit negativen Effekten assoziiert [49]. Seine schädigende Wirkung auf niedere Organismen, wie Bakterien, wird auch zu Desinfektionszwecken genutzt. Es kann an Zell- oder Gewebsmembranen Permeabilitätsänderungen verursachen und durch die Reaktion mit verschiedenen Biomolekülen zur Freisetzung von Wasserstoffperoxid, Singulett-Sauerstoff und Aldehyden führen, die dann ihre spezifische toxische Wirkung auf die Zellen entfalten. Zusätzlich können funktionelle Gruppen in Biomolekülen oxidiert und Radikale oder andere reaktive Zwischenprodukte gebildet werden, die eine Lipidperoxidation initiieren, die Zellmembranstruktur verändern oder zerstören, Entzündungen induzieren und sekundäre hormonale Effekte hervorrufen können [50].

In Deutschland gilt aktuell kein verbindlicher Arbeitsplatzgrenzwert (AGW, früher: Maximale Arbeitsplatzkonzentration MAK) für Ozon, da Ozon nicht in der TRGS 900 aufgeführt ist und kein verbindlicher Grenzwert der EU zu Ozon zu beachten ist. Die TRGS 402 "Ermitteln und Beurteilen der Gefährdungen bei Tätigkeiten mit Gefahrstoffen: Inhalative Exposition" führt dazu aus: „Bei Stoffen ohne einen verbindlichen Grenzwert müssen zur Bewertung der Exposition und zur Überprüfung der Wirksamkeit der Schutzmaßnahmen andere Beurteilungsmaßstäbe herangezogen werden.“ Und laut LASI-Leitlinie 45 [51] können, soweit kein verbindlicher Grenzwert veröffentlicht ist, als Beurteilungsmaßstab auch andere geeignete Grenzwerte herangezogen werden.

Ozon wird durch seinen intensiven Geruch schon in geringsten Konzentrationen wahrgenommen. Die Geruchsschwelle liegt bei etwa 0,02 ppm. Eine Reihe von effektiven Schutzmechanismen (enzymatische Reaktionen, reduktiv wirkende Stoffe und Radikalfänger) scheinen den ausgeprägten oxidativen Stress, der durch Ozon hervorgerufen wird, bis zu einer gewissen Konzentration vermindern zu können, so dass hohe Konzentrationen erforderlich sind, um systemische Wirkungen hervorzurufen [52]. Neben den systemischen Wirkungen sind aber bereits bei niedrigeren Konzentrationen (100 bis 200 ppb) außer der Geruchsbelästigung auch Schleimhautreizungen und Lungenfunktionsveränderungen beschrieben [49]. Eine aus der reversiblen Lungenfunktionseinschränkung resultierende Abnahme der maximalen körperlichen Leistungsfähigkeit war bereits bei Konzentrationen > 120 ppb, insbesondere bei Frauen, nachweisbar [53]. Ozon-Konzentrationen zwischen 1 und 5 ppm verursachen bereits nach kurzer Expositionszeit Schädigungen der Augenbindehaut und der Schleimhäute des oberen Atemtraktes sowie des Alveolarepithels. Bei längeren Expositionen (2h) konnten auch schon bei niedrigeren Konzentrationen (400 - 500 ppb) Proteine, Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren in der Nasen- und Lungenflüssigkeit nachgewiesen werden [52]. Als niedrigste letale Konzentration für den Menschen wurden 50 ppm/60 min) publiziert [54]. Eine kontinuierliche Exposition führte im Tierexperiment zu geringeren Veränderungen als eine intermittierende (sogar geringere) inhalative Belastung gegenüber Ozon [52].

Das Umweltbundesamt (UBA) legt für Ozon in der Außenluft einen maximalen 8-Stunden-Wert von 60 ppb fest, der an höchstens 25 Tagen pro Kalenderjahr, gemittelt über drei Jahre,

überschritten werden darf. Das UBA empfiehlt aber, dass es langfristig überhaupt keine Überschreitung dieses Wertes geben sollte. Ab einem Wert von 90 ppb muss die Bevölkerung informiert, ab 120 ppb muss Ozonalarm ausgelöst werden. Der früher für Arbeitsplätze geltende MAK-Wert von 100 ppb oder der von der OSHA (Occupational Safety and Health Agency) festgelegte Grenzwert von 80 ppb können ebenfalls als unverbindlicher Orientierungswert herangezogen werden. Für Büro-Arbeitsplätze sollte allerdings der maximale 8-Stunden-Wert des Umweltbundesamtes von 60 ppb beachtet werden.

Ozon (O_3) bildet sich aus Sauerstoff, z. B. durch Einwirkung von UV-Strahlung, bei sehr hohen Temperaturen und bei hohen elektrischen Entladungen. Bei den im Projekt untersuchten Geräten wurde Ozon durch Verwendung einer UV-C Quelle in Verbindung mit einem Katalysator (Titandioxid) produziert. Zudem waren unter den Geräten auch Plasmageneratoren und Ionisatoren, bei denen Ozon als (unerwünschtes) Nebenprodukt entstehen könnte. Zum Zeitpunkt der Anschaffung wurde eines der beiden Geräte nur mit der Produktion von Hydroxylradikalen und deren Wirksamkeit beworben. Mittlerweile ist auch die Produktion von Ozon Bestandteil der Produktdokumentation.

Die Ozon-Konzentrationen in der Prüfkammer-Luft wurden mit dem Ozon Analysator (APOA 370, Horiba Europe GmbH) bestimmt. Dieser arbeitet nach dem Prinzip der UV-Absorption. Die zeitliche Auflösung betrug 10 Sekunden bei einem Probenahmefluss von etwa 0,8 L/min.

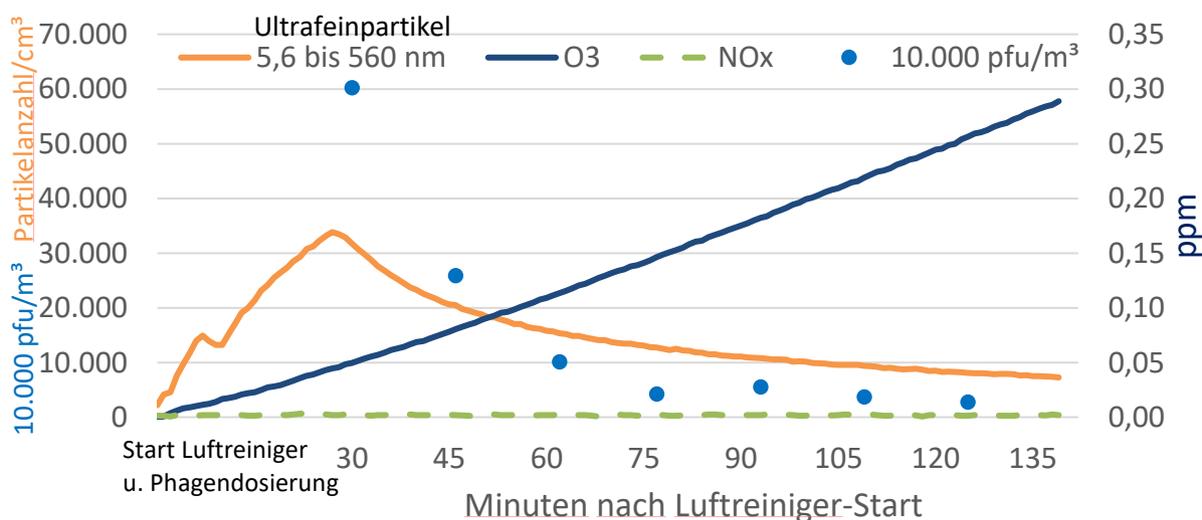


Abbildung 21: Konzentrationsverläufe von Ultrafeinpartikeln, Ozon, Stickoxiden und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Ozongenerator)

Die Wasserlöslichkeit von Ozon wird im Vergleich zu anderen Reizgasen einerseits und Sauerstoff andererseits sehr unterschiedlich eingeschätzt [55]. Aufgrund der möglichen hohen Ozonkonzentration in der Probenahmeluft stellte sich im Hinblick auf die verschiedenen Sammelverfahren mit trockener oder nasser Deposition die Frage, ob dort das Ozon während und nach der Sammlung noch unterschiedlich stark nachwirken kann. Zur Klärung dieser Frage,

wurden 1,5 ml MS2-Phagen-Suspension in einer kleineren 1 m³-Kammer vernebelt und anschließend ohne laufenden Luftreiniger (Natural Decay) parallel Proben mit Impingern, Teflon- und Gelatine-Filtern entnommen. Da in der kleineren Kammer damit die 5 bis 6fache Phagenkonzentration (im Vergleich zur 30 m³ Kammer) vorlag und viele Luftproben gleichzeitig entnommen wurden, wurde die Sammelzeit auf 5 Minuten beschränkt. Die Durchflussgeschwindigkeit wurde wie bei den Kammermessungen auf 11 L/min für die Impinger und auf 3,5 L/min für die Filterköpfe eingestellt. Die so bereits vorab quantitativ gleich mit Phagen beaufschlagten Sammelmedien wurden anschließend einer weiteren Luftprobenahme aus der 30m³-Kammer ohne Luftreiniger und ohne Surrogate aber mit etwa 200 ppb Ozon in der Kammerluft zugeführt. Jeweils eine beaufschlagte Probe von jedem Sammelmedium wurde davon entnommen. Die Probenahmedauer betrug hier wieder 15 Minuten. Die Ergebnisse sind Abbildung 22 zu entnehmen. Wie im Vergleich der Sammelmethode auch bereits beschrieben, zeigen die mit Impingement ermittelten Konzentrationen einen, der natural decay entsprechenden stetig abnehmenden Verlauf.

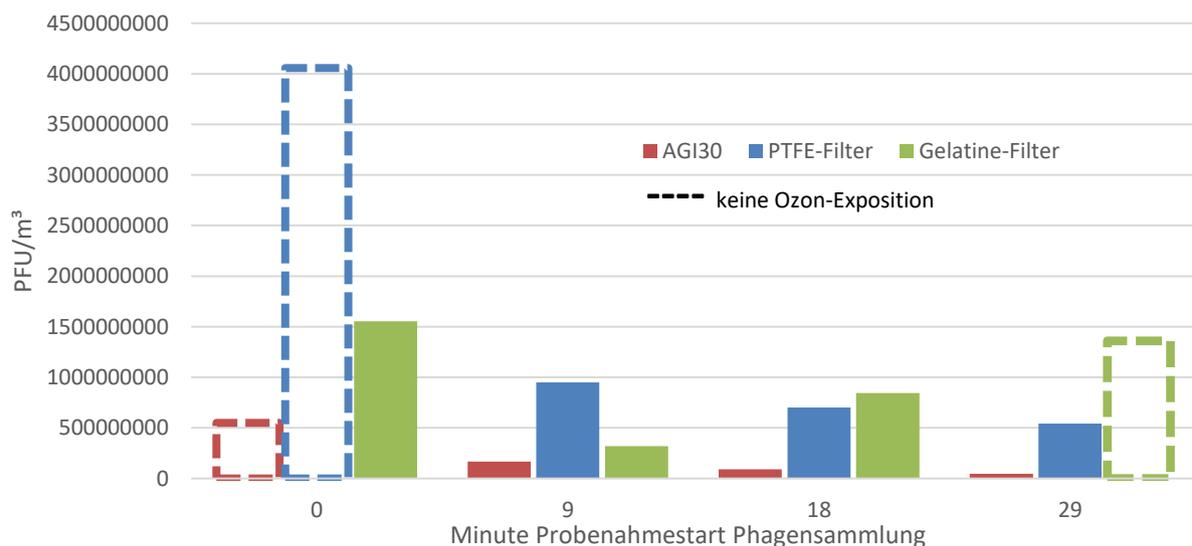


Abbildung 22: Konzentrationen luftgetragener MS2-Phagen (Kammer ohne Umwälzung, ohne Luftreiniger) anhand der Ergebnisse verschiedener Sammelmedien mit anschließender Ozon-Exposition

Dabei scheinen die Konzentrationen aber durch die nachträgliche Durchströmung des Sammelmediums mit Ozon-haltiger Kammerluft zusätzlich reduziert zu werden, da die Konzentrationen in regulären Natural Decay-Messreihen auf etwa 50 % des Startwertes abfallen (s. a. Abbildung 4). Diese Reduktion fällt für die trockene Sammlung auf dem PTFE-Filter stärker aus als für die Sammlung in wässriges Medium (AGI30). Bei der Prüfung von Luftreinigern welche Ozon in die Kammerluft emittieren, muss daher eine mögliche nachträgliche inaktivierende

Wirkung durch die Probenahme selbst – insbesondere bei Verwendung von Filterköpfen – berücksichtigt werden. Das Risiko einer Überschätzung der Wirksamkeit des geprüften Luftreinigers ist somit vorhanden, aber beim Einsatz von Impingement als Sammelmethode geringer.

Tabelle 5 zeigt die nach 90 Minuten Luftreinigerbetrieb maximal ermittelten Ozon-Konzentrationen in der Prüfkammer. Die höchsten Werte wurden mit 539 und 463 ppb erwartungsgemäß von zwei Geräten mit Ozonierung als Wirkprinzip erhalten. Ein bei dem dritten Gerät mit Ozonierung eingesetzter Aktivkohlefilter (Gerät g) scheint einer Freisetzung von Ozon in die Kammerluft entgegengewirkt zu haben.

Tabelle 5: maximal ermittelte Ozon-Konzentrationen in allen Prüfdurchgängen innerhalb von 90 Minuten für die 11 untersuchten Luftreiniger

Luft- reiniger	Wirkprinzip						O ₃ ppm
	Filtration (HEPA)	UV	Elektro- stat	Plasma- genera- tor /Ioni- sator	Ozon	Hydroxylgene- rator	
a	x			x			0,002
b		x					0,003
c		x					0,017
d		x					0,017
e					x		0,463
f			x				0,006
g	x	x	x	x	x		0,001
h	x	x		x			0,001
i	x					x	0,001
j	x	x					0,001
k					x	x	0,539

Ein geringer Anstieg der Ozonkonzentrationen war auch bei zwei weiteren UV-Strahlungs-basierten Geräten ohne weitere Filtrationseinheiten (Geräte c und d) sowie auch bei dem Elektrostaten (Gerät f) zu beobachten. Nach 90 Minuten Laufzeit lagen die Konzentrationen noch

weit unterhalb möglicher Orientierungswerte. Da die Konzentrationen in der statischen Prüfkammer aber stetig anstiegen (s. a. **Abbildung 21****Abbildung 23**) muss davon ausgegangen werden, dass im Dauerbetrieb dieser Luftreiniger weit höhere Konzentrationen erreicht werden können.

4.7.2. Stickoxide

Stickoxide oder Stickstoffoxide ist eine Sammelbezeichnung für die gasförmigen Oxide des Stickstoffs. In Bezug auf die Luftqualität werden oft vereinfacht nur die beiden wichtigsten Verbindungen NO (Stickstoffmonoxid) und NO₂ (Stickstoffdioxid) betrachtet. Sie entstehen oft als Produkte unerwünschter Nebenreaktionen zum Beispiel bei Verbrennungsprozessen. Auch bei hohen elektrischen Entladungen kann Luftsauerstoff und der reaktionsträge Stickstoff miteinander zu Stickstoffmonooxid NO reagieren. Das farblose Stickstoffmonooxid ist an der Luft nicht beständig und reagiert schnell mit weiterem Sauerstoff zu bräunlichem Stickstoffdioxid. Gemische aus Stickstoffmonooxid und Stickstoffdioxid, die nitrosen Gase, wirken als starke Atemgifte. Nach Einatmen dieser Gase treten Reizerscheinungen der Nasen-, Rachen- und Augenschleimhäute auf. Bei höherer Konzentration können Lungenödeme hervorgerufen werden. Dabei ist NO₂ jedoch nur etwa 1/20 bis 1/10 so wirksam wie Ozon [56] [57] - NO noch geringer. In der EU-Richtlinie 2008/50/EG, mit der 39. BImSchV in deutsches Recht umgesetzt, soll seit 2010 ein Jahresgrenzwert von 40 µg/m³ im Jahresmittel nicht überschritten werden. Der Stunden-Grenzwert zum Schutz der menschlichen Gesundheit liegt für Stickoxide (NO und NO₂) bei 200 µg/m³ (entspricht bei 20 °C etwa 0,16 ppm NO bzw. 0,1 ppm NO₂), der nicht öfter als 18-mal pro Jahr überschritten werden darf.

Das Umweltbundesamt gibt Richtwerte für Innenräume von 80 µg/m³ (0,03 ppm bzw. 0,04 ppm) im Mittel einer Stunde und 40 µg/m³ als Jahresmittelwert vor. Als kurzfristiger Alarmwert werden 250 µg/m³ angegeben.

Als Arbeitsplatzgrenzwert von NO₂ werden 950 µg/m³ festgelegt mit zahlreichen Ausnahmen. Dieser hohe Wert gilt allerdings insbesondere für die Arbeitnehmer, die an ihrem Arbeitsplatz erhöhter Stickstoffdioxid-Belastung ausgesetzt sind, also nicht in Büros arbeiten. Das Umweltbundesamt empfiehlt - auch in Innenräumen - den maximalen Wochen-Mittelwert auf 40 µg/m³ (0,03 ppm bzw. 0,02 ppm) festzusetzen.

Tabelle 6 zeigt die Konzentrationen an Stickoxiden die bei Prüfung der jeweiligen Luftreiniger im Verlauf von 90 Minuten maximal in der Kammerluft erreicht wurden. Ein Wert von 0,002 bis 0,003 ppm muss hierbei als Hintergrundwert gelten, da diese auch in der Prüfkammer ohne laufendem Luftreiniger vorlagen. Einen tatsächlichen Anstieg der NO_x-Konzentrationen zeigten Messreihen mit Gerät a und Gerät f, sowie ganz leicht auch mit Gerät e, h und i. Diese Geräte benötigen für ihre Wirkweisen hohe elektrische Spannungen. Auch Gerät g enthält jeweils eine auf Plasmageneration und elektrische Abscheidung basierende Einheit für die höhere elektrische Spannungen angelegt werden, hier konnten keine ansteigenden Stickoxid-Konzentrationen gemessen werden.

Tabelle 6: maximal ermittelte NO_x-Konzentrationen (Summe aus NO und NO₂) in allen Prüfdurchgängen innerhalb von 90 Minuten für die 11 untersuchten Luftreiniger

Luft- reiniger	Wirkprinzip						NO _x ppm
	Filtration (HEPA)	UV	Elektro- stat	Plasma- genera- tor /Ioni- sator	Ozon	Hydroxylgene- rator	
a	X			x			0,014
b		X					0,003
c		x					0,003
d		x					0,003
e					x		0,006
f			x				0,026
g	x	x	x	x	x		0,003
h	X	x		x			0,005
i	x					x	0,005
j	X	X					0,001
k					x	x	0,002

Wenn Luftreiniger Filtrationseinheiten mit Aktivkohle enthalten, welche hinter die Stickoxidproduzierenden Einheiten positioniert sind, können die Stickoxid-Konzentrationen dadurch wieder gesenkt werden. Es ist davon auszugehen, dass eine Laufzeit der Luftreiniger von mehr als 90 Minuten zu einem weiteren Anstieg der NO_x-Konzentrationen führt, da die Kurven stetig anstiegen (s. Abbildung 23). Eine Überschreitung des Wochen-Mittelwertes wurde im Untersuchungszeitraum von 90 Minuten nur für ein Gerät festgestellt (Elektrostat). Bei einer längeren Laufzeit würden aber mit hoher Wahrscheinlichkeit noch weitere Geräte hinzukommen.

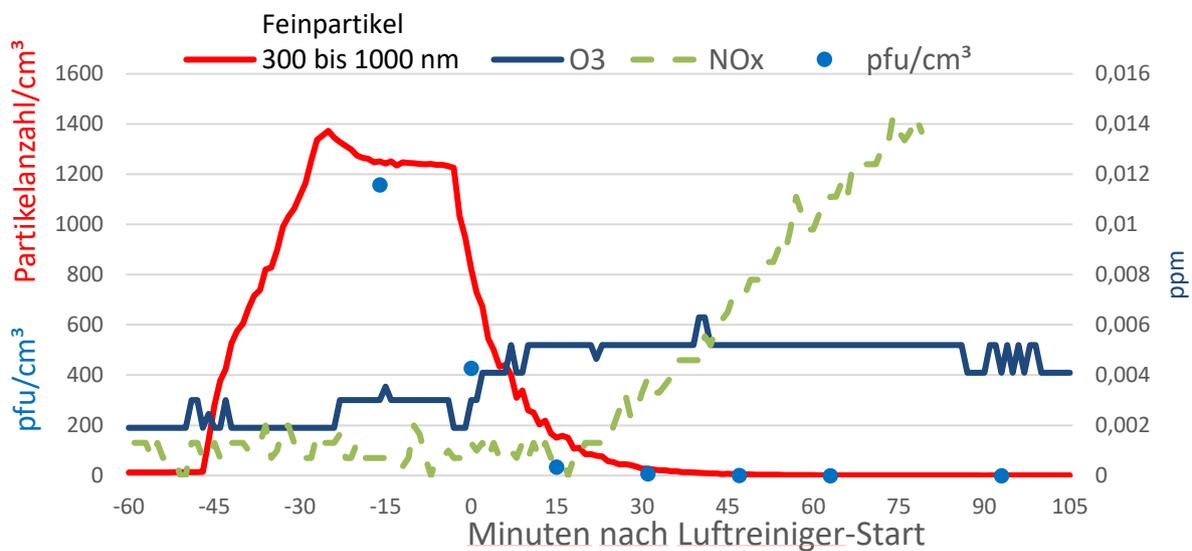


Abbildung 23: Konzentrationsverläufe von Feinpartikeln, Ozon, Stickoxiden und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Elektrostat)

4.7.3. Zugluft

Zugluft ist eine erhöhte Luftbewegung, die zu einer örtlichen Abkühlung des menschlichen Körpers führen kann. Die Luftgeschwindigkeit wird je nach Lufttemperatur, Aktivitätsgrad, Bekleidungszustand, Luftfeuchte und Änderungsfrequenz der Luftgeschwindigkeit und -richtung (Turbulenz) unterschiedlich empfunden. Grundsätzlich empfinden Personen bei körperlicher Arbeit eine erhöhte Luftgeschwindigkeit als weniger störend. Höhere Luftgeschwindigkeiten fördern die Verdunstung auf der Haut und dadurch die Wärmeabgabe. Luftgeschwindigkeitschwankungen werden sehr sensibel auf der Haut als Temperaturschwankungen bzw. zentral als Warnsignal wahrgenommen [58]. Auch wenn Zugluft kein unmittelbares Gesundheitsrisiko darstellt ist sie für die Akzeptanz und damit die korrekte und so auch effektive Anwendung eines Luftreinigers von Bedeutung. Untersuchungen bei einer Lufttemperatur von 23°C ergaben, dass dabei laminare Luftströmungen bei gleicher Luftgeschwindigkeit weniger störend empfunden werden als turbulente [59]. Somit wird Zugluft mit hohem Turbulenzgrad, insbesondere bei sitzender Tätigkeit, mit wenig körperlicher Arbeit, als besonders störend empfunden. Für mobile Klimageräte zum Beispiel kann von einem Turbulenzgrad im Bereich von ca. 40 % ausgegangen werden [60]. Unter den Auslegungskriterien für die lokale thermische Unbehaglichkeit sind in der DIN EN 16798-1 [61] zulässige Luftgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von Temperatur und Turbulenzgrad zwischen 0,1 m/s (Winter) und 0,3 m/s (Sommer) angegeben.

Als empfindlich gegenüber Luftbewegungen gelten der menschliche Schulter-Nacken-Bereich und der Fußgelenk-Bereich sowie die rückwärtige Körperseite. Das Empfinden der Luftgeschwindigkeit ist im Wesentlichen abhängig von der "Gleichförmigkeit" der Strömung bzw. dem Turbulenzgrad und dem damit verbundenen Zugluftrisiko sowie der Lufttemperatur.

Man unterscheidet gerichtete und ungerichtete Luftströmungen. Die Anströmrichtung ist ein wesentliches Kriterium zur Beurteilung der Arbeitsplatzsituation bzw. zur Optimierung der klimatischen Situation (z.B. durch Veränderung der Anordnung von Arbeitsplätzen und der Positionierung eines oder mehrerer Luftreiniger). Die Anordnung der Luftein- und -austrittsöffnungen am Luftreiniger wird bei der Anschaffung im Idealfall im Hinblick auf die zukünftige Positionierung schon beachtet. Tischgeräte haben in der Regel einen niedrigeren Luftumsatz und damit meist niedrigere Luftgeschwindigkeiten, sind in ihren Positionen oftmals aber räumlich näher an den Arbeitsplätzen. Bei Wand-, Decken- oder Standgeräten mit hohem Luftumsatz sollten die gegenüber Zugluft empfindsamen Körperregionen nicht direkt angeströmt werden können.

Die (gereinigte) Luft wurde bei allen untersuchten Luftreinigern in einem über die Auslassfläche weitestgehend gleichförmigen Luftstrom an die Raumluft abgegeben. Lamellengitter wirkten dabei bei den meisten Luftreinigern als Gleichrichter des Luftstromes. Die Luftgeschwindigkeit direkt an Luftein- und -auslass wurde mit einem Hitzedrahtanemometer (TSI Velocicalc) ermittelt. Gegenüber dem ebenfalls eingesetzten Flügelradanemometer (Höntzsch HFA) wurden mit dem Hitzedrahtanemometer höhere Luftgeschwindigkeiten ermittelt (Tabelle 7).

Tabelle 7: Mittelwerte der Ergebnisse aus Messungen der Luftaustrittsgeschwindigkeit mit zwei verschiedenen Luftgeschwindigkeitsmessern

Luft-reiniger	Luftaustrittsgeschwindigkeit mit Hitzedrahtanemometer [m/s]	Luftaustrittsgeschwindigkeit mit Flügelradanemometer [m/s]
a	5,55	4,11
b	5,02	4,7
c	16,06	15,21
d	2,51	2,11
e	4,06	1,36
f	4,63	3,41
g	1,52	1,85
h	7,03	6,8
i	10,22	7,81
j	1,67	2,08
k	3,21	1,11

Tabelle 8: Mittlere 1-Minuten-Maxima der Luftgeschwindigkeit an Luftein- und auslass der Luftreiniger

Luftreiniger	mittleres Maximum Einlass [m/s]	STABW	mittleres Maximum Auslass [m/s]	STABW
a	0,90	0,0321455	5,55	0,55108983
b	2,70	0,04582576	5,02	1,13696966
c	0,42	0,02	16,06	4,33621955
d	0,69	0,12489996	2,51	0,19078784
e	2,38	0,12489996	4,06	0,35594943
f	1,23	0,27	4,63	0,19078784
g	1,21	0,18520259	1,52	0,3318132
h	0,65	0,13527749	7,03	0,22271057
i	2,73	0,09	10,22	1,38578498
j	1,61	0,70192592	1,67	0,36041643
k	0,78	0,13228757	3,21	1,06409586

Dies könnte mit leichten Turbulenzen an der Messposition (5 cm Abstand, mittig über Öffnung), welche die exakte Ausrichtung des Flügelradanemometers im Luftstrom erschwerten, und einer höheren Empfindlichkeit des Hitzedrahtanemometers bei niedrigen Luftgeschwindigkeiten, zu erklären sein. An jedem Gerät wurden in der höchsten Reinigungsstufe jeweils drei 1-minütige Geschwindigkeitsmessungen mit dem Hitzedrahtanemometer durchgeführt und ein Mittelwert aus den drei 1-Minuten-Maxima gebildet.

Eine Luftströmung mit wechselnder Intensität kann anhand von Standardabweichungen der Luftgeschwindigkeitsmessungen festgestellt werden [62]. Die vorliegenden Standardabweichungen (Tabelle 8) wurden jedoch zu den gefundenen Maximalwerten berechnet und können daher nur näherungsweise zur Ableitung wechselnder Intensitäten herangezogen werden. Eine Berechnung des Turbulenzgrades und des Zuglufttrisikos [63] ist damit nicht zulässig. Da aber das Zuglufttrisikos neben dem Turbulenzgrad, ebenso stark von der Umgebungstemperatur und auch von der individuellen Positionierung des Luftreinigers im Anwendungsfall abhängt, kann dieses prüfseitig ohnehin nicht vorhergesagt werden. Generell kann nur festgehalten werden, dass höhere Luftgeschwindigkeiten an Luftein- und -auslass des Luftreinigers, bzw. stärkere Luftbewegung, das Risiko für die Entstehung von Zugluft erhöhen. Hier ist es dann hilfreich, wenn die Luftreiniger so positioniert werden, dass Personen, insbesondere Schulter-Nacken-Bereich und Fußgelenk-Bereich sowie die rückwärtige Körperseite, nicht direkt angeströmt werden. Die Maximalwerte der Luftaustrittsgeschwindigkeiten wurden erhoben, um eben diese besonders hohen auftretenden Luftgeschwindigkeiten direkt am Luftreiniger vergleichend zu erfassen, da sie am ehesten auch weit in den Raum hineinwirken und gegebenenfalls auch in einiger Entfernung als Zugluft wahrgenommen werden können. Bei allen geprüften Luftreinigern war die Luftgeschwindigkeit am Luftauslass höher als am -einlass. Eine hohe Luftaustrittsgeschwindigkeit muss dann allerdings nicht zur Abwertung eines Luftreinigers führen, da die Strömungsrichtung (zum Beispiel bei einem Luftauslass nach oben)

genauso maßgeblich ist. Das Zugluftrisiko und damit die Wahrscheinlichkeit für einen bestimmungsgemäßen und effektiven Einsatz des Luftreinigers ist jeweils nur im konkreten Anwendungsfall zu bestimmen und die Luftaustrittsgeschwindigkeit kann bei der Einschätzung vorab hilfreich sein.

4.7.4. Schall

In der TA Lärm [64] werden Höchstgrenzen festgelegt für Innenräume (25 dB nachts, 35 dB tagsüber). Zum Schutz vor Lärmeinwirkungen am Arbeitsplatz gilt zunächst die Lärm-Vibrations-Arbeitsschutzverordnung (LärmVibrationsArbSchV). Darin werden, je nach Art der Tätigkeit, Dauer und spezifischem Ort der Geräuschexposition verschiedene Grenzwerte festgelegt. Die Auslösewerte in Bezug auf den Tages-Lärmexpositionspegel liegen bei 80 bzw. 85 dB(A) (unterer und oberer Auslösewert) und die Auslösewerte für den Spitzenschalldruckpegel betragen: 135 bzw. 137 dB(C). Für Arbeitsstätten mit Schalldruckpegeln unterhalb des Pegelbereiches der Gehörgefährdung wie Büros, gibt zusätzlich die DIN 45645-2:2012-09 Messvorschriften für die Ermittlung von Beurteilungspegeln an [65]. Die jeweils vom Hersteller angegebenen maximalen Schalleistungen sind in Tabelle 9 aufgelistet. Zu erkennen ist, dass bis auf eine Ausnahme, Filtrationsgeräte (alle mit HEPA-Filter) zu den lautereren Geräten gehören. Das lässt sich mit dem erhöhten Luftwiderstand durch die Filter erklären.

Tabelle 9: Untersuchte Luftreiniger mit Wirkprinzipien und herstellerseitigen Angaben zur Schalleistung

Luft- reiniger	Wirkprinzip						maximale Schall- leistung dB (A) lt. Hersteller
	Filtration	UV	Elektrostat	Plasma- generator /Ionisator	Ozon	Hydroxyl- generator	
a	X			x			56
b		X					47
c		X					47
d		X					44
e					X		37
f			X				50
g	X	X	X	X	X		25
h	X	X		X			53
i	X					X	51
j	X	X					60
k						X	30

Acht der elf verwendeten Geräte waren mit einem Schalldruckpegel von über 40 dB ausgewiesen. Dies übersteigt die Höchstgrenze der TA Lärm für Innenräume tagsüber [64]. Die Arbeitsstättenverordnung Anhang Nr. 3.7 (teilweise ergänzt durch die Technischen Regeln für Arbeitsstätten, ASR) besagt, dass der Schalldruckpegel so niedrig zu halten ist, wie es in dem jeweiligen Betrieb möglich ist. Für die konzentrierte Arbeit am Büro-Arbeitsplatz müssen sehr viel strengere Maßstäbe herangezogen werden als beispielsweise in handwerklichen Betrieben. Für überwiegend geistige Tätigkeiten oder bei notwendiger Kommunikation mit Kunden und Anforderung an eine sehr gute Sprachverständigung wird ein Schalldruckpegel von maximal 40 dB(A) bis 45 dB(A) als geeignet betrachtet. In bestimmten Situationen, wie zum Beispiel Arbeit in Call Centern und bei Bildschirmarbeit im gewerblichen Umfeld oder bei routinemäßiger Büroarbeit wären auch bis 55 dB(A) akzeptabel. Bei einem solchen Beurteilungspegel von maximal 55 dB(A) am Tag ist der Tages-Lärmexpositionspegel nach 3 Stunden bei 60 dB(A) (lautestes Gerät der Untersuchung) bereits erreicht. Allerdings ist zu beachten, dass aufgestellte Luftreiniger eine zusätzliche Lärmquelle darstellen, die zu dem bereits vorhandenen Lärm hinzugerechnet werden und zur Bewertung der Belastung (bzw. Belästigung) durch den Lärm die Art der Töne berücksichtigt werden muss. Hohe und schrille Töne werden allgemein als unangenehmer empfunden als tiefe Töne und während Gespräche (im Mittel 50 dB [66]) und nicht vorhersehbarer Lärm eher als störend empfunden werden, werden in Frequenz und Lautstärke gleichbleibende Geräusche, wie zum Beispiel von Computerlüftern, leichter toleriert. So kann am Beispiel eines Call-Centers mit einem bereits vorhandenen Pegel von 51 dB(A) ein zusätzlicher Luftreiniger mit einer Schallleistung von 53 dB(A) den 8h-Lärmexpositionspegel auf 55,1 dB(A) erhöhen, ohne selbst als besonders störend empfunden zu werden. Zudem ist für die Lärmeinwirkung die Position ein entscheidender Faktor.

4.7.5. UV C-Strahlung

Die Nukleinsäuren DNA und RNA sind sehr gute Chromophore im ultravioletten (UV) Bereich, mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. Die Absorption von UV-Strahlung in diesem Wellenlängenbereich führt zur Anregung der Basen, was zur Reaktion mit Nachbarbasen und damit zur Entstehung von Mutationen führen kann. Der wichtigste so entstehende Strahlungsschaden ist das CyclobutanPyrimidin-Dimer (CPD), das sich zwischen benachbarten Thymin-, Cytosin- oder Uracil-Einheiten bilden kann. Das weitaus häufigste Produkt (bei DNA) ist das Thymin-Dimer, welches bereits innerhalb sehr kurzer Zeit nach Anregung entstehen kann [67]. Dies macht man sich bei der Desinfektion mit UV-Strahlung zunutze, indem durch eine ausreichende Strahlendosis Konformitätsänderungen der DNA oder RNA entstehen und die Replikation der Pathogene behindert wird. Diese verlieren damit ihre Infektiosität und werden so inaktiviert statt aus der Luft entfernt. Bakterien, Pflanzen und Pilze besitzen dabei aber durch das Enzym Photolyase die Möglichkeit zur Reparatur dieser Schäden (sog. Photoreaktivierung). Viren werden folglich nachhaltiger inaktiviert als Bakterien (s. a. Abbildung 4). Die in dieser Untersuchung in den Luftreinigern eingesetzten UV-Lampen emittierten Strahlung der Wellenlänge 254 nm. Wird die Haut oder das Auge einer direkten UV-C Strahlung ausgesetzt können beim Menschen ebenso bereits nach kurzer Zeit Veränderungen im Erbgut

der Zellen entstehen. Als kurzfristige Effekte sind zum Beispiel Binde- und Hornhautentzündungen und entzündliche Rötungen der Haut (Erytheme / Sonnenbrand) sowie eine Schwächung des Immunsystems beschrieben. Als langfristige Wirkung kann es zur Entstehung von Grauem Star (Linsentrübung) kommen, vermehrter Hautalterung durch Zerstörung elastischer Fasern, sowie zu verschiedenen Hautkrebs-Formen durch Mutationen im Erbgut von Hautzellen. Als Alternative zur Bestrahlung mit Strahlung der Wellenlänge 254 nm zu Desinfektionszwecken kann auch Strahlung mit einer Wellenlänge von 222 nm eingesetzt werden. Mit dieser Wellenlänge werden vor allem Proteine zerstört, wobei dafür höhere Strahlendosen erforderlich sind als mit 254 nm. Da diese Strahlung nur eine sehr geringe Eindringtiefe hat, wird ein Einsatz auch ohne Abschirmung und in personenbesetzten Räumen diskutiert. Bisher ist allerdings auf dem deutschen Markt kein solcher Luftreiniger erhältlich (s. 4.3).

Für Arbeitsplätze an denen UV-Strahlung entweder bewusst eingesetzt wird (z. B. zur Desinfektion oder um Kleber zu trocknen) oder als Nebeneffekt auftreten (z. B. beim Schweißen) gelten die UV-Grenzwerte der EU Richtlinie 2006/25/EG. Diese Richtlinie legt europaweit einheitliche Expositionsgrenzwerte für künstliche optische Strahlung (inklusive UV-Strahlung) fest. Der dort angegebene Expositionsgrenzwert für den Wellenlängenbereich 180 – 400 nm (UV-A, -B, -C) liegt bei 30 J/qm und soll vorrangig dem Schutz vor kurzfristigen und langfristigen Haut- und Augenschäden dienen. In die Berechnung sind wellenlängenspezifische Gewichtungsfaktoren mit eingeflossen, welche die biologische Wirksamkeit der untersuchten Wellenlänge widerspiegeln. Um den Grenzwert nicht zu überschreiten, darf dann die Bestrahlungsstärke der UV-Quelle, bei einer 8 stündigen gleichmäßigen Exposition, 1 mW/m² nicht überschreiten. Die Verordnung zum Schutz der Beschäftigten vor Gefährdungen durch künstliche optische Strahlung ist am 27. Juli 2010 auch in der deutschen Gesetzgebung in Kraft getreten (BGBl. I. Nr. 38).

Von den elf untersuchten Luftreinigern enthielten sechs UV-C-Strahlung emittierende Lampen, entweder zur Bestrahlung der durchströmenden Luft oder zur Bestrahlung von internen Bauteilen (z. B. Filtermatten). Auch Hydroxyl- und Ozongenerator enthielten UV-Lampen. In der Regel wird die UV-Strahlung dabei gut abgeschirmt, so dass keine Strahlung nach außen dringen kann. Allerdings ist denkbar, dass Schwächen in der Konstruktion oder im Material (z. B. bei Geräten der unteren Preiskategorien) dazu führen können, dass Strahlung austreten kann. Beim Einsatz eines solchen Luftreinigers in Betreuungs- und Bildungseinrichtungen mit Kindern muss dabei zusätzlich bedacht werden, dass der Strahlengang auch für kleinere Kinderhände unzugänglich sein sollte und Kinder aus anderen Positionen heraus in den Luftreiniger schauen können.

Aus diesem Grund wurden die Messungen der UV-Strahlung in zehn Zentimetern Entfernung an allen freien Seiten des Gerätes vorgenommen. Die Messungen fanden in einem möblierten Testraum statt in dem die Luftreiniger (mit Ausnahme des Wandgerätes) nach Herstellerangaben positioniert und in Betrieb genommen wurden. Verwendet wurde ein UV-Meter von Gigahertz-Optik mit XD-9506 Messkopf und das X1-Optometer UV B/C mit ACGIH (skin effective irradiation)-Messkopf. Der jeweils höchste gemessene Wert in µW/m² aus drei Wiederholungsmessungen an allen Seiten wurde als Ergebnis in Tabelle 10 festgehalten.

Tabelle 10: emittierte UV-Strahlung der Geräte in $\mu\text{W}/\text{m}^2$ als maximal gemessener Wert in zehn Zentimetern Entfernung vom Gerät

Luft-reiniger	Wirkprinzip						UV C-Strahlung $\mu\text{W}/\text{m}^2$ (maximaler Wert in 10 cm Entfernung)
	Filtration (HEPA)	UV	Elektro- stat	Plasma- genera- tor /Ioni- sator	Ozon	Hydroxylgene- rator	
a	X			x			230
b		X					7241
c		x					7262
d		x					3200
e					x		260
f			x				210
g	x	x	x	x	x		230
h	X	x		x			290
i	x					x	230
j	X	X					230
k					x	x	870

Geräte d und k wurden darüber hinaus auch am 10.08.2023 in der Prüfstelle der BG ETEM in Köln geprüft (s. Anhang). Gemessen wurde mit dem kalibrierten Spektrometer (spektrale Messung der Bestrahlungsstärke) der Fa. Instrument Systems, Typ: CAS 140 CT-152, SN 136314211, mit der Einkoppeloptik EOP-146. Gerät d wurde dafür ausgewählt, weil Gerät d der günstigste UV-basierte Luftreiniger in der Untersuchung war (durch mangelhafte Abschirmung eventuell Austritt von UV-C-Strahlung möglich), in den Messungen zur emittierten UV-Strahlung im Testraum aber die niedrigeren Werte unter den UV-basierten Geräten aufwies. Die Messungen im Prüfstand der BG ETEM zeigten, dass es entscheidenden Einfluss hatte, an welcher Stelle des Gerätes die Messungen vorgenommen wurden. Sehr dicht am oberen Luftauslass war die UV-C Strahlung bei Gerät d deutlich geringer als an der unteren Ansaugung auf Höhe der Strahlungsquelle. Je dichter (weniger als 10 cm Abstand) am Lufteinlass gemessen wurde umso höher war die UV-C Strahlung. Trotzdem war das Messergebnis für Gerät d um etwa den Faktor 2 kleiner als für Gerät k. Auch bei Gerät k verringerte jeder Zentimeter mehr Abstand zu den Lüftungsgittern die UV-Exposition. Insgesamt ergaben sich für beide Geräte Werte oberhalb von $1 \text{ mW}/\text{m}^2$. Für das Tischgerät k wurden direkt am Lufteinlass mit dem

ACGIH-Messkopf $12,2 \text{ mW/m}^2$ gemessen. Mit 10 cm Entfernung (s. Tabelle 10) von dem Lufteinlass wurden nur noch $0,87 \text{ mW/m}^2$ ermittelt. Da eine dauerhafte Exposition selbst in zehn Zentimetern unwahrscheinlich ist, müssen die Geräte die in den Messungen Strahlungsstärken von über $1000 \text{ } \mu\text{W/m}^3$ aufwiesen, nicht unbedingt als gefährlich oder unsicher eingestuft werden. Hier ist es wichtig zu beachten, ob die betreffende Position überhaupt erreicht werden kann. Bei allen Geräten waren die höchsten Werte je nach Einbauposition der UV-Lampe an Luftein- oder -auslass zu messen. Gerät b war ein Wandgerät, bei dem die Luft seitlich zu- und abgeführt wurde. Gerät c zeigte die hohen Werte am Luftauslass, welcher aber oben an dem hohen Standgerät lag. Eine länger andauernde Exposition kann hier also ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu Gerät d kann bei diesen beiden aufgrund der Position und Bauweise auch nicht in den Strahlengang gefasst oder geschaut werden. Das etwa 80 cm hohe Gerät d hatte hingegen oben am Luftauslass eine Öffnung die für den Messkopf (und für Finger oder Kinderhände) breit genug war um ihn mittig über dem Luftauslass in den Strahlengang zu schieben. Hier wurden 23 mW/m^2 gemessen. Das günstigste Gerät in dieser Untersuchung war Gerät h. Dieser Luftreiniger hatte eine photokatalytische Filtereinheit mit UV-Lampe verbaut, welche zwischen den Filterplatten positioniert war. Bei diesem Gerät waren zwar leicht höhere Strahlungsstärken messbar als bei anderen Geräten ohne UV-Einheit, lagen aber noch weit unter $1000 \text{ } \mu\text{W/m}^2$. Allerdings ließ sich dieses Gerät auch ohne korrekt eingesetzte Filterplatten betreiben. Dann erreichte die Strahlungsstärke in zehn Zentimetern Entfernung zum Luftreiniger 1000 mW/m^2 (Hönle UV Meter, Messkopf UVC F0). Solche Gefahrenquellen sollten unbedingt beachtet und möglichst konstruktionsseitig ausgeschlossen werden.

4.8. Bewertungsmaßstab für Virenreduktion

Zur Bewertung von Luftreinigern wurde die Clean Air Delivery Rate (CADR) in den 1980er Jahren von der Association of Home Appliance Manufacturers (AHAM) entwickelt. Sie dient als einheitlicher Maßstab zur Bewertung der Effizienz von Luftreinigern bei der Entfernung von spezifischen Luftschadstoffen. Die CADR misst die Reinigungsleistung ursprünglich in Kubikfuß pro Minute (CFM) und bewertet die Entfernung von Rauch (kleinste Partikel, 0,09 - 1,0 Mikrometer), Staub (mittelgroße Partikel, 0,5 - 3,0 Mikrometer) und Pollen (größte Partikel, 5,0 - 11,0 Mikrometer)[69]. Ein hoher CADR-Wert zeigt eine größere Reinigungsleistung und Effizienz eines Luftreinigers an. Die CADR war einer der ersten objektiven, vergleichbaren Maßstäbe zur Luftreinigerbewertung und findet heute breite internationale Anwendung. Die Methodik des CADR-Tests umfasst standardisierte Testbedingungen, bei denen die Anzahl der Schadstoffpartikel vor und nach der Reinigung gemessen wird. Auch andere Prüfstandards für Luftreiniger wie der chinesische Standard GB/T 18801-2022 [70], der kanadische Standard CSA C22.2 No. 187-M1986 (R2014) [71] und der japanische Standard JEM 1467 [72] definieren die Leistungs- und Sicherheitsanforderungen von Luftreinigern und legen Prüfmethoden fest. Trotz ihrer weiten Verbreitung und Akzeptanz hat die CADR als Bewertungsmaßstab auch ihre Grenzen. So werden in den Standards bisher nicht alle Arten von Schadstoffen, wie flüchtige organische Verbindungen (VOCs) oder gasförmige Schadstoffe berücksichtigt und sie sind weniger relevant für ultrafeine Partikel, die kleiner als 0,3 Mikrometer sind. Aufgrund der weiten

Akzeptanz bleibt die CADR aber ein entscheidender Faktor bei der Bewertung der Effizienz von Luftreinigern.

Während der CADR-Wert ein etablierter Maßstab für die allgemeine Effizienz von Luftreinigern ist, gibt es spezifische Tests und Standards, die zur Bewertung der Virenreduktion von Filtersystemen herangezogen werden können. Die ASTM (American Society for Testing and Materials) Normen F2101 (Testmethode zur Bewertung der bakteriellen Filtrationseffizienz von Gesichtsmasken) und F2100 (Spezifikation für Leistungsanforderungen für medizinische Gesichtsmasken) werden genauso auf Luftfilter und Filtrationsmaterialien angewendet um ihre Wirksamkeit bei der Entfernung von Viruspartikeln zu bewerten wie andere zahlreiche nationale Normen und Prüfvorschriften. Die Microbial Reduction Rate (MRR) gibt dann die Rate der Reduktion mikrobieller Partikel, einschließlich Viren, an. Diese wird oft in Prozent angegeben und beschreibt, wie effektiv ein Filtersystem bei der Entfernung oder Inaktivierung von Mikroben aus der Luft ist. Immer häufiger finden sich auch modifizierte CADR-Tests, um die Wirksamkeit von Luftreinigern gegen spezifische biologische Aerosole, einschließlich Viren, zu bewerten. Diese Tests nutzen Surrogate oder inaktivierte Viren, um die Filtrationseffizienz und die Luftreinigungskapazität des Geräts zu bestimmen.

In Deutschland gibt es ebenfalls verschiedene Verfahrensvorschriften (z. B. [73, 74] [75] oder [76]). Diese finden aber ausschließlich bei Filtrationsgeräten Anwendung. Auch die ISO 29463-Serie, basierend auf den EN 1822-Standards, befasst sich mit Hochleistungsfiltern und Filtermaterialien, die zur Luftreinigung verwendet werden. Diese Standards definieren Prüfmethoden und Klassifikationen für Filtermaterialien basierend auf ihrer Effizienz bei der Entfernung von Partikeln in verschiedenen Größenbereichen, einschließlich solcher, die kleiner als 0,1 Mikrometer sind, was die Größe vieler Viren umfasst. Werden andere Technologien eingesetzt als Filtration gibt es kaum Prüfvorschriften. Die Experten-Empfehlung des VDI „Messen von Innenraumluftverunreinigungen - Anforderungen an mobile Luftreiniger zur Reduktion der aerosolgebundenen Übertragung von Infektionskrankheiten“ [40] gilt für raumlufttechnische Geräte, die zur Verbesserung der Luftqualität in Innenräumen eingesetzt werden (insbesondere zur Reduktion von Partikeln, gasförmigen Schadstoffen und Mikroorganismen) und macht Vorgaben zu deren Lüftungstechnischer Bewertung und Prüfung. In der DIN/TS 67506: Entkeimung von Raumluft mit UV-Strahlung –UV-C-Sekundärluftgeräte [77] werden genaue Testbedingungen festgelegt, unter denen UV-basierte Luftreiniger auf ihre Leistungsfähigkeit bei der Entfernung von Viren getestet werden sollen. Diese umfasst unter anderem die Belastung der Luft mit spezifischen Virenpartikeln und die Messung der Reduktionsrate dieser Partikel durch den Luftreiniger. Als Bewertungsmaßstab verwendet der DIN-Normenausschuss Lichttechnik (FNL) analog zur CADR den Term HADR (hygienic air delivery rate) um der möglichen Inaktivierung biologischer Partikel durch UV-Strahlung, ohne Entfernung dieser Partikel aus der Luft, Rechnung zu tragen. In der Literatur wird entsprechend außerdem für den Vergleich verschiedener mobiler Luftreiniger auch eine CAR_m (Clean Air Rate *microbial*) für eine auf mikrobiologische (Bio-)Aerosole angewendete Berechnung nach AHAM Standard AC-1 verwendet [78-80]. In der Ergänzung zur ANSI/AHAM AC-1-2020 (Portable Electric Room Air Cleaners) [81] wird die Prüfung der Luftreiniger mit MS2-Phagen beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde zu jedem Parameter (Feinpartikel, Ultrafeinpartikel, jeweilige Surrogate) eine spezifische CADR berechnet. Dazu wurde die Reduktion der luftgetragenen Konzentrationen durch den Luftreiniger wie für die Partikel-CADR im zeitlichen Verlauf gemessen und für die Berechnung herangezogen. Durch Miteinbeziehung der natürlichen Abklingrate (Ergebnisse der „natural decay“-Messreihen) wurde den verschiedenen natürlichen Verlusten über die Zeit Rechnung getragen. Die CADR mit der Einheit m³/h wurde nach Formel 2 berechnet und in Klammern dahinter angegeben, auf welche Prüfkomponenten (Partikel, Bakterien, Phagen) sich der Wert bezieht.

$$\text{Formel 2} \quad \text{CADR \{Prüfkomponente\} \left[\frac{\text{m}^3}{\text{h}} \right] = H * V * (kt - kn)}$$

mit

H = Anzahl Zeiteinheiten pro Stunde;

V = Volumen der Prüfkammer in m³;

kt = im Luftreinigertest ermittelte Abbaukonstante (je Zeiteinheit);

kn = natürliche Abbaukonstante (je Zeiteinheit)

Die Konzentrationsverläufe in der Prüfkammer sind exemplarisch in Abbildung 24, Abbildung 25 und Abbildung 26 gezeigt. Zu erkennen ist, dass die PFU/m³ MS2 sowohl in der natürlichen Abklingrate als auch bei Einsatz eines Luftreinigers mit Filtrationseinheit den Kurvenverläufen für Partikel folgen (Abbildung 24, Abbildung 25). Wird jedoch eine inaktivierende Technologie zusätzlich eingesetzt, reduzieren sich die Konzentrationen der PFU schneller als die Partikel (hier UV-Strahlung, Abbildung 26). Dies zeigt noch einmal, wie wichtig ein Bewertungsmaßstab für die Virenreduktion getrennt von der Partikelreduktion ist.

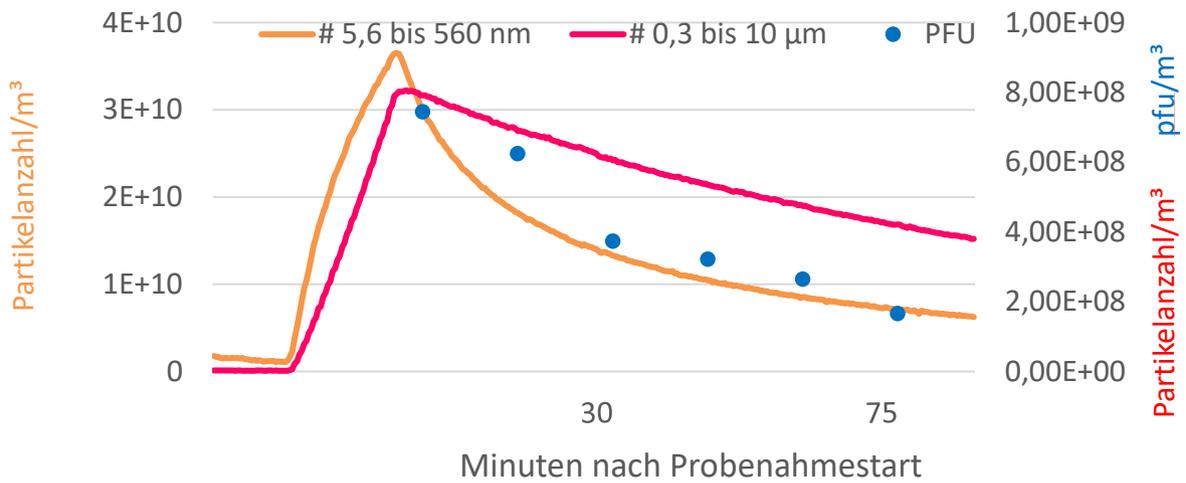


Abbildung 24: Konzentrationsverläufe von Feinpartikeln, Ultrafeinpartikeln und MS2-Phagen in der Prüfkammer ohne Luftreiniger (natural decay)

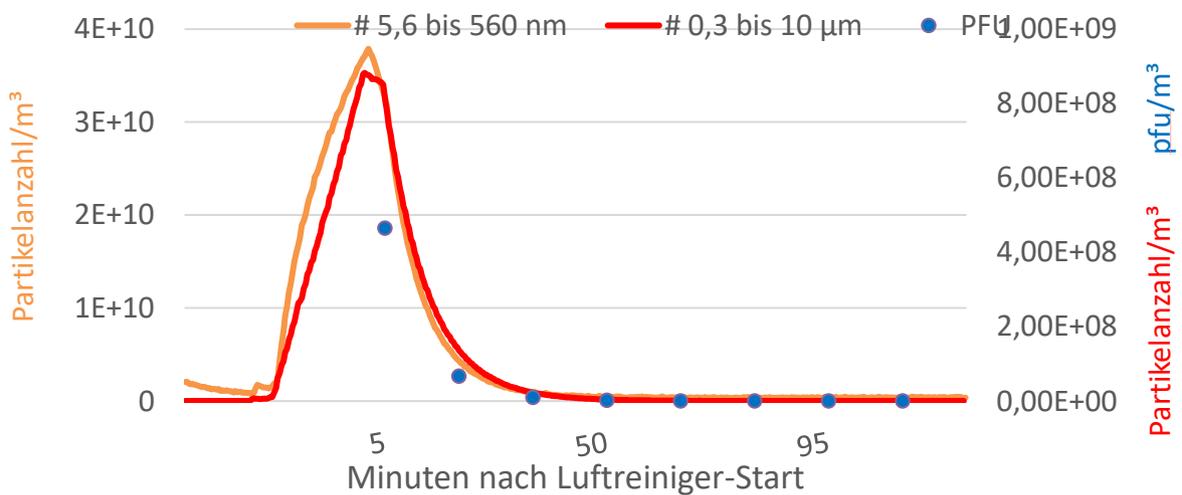


Abbildung 25: Konzentrationsverläufe von Feinpartikeln, Ultrafeinpartikeln und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Filtergerät)

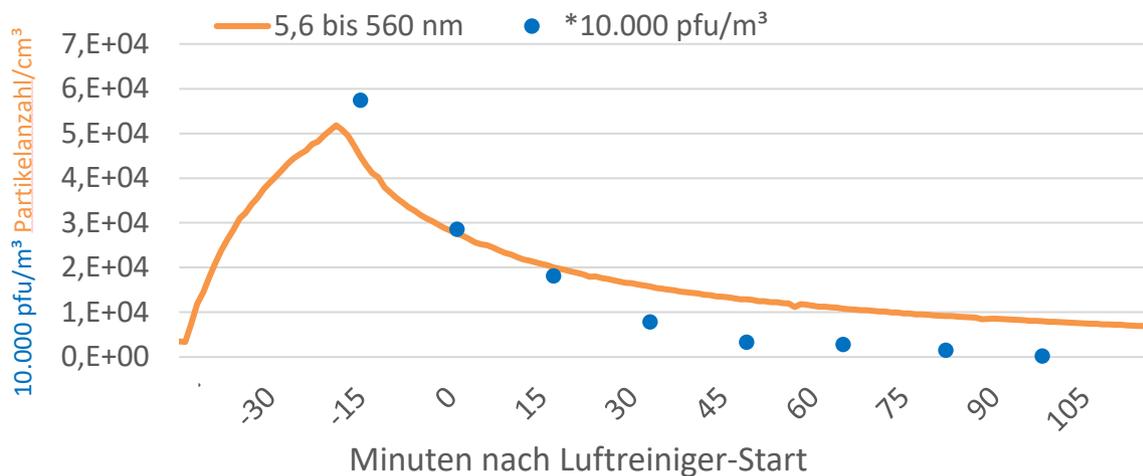


Abbildung 26: Konzentrationsverläufe von Ultrafeinpartikeln und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Inaktivierung durch UV-Strahlung und Filter)

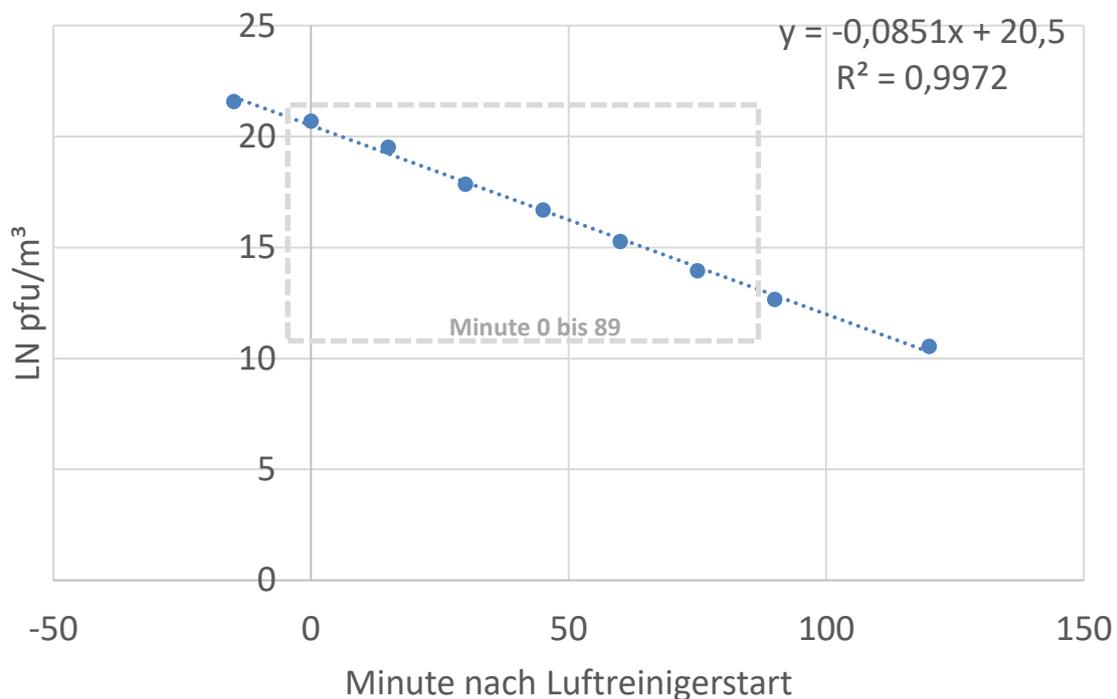


Abbildung 27: exemplarischer Konzentrationsverlauf von MS2 in der Prüfkammer ohne Umwälzung mit laufendem Luftreiniger mit Steigungsgleichung und Bestimmtheitsmaß

Die Reduktionskurven der Prüfkompnenten verlaufen erwartungsgemäß exponentiell und unterschiedlich stark. Aus den unterschiedlich starken Reduktionen lässt sich nach Transformation in den LN (logarithmus naturalis) eine Abklingkonstante in Form der Steigung berechnen (s. a. Abbildung 27). Diese fließt als Größe in die CADR-Berechnung ein. Die mit Impingement erhaltenen Werte wiesen dabei stets ein hohes Bestimmtheitsmaß auf. Bei sehr effektiv

arbeitenden Luftreinigern sanken die Phagenkonzentrationen nach einiger Zeit in den Bereich der unteren Nachweisgrenze ab, was rechnerisch zu einer Abflachung der Steigung führte. Daher wurden für die CADR-Berechnung nur die Werte von T0 (erste 15 Minuten nach Luftreiniger-Start) bis T5 (Probenahme von Minute 75 bis 89) berücksichtigt (s. a. Tabelle 3).

In Wiederholungsmessungen wurde die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Werte ermittelt. Dazu wurde ein Luftreiniger insgesamt zehnmal in der Prüfkammer in unter gleichbleibenden Bedingungen (Kammer ohne Umwälzung, MS2-Phagen als Virus-Surrogat, Bioaerosolsammlung mit AGI30) geprüft (s. Tabelle 11). Die zehn durch Berechnung erhaltenen CADR (MS2) lagen sehr dicht beieinander (mit einer Standardabweichung von 2,96). Das angewendete Prüfverfahren führt somit zu reproduzierbaren und belastbaren Ergebnissen. Da die Reduktionsraten der natürlichen Abklingraten (Natural Decay) auch leichten Schwankungen unterliegen ist es dabei für eine möglichst exakte Berechnung der CADR (MS2) notwendig, jeweils einen zeitlich dicht an der Luftreiniger-Messung erhobenen Natural Decay-Wert für die Berechnung zu verwenden.

Tabelle 11: Ergebnisse aus den zehn Prüfungen von Gerät g mit MS2-Phagen in der Kammer in Modus 2

Messung Nr.	Bestimmtheitsmaß	Steigung	CADR (MS2)
1	0,99896601	-0,0900558	100,595757
2	0,99896601	-0,06272925	110,234008
3	0,99663349	-0,05999707	105,608792
4	0,93287155	-0,06901918	102,133904
5	0,98332054	-0,07024976	104,199955
6	0,99193469	-0,07346778	109,59075
7	0,99667607	-0,0705323	104,673944
8	0,95965466	-0,0701708	104,067449
9	0,99218675	-0,06040722	106,303938
10	0,98647875	-0,05964116	105,005351

In Tabelle 12 sind zum leichteren Vergleich nochmals alle wesentlichen Bewertungsparameter der geprüften Luftreiniger aufgeführt. Hier zeigt sich das breite Spektrum der Prüfergebnisse. Bis auf eine Ausnahme weisen alle Geräte eine höhere CADR (MS2) als CADR (Ultrafeinpartikel) auf, was auf die zusätzlich zur eventuellen Abscheidung stattfindende Inaktivierung von

Viren hinweist. Geräte ohne HEPA-Einheit zeigen wie zu erwarten eine sehr niedrige CADR (Ultrafeinpartikel). Werte unter 20 sind zu gering um als nennenswerte Reinigungsleistung zu gelten und sind mit eher ungerichteten Depositionen in und am Luftreiniger (z. B. Grobfilter) durch die Luftbewegung zu erklären. Ein Gerät weist sogar einen negativen CADR-Wert für die Prüfkomponente Ultrafeinpartikel auf. Dieser Wert liegt innerhalb der Schwankungsbreite der CADR-Berechnungen (s. a. vorhergehenden Abschnitt). Es ist allerdings auch durchaus denkbar, dass es bei diesem Gerät (Ozongenerator) durch Ozonreaktionen mit organischen Verbindungen zur Bildung von partikulären Sekundärprodukten (sekundären organischen Aerosolen (SOA)) kam und somit in höherem Maße zusätzliche Partikel gebildet wurden als dass bereits vorhandene zerstört bzw. entfernt wurden.

Tabelle 12: Liste aller Prüfergebnisse der getesteten Luftreiniger in den Leistungs- und Emissionsparametern

Luftreiniger	Reinigungsleistung		UV C-Strahlung $\mu\text{W}/\text{m}^2$ (max. Wert in 10 cm Entfernung)	NO _x ppm (max. Konz. in allen Prüfdurchgängen)	O ₃ ppm (max. Konz. in allen Prüfdurchgängen)	maximale Luftaustrittsgeschwindigkeit (m/s) (Zugluftisiko)	maximale Schalleistung dB (A) (Herstellerangaben)
	CADR (MS2) m ³ /h	CADR (Ultrafeinpartikel) m ³ /h					
a	326	155	250	0,014	0,002	5,55	56
b	185	13	7241	0,003	0,003	5,02	47
c	315	19	7262	0,003	0,017	16,06	47
d	53	14	3200	0,003	0,017	2,51	44
e	93	-2	260	0,006	0,463	4,06	37
f	253	204	210	0,026	0,006	4,63	50
g	106	152	230	0,003	0,001	1,52	25
h	179	105	210	0,005	0,001	7,03	53
i	230	186	230	0,005	0,001	10,22	51
j	239	174	230	0,001	0,001	1,67	60
k	80	10	870	0,002	0,539	3,21	30

Ersichtlich wird hier auch, dass bisher keines der geprüften Geräte optimal für den Einsatz an (Büro)Arbeitsplätzen geeignet zu sein scheint. Werden z. B. Ultrafeinpartikel und Virus-Surro-

gate gleichermaßen effektiv abgeschieden, ist dafür die Lautstärke höher. In einem nicht hermetisch abgedichteten Raum ist wiederum die Generation von (geringen Mengen) Ozon weniger problematisch als in der Prüfkammer mit wenig chemischen Reaktionspartnern. Hier muss für jeden Anwendungsfall differenziert und mit Beachtung der lokalen Gegebenheiten und Anforderungen entschieden werden, welcher Luftreiniger diesen am besten gerecht wird. Dafür ist die umfassende Prüfung aller relevanten Parameter mit dem hier entwickelten Prüfverfahren ein wichtiges Werkzeug.

5. Ergebnisse des Gesamtvorhabens

Empfehlungen für die Prüfung von Luftreinigern in einer Prüfkammer

Aus Gründen der leichteren Reinigung und Desinfektion empfiehlt sich eine Edelstahlkammer zur Einbringung der Surrogate. Aber auch andere Systeme (z. B. Folientunnel, Kunststoffcontainer) können dafür geeignet sein, wenn sie ausreichend groß dimensioniert sind um einen Wohn-, Büro- oder Klassenraum zu simulieren. Hier müssen aber mögliche zusätzliche elektrostatische Senkeneffekte bedacht werden. Luftreiniger für größere Räume ($> 200 \text{ m}^2$) sollten entsprechend in Prüfkammern mit mehr Luftvolumen geprüft werden. Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit sollten auf gleichbleibende Werte reguliert und idealerweise auf 50 % rel. Luftfeuchte bei 23 °C eingestellt werden können. Diese Vorgaben entsprechen den bestehenden Prüfstandards für (Partikel-abscheidende) Luftreiniger, so dass auf deren Prüfergebnisse Rückbezug genommen werden könnte. Für die Vorkonditionierung der Kammer mit Zuluft und die gleichmäßige Verteilung der Surrogate in der Kammerluft ist eine Luftumwälzung notwendig. Dies könnte auch durch einen zusätzlich aufgebauten und von außen schaltbaren Ventilator ermöglicht werden, eine Prüfkammer-interne Luftumwälzung ist aber von Vorteil, da dann kein zusätzliches mögliches Strömungshindernis in der Kammer steht. Strömungshindernisse sollten weitgehend vermieden werden (besonders beim Aufbau von Tischgeräten), um gleichbleibende Bedingungen für die Prüfung zu schaffen. Dass dies nicht den realen Bedingungen in einem (Büro)Raum entspricht, ist für den Vergleich unter Luftreinigern unerheblich. Da die Luftführung bei den Luftreinigern sehr unterschiedlich ist muss die Eignung für einen spezifischen Büroraum individuell entschieden werden. Mit der Kammerprüfung soll die Leistungsfähigkeit einheitlich dargestellt werden können. Deshalb sollte nach der Dosierung der Surrogate die Luftumwälzung der Kammer ausgestellt und die Luftbewegung allein dem Luftreiniger überlassen werden. Für den Fall dass der Luftreiniger durch Kurzschlussströmungen im Nahbereich eine Zone besonders „sauberer“ Luft um sich bildet (sog. „Clean Air Bubble“), die mit der Probenahme (mindestens 1 Meter entfernt vom Luftreiniger) nicht erfasst wird, kann in Erwägung gezogen werden, die Kammerluft am Ende der Luftprobenahme nochmals zu durchmischen um die insgesamt reduzierten Konzentrationen zu bestimmen. Für Konzentrationsbestimmung zur Berechnung des Bewertungsmaßstabs (CADR) ist es jedoch notwendig, die Bedingungen über einen Zeitraum von 90 Minuten gleichbleibend zu lassen. Der Probe-

nahmezeitraum sollte mindestens 90 Minuten betragen um ausreichend Werte für eine Abklingkurve zu erhalten. Im Anschluss an die Blindwertprobe zur Überprüfung der Desinfektionsmaßnahmen, nach Aufbau des Luftreinigers und des Probenahmeequipments, sollte die Dosierung erfolgen. Die Länge der Dosierung richtet sich nach den Konzentrationen der Stammlösung. Je höher die Ausgangskonzentrationen, die mit einer Initialprobe nach der Dosierung und vor Luftreinigerstart bestimmt werden, sind, desto länger können auch die Konzentrationen bei besonders effektiv arbeitenden Luftreinigern nachverfolgt werden. Luftreiniger deren Wirkprinzip auf der Abgabe von inaktivierenden Substanzen in die Raumluft beruht, zeigen bei besonders hohen Konzentrationen möglicherweise eine geringere Leistung, da die abgegebenen Reaktionsprodukte (Hydroxylradikale und/oder Ozon) eine bestimmte Menge umfassen, die nur eine entsprechende Zahl an Surrogaten inaktivieren kann und dann „verbraucht“ ist und neu produziert werden muss. Diese Geräte schneiden folglich mit sehr hohen Surrogat-Konzentrationen schlechter ab als andere Geräte, obwohl sie bei realistischen Konzentrationen luftgetragener Pathogene vielleicht eine gleichwertige Reinigungsleistung zeigen würden. Als Surrogate werden aus Sicht des Arbeitsschutzes Organismen der Risikogruppe 1 empfohlen. MS2 Phagen eignen sich z. B. gut als Viren-Surrogate, da sie vergleichsweise einfach anzuziehen sind und sie relativ robust gegenüber den im luftgetragenen Zustand auftretenden Effekten sind. MS2-Viren werden bevorzugt als Surrogat für Noroviren eingesetzt. Dass sie auch z. B. gegenüber UV-Strahlung widerstandsfähiger sind als viele pathogene Viren und zu den kleineren Viruspartikeln zählen, sollte kein Argument gegen die Übertragbarkeit der Ergebnisse sein. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass ein Luftreiniger, der MS2-Phagen effektiv inaktiviert oder entfernt, auch in der Lage ist, die Konzentrationen anderer Viren zu senken. Dabei spielt auch die Überprüfung möglicher sekundärer Emissionen in die Raumluft eine wichtige Rolle. Wie die Untersuchungen zeigten, kann es beim Betrieb verschiedener Luftreinigertypen zu relevanten Ozon-, Stickoxid- oder UV-Strahlungs-Emissionen kommen, so dass es für die Bewertung eines Luftreinigers notwendig ist, diese ebenfalls zu erfassen.

Tabelle 13: empfohlene Rahmenbedingungen für einen Luftreinigertest in Prüfkammer

	Spezifikation	Verfahren	Anmerkung
Prüfkammer	30 m ³ Edelstahlkammer, Temperatur und Luftfeuchte konditionierbar, gleichmäßige Durchmischung der Kammerluft durch regelbare Ventilatoren, Probenahmesonden mindestens 1 m entfernt und nicht in Anströmrichtung des Prüflings,	Prüfling nach Herstellerangaben an Wand oder in Kammermitte positionieren, medizinischen Vernebler mit Surrogatsuspension (Menge eingewohnen) einstellen, nach Vorkonditionierung der Kammerluft auf 23 °C, 50 % rel. Luftfeuchte Kammer geschlossen halten, anschließend Zuluft aus, Surrogatdosierung starten mit Kammer in Umluftbetrieb, nach 30 Minuten Dosierung Umluft aus, Start von Probenahme (min. 90 Minuten) und Luftreinigerbetrieb	Desinfektion der Kammer durch Ausheizen oder Spülen mit Ozon
Surrogat	MS2-Phagen, ikosaedrisches unbehülltes Kapsid mit ca. 30 nm Durchmesser, (+)ssRNA, Enterobacteriaceae als Wirtsorganismen	Anzucht in <i>Escherichia coli</i> (DSM5210) und Aufreinigung durch Dialyse gemäß ISO 10705-2, Einstellung der Suspension auf eine Konzentration von etwa 10 ¹¹ bis 10 ¹² PFU/ml in deionisiertem Wasser	
Sammelmethode	Impingement in AGI30 mit 30 ml PBS	Durchfluss auf 11 Liter pro Minute einstellen, kontinuierlich aufeinander folgende Probenahmen für jeweils 15 Minuten (s. Tab. 3)	Parallele Erfassung von Ultrafeinpartikel-, Feinpartikel-, Ozon- und Stickoxidkonzentrationen
Nachweisverfahren	Zweischicht-Agar-Kultur-Verfahren	Impingerlösungen auswiegen und in Verdünnungsreihen	

	Spezifikation	Verfahren	Anmerkung
		überführen, <i>E-scherichia coli</i> (DSM5210) in TYGB in log-Phase bringen (frische Kolonie in 50 ml Bouillon, 37 C Schüttelbad ca. 1,5 Stunden), je 1 ml Phagen- und Bakterienlösung mit halbfestem TYG-Agar vermischen und auf vorbeschichtete Petrischalen ausgießen , 24 Stunden bei 36 °C bebrüten	
Bewertungsmaßstab	CADR (MS2) CADR (Ultrafeinpartikel) CADR (Feinpartikel)	CADR berechnen aus Konstante der Konzentrationsreduktion abzüglich der Reduktionskonstante der ND pro Stunde und Kubikmeter, dafür ermittelte Werte von Minute 0 bis Minute 89 verwenden	i. D. R. ist CADR (MS2) durch inaktivierende Mechanismen höher als CADR (Partikel)

Empfehlungen für Virusmessungen Prüfkanälen

Grundsätzlich kann für die Messungen von Virusfrachten in Luftströmen wie sie in Luftkanälen, Prüfkanälen, Zu- und Abluftschächten etc. vorkommen eine Out-stack Anordnung für die Probenahme empfohlen werden. Die Benutzung von Messsonden, die mit der Eintrittsöffnung in Richtung der Luftströmung ausgerichtet werden können, hat gleich mehrere Vorteile. Bei geradliniger Einströmung in die Sonde und bei zu erwartenden kleinen Partikelgrößen benötigt es keine Anpassung für isokinetische Messungen. Bei nicht bekannten Partikelgrößen oder zu erwartenden Partikelgrößen, die von der Trägheit stärker beeinträchtigt werden, kann über den Durchmesser der Sondenöffnung und ein geregeltes Luftprobevolumen eine isokinetische Messung erfolgen. Messwiederholungen sind möglich ohne dass ein Probenahmegerät von außen kontaminiert wird. Zu beachten gilt, dass der Probevolumenstrom, der das Sammelmedium und das Messgerät passiert, nicht zu einer Kontamination von Räumen oder der Außenluft führen sollte oder gar ein mögliches Risiko für Mensch oder Tier darstellt. Es wird daher empfohlen den Probevolumenstrom entweder in den Luftkanal bzw. Prüfkanal zurückzuleiten

oder diesen z.B. durch den Einsatz geeigneter HEPA-Filter zu dekontaminieren. Bei Untersuchungen an Prüfkanälen mit Einsatz von Erregern die einer Risikogruppe nach Biostoffverordnung zugeordnet werden können, muss gewährleistet werden, dass durch die Öffnung für Messsonden und von der Probenluftführung außerhalb des Prüfkanals keine Bioaerosole freigesetzt werden können. Für Flüssigkeitssammler wie Impinger oder Biosampler werden Sicherheitsklammern empfohlen, die das versehentlich Öffnen der Sammelgefäße verhindern. Bei Erregern höherer Risikogruppe (ab Risikogruppe 2) kann empfohlen werden, die Sammelgeräte in einer gasdichten Kammer zu betreiben und die Probenluft über Sicherheitsventile zu und abzuführen. Die Aufarbeitung der Proben sollte nach der Probenahme unter geeigneten Sicherheitswerkbänken erfolgen. Wird über die Luftfördereinheit bzw. Pumpen die Probenluft in den Raum abgegeben, muss durch Prüfungen gewährleistet werden, dass diese nach der Aufbereitung Erregerfrei ist. Hier ist insbesondere darauf zu achten, dass zu hoch eingestellte Virusfrachten auch einen geprüften HEPA-Filter passieren. Die Viruslasten müssen unter den garantierten Abscheideraten liegen. Eine Abscheiderate von 99,995 % für einen HEPA-Filter der Klasse H14 klingt hoch. Bei Einsatz von 10^6 infektiösen Viruspartikeln pro Kubikmeter würden allerdings theoretisch noch infektiöse 50 Partikel pro Kubikmeter den Filter durchdringen. Untersuchungen in dieser Studie zeigten, dass bei Dekontamination des Abluftstromes der Messstrecke mit einer UV-C Einheit und einem geprüften H14 Filter Phagen ab einer Konzentration von 4×10^6 PFU/m³ im Abluftstrom mehrfach nachweisbar waren. Es wird daher für Versuchseinstellungen bei denen Prüfviren eingesetzt werden empfohlen, die Viruslast im Luftstrom deutlich unter 10^6 kultivierbaren oder infektiösen Partikeln pro Kubikmeter zu halten, wenn nur mit einer Filterstufe der Klasse H14 die Luft dekontaminiert werden soll. Idealerweise wird zur Sicherheit eine zweite Filterstufe der Klasse H14 oder höher zur Dekontamination der Abluft eingesetzt. An dieser Stelle sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass das Ziel dieser Untersuchungen war, festzustellen welches Probenahmeverfahren für den Nachweis behüllter und unbehüllter Surrogat-Viren und deren Nukleinsäuren geeignet scheint. Um bei gleichartigen Untersuchungen mit eingestuftem Bioaerosolen die Sicherheit am Arbeitsplatz zu gewährleisten, sind die bestehenden Vorschriften wie die Biostoffverordnung und Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe zu beachten und einzuhalten. Die Empfehlungen zu den Probenahmeverfahren setzen voraus, dass die jeweils geltenden Vorschriften eingehalten werden.

Aufgrund der höheren Nachweisraten und geringeren Streuung kann das Impingement gegenüber den getesteten Filterprobenahmen für den Nachweis kultivierbarer bzw. infektiöser Viruspartikel empfohlen werden. Je nach Fragestellung ist eine untere Nachweisgrenze zu berücksichtigen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen lag die untere Grenze etwa bei 300 PFU/m³. Wenn 10^5 kultivierbare Viruspartikel pro m³ eingesetzt werden, ließen sich somit z.B. Reduktionen von ca. 3 Logstufen (99,9%) ermitteln. Durch längere Probenahmen könnte die Nachweisgrenze noch gesenkt werden bzw. ein noch höherer Verlust ermittelt werden, wenn dies für die Fragestellungen von Bedeutung sein sollte.

Für den quantitativen Nachweis von RNA Kopien (ssRNA und dsRNA) scheint das Impingement ebenfalls geeignet. Ein Vorteil der Anwendung bestünde darin, dass der kulturelle Nachweis von Viren und derer RNA aus derselben Probe geführt werden könnte. Interessiert nur die

Quantifizierung von RNA-Kopien, zeigte der PTFE-Filter bei ähnlichen Abweichungen vom Median wie beim Impingement teilweise signifikant höhere Ausbeuten für beide RNA Arten. Daher kann der PTFE-Filter als Sammelmedium für luftgetragene Virale RNA empfohlen werden. Es darf angenommen werden, dass dieser Filter auch für den Nachweis von viraler DNA geeignet ist. Vergleichsuntersuchungen mit DNA Viren wurden allerdings nicht vorgenommen.

8. Projektveröffentlichungen

Annette Clauß, Sebastian Wientzek, Jochen Schulz (2024): Ein einheitlicher Prüfstandard für die Wirksamkeit von Luftreinigern/A uniform test standard for the effectiveness of air purifiers Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft, 84 03-04, Seite 81 – 88, doi.org/10.37544/0949-8036-2024-03-04-19, ISSN print: 0949-8036, ISSN online: 0949-8036

weitere Publikationen in Arbeit

Unterschriftenseite verpflichtend für Kooperationsprojekte

Projektnummer: FP0469

Titel: Entwicklung und Evaluierung eines Prüfstandards für die Wirksamkeit von Luftreinigern zur Reduktion der Virenfracht in Innenraumluft

Erklärung für das Berichtswesen in Kooperationsprojekten

Hiermit erklären die Unterzeichnenden, dass der zum 31.05.2024 vorgelegte

Abschlussbericht mit allen Kooperationspartnern abgestimmt ist.

Dr. Annette Clauß, Fraunhofer WKI _____ Datum: 31.05.2024

Name, Institution



PD Dr. Jochen Schulz, ITTN _____ Datum: 31.05.2024

Name, Institution



_____ Datum:

Name, Institution

_____ Datum:

Name, Institution

_____ Datum:

Name, Institution

_____ Datum:

Name, Institution

Literaturverzeichnis

1. Tellier, R., *Review of aerosol transmission of influenza A virus*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(11): p. 1657-62.
2. Drosten, C., et al., *Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(20): p. 1967-76.
3. Organization), W.W.H., *Modes of transmission of virus causing COVID-19: implications for IPC precaution recommendations*. 2020.
4. Morawska, L. and J. Cao, *Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality*. Environment International, 2020. **139**: p. 105730.
5. Jialei Shen, M.K., Bing Dong, Michael J. Birnkrant, Jianshun Zhang, *Airborne transmission of SARS-CoV-2 in indoor environments: A comprehensive review*. Science and Technology for the Built Environment, 2021. **27**(10): p. 1331-1367.
6. Cheek, E., et al., *Portable air purification: Review of impacts on indoor air quality and health*. Science of The Total Environment, 2021. **766**: p. 142585.
7. *Einsatz mobiler Luftreiniger als Lüftungsunterstützende Maßnahme in Schulen während der SARS-CoV-2 Pandemie*, K.I.I.a. Umweltbundesamt, Editor.
8. Azimi, P. and B. Stephens, *HVAC filtration for controlling infectious airborne disease transmission in indoor environments: Predicting risk reductions and operational costs*. Build Environ, 2013. **70**: p. 150-160.
9. *DIN EN 1822-1:2019-10*, in *Schwebstofffilter (EPA, HEPA und ULPA) - Teil 1: Klassifikation, Leistungsprüfung, Kennzeichnung*.
10. Barnard, I.R.M., E. Eadie, and K. Wood, *Further evidence that far-UVC for disinfection is unlikely to cause erythema or pre-mutagenic DNA lesions in skin*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2020. **36**(6): p. 476-477.
11. Adriana Schwartz, G.M.S., Roberto Quintero, *Mögliche Verwendung von Ozon bei SARS-CoV-2 / COVID-19 MADRID DECLARATION ON OZONE THERAPY*, I.I.S.C.o.O. Therapy), Editor.
12. Buonanno, M., et al., *Far-UVC light (222 nm) efficiently and safely inactivates airborne human coronaviruses*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 10285.
13. *VDI 4253 Blatt 2*, in *Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilz-Konzentrationen in der Luft - Indirektes Verfahren nach Probenahme auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern*. 2004, VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss.
14. Vuorinen, V., et al., *Modelling aerosol transport and virus exposure with numerical simulations in relation to SARS-CoV-2 transmission by inhalation indoors*. Saf Sci, 2020. **130**: p. 104866.
15. Jin, Y.H., et al., *A rapid advice guideline for the diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) infected pneumonia (standard version)*. Mil Med Res, 2020. **7**(1): p. 4.
16. Drewnick, F., *Abscheideeffizienz von Mund-Nasen-Schutz Masken, selbstgenähten Gesichtsmasken, potentiellen Maskenmaterialiensowie „Community Masken“*. 2020.
17. Gregson, F.K.A., et al., *Comparing aerosol concentrations and particle size distributions generated by singing, speaking and breathing*. Aerosol Science and Technology, 2021. **55**(6): p. 681-691.
18. D. Mürbe, M.F., J. Lange, H. Rotheudt, M. Kriegel, *Aerosol emission is increased in professional singing*. 2021.
19. Stadnytskyi, V., et al., *The airborne lifetime of small speech droplets and their potential importance in SARS-CoV-2 transmission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(22): p. 11875-11877.
20. Asadi, S., et al., *Aerosol emission and superemission during human speech increase with voice loudness*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 2348.
21. Hinds, W., *Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles*. 1999, New York: Wiley.

22. Morawska, L. and T. Salthammer, *Indoor Environment: Airborne Particles and Settled Dust*. 2006. 1-450.
23. Xie, X., et al., *How far droplets can move in indoor environments--revisiting the Wells evaporation-falling curve*. *Indoor Air*, 2007. **17**(3): p. 211-25.
24. Fennelly, K.P., *Particle sizes of infectious aerosols: implications for infection control*. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2020. **8**(9): p. 914-924.
25. Wang, C.C., et al., *Airborne transmission of respiratory viruses*. *Science*, 2021. **373**(6558).
26. Brown, R.C.D. *Air Filtration: An Integrated Approach to the Theory and Applications of Fibrous Filters*. 1993.
27. Budowsky, E.I., et al., *Principles of selective inactivation of viral genome. I. UV-induced inactivation of influenza virus*. *Arch Virol*, 1981. **68**(3-4): p. 239-47.
28. Shiraki, K., et al., *Improved Photocatalytic Air Cleaner with Decomposition of Aldehyde and Aerosol-Associated Influenza Virus Infectivity in Indoor Air*. *Aerosol and Air Quality Research*, 2017. **17**(11): p. 2901-2912.
29. Kim, J. and J. Jang, *Inactivation of airborne viruses using vacuum ultraviolet photocatalysis for a flow-through indoor air purifier with short irradiation time*. *Aerosol Science and Technology*, 2018. **52**(5): p. 557-566.
30. H. Finger, U.S., C. Asbach, *Bewertung mobiler Raumluftreinigungsgeräte*. *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft*, 2015. **75**: p. 497.
31. Kim, J.S. and M.H. Lee, *Effect of filter collection efficiency on the clean air delivery rate in an air cleaner*. *Indoor Air*, 2021. **31**(3): p. 745-754.
32. Curtius, J., M. Granzin, and J. Schrod, *Testing mobile air purifiers in a school classroom: Reducing the airborne transmission risk for SARS-CoV-2*. *Aerosol Science and Technology*, 2021. **55**(5): p. 586-599.
33. C. Kähler, T.F., R. Hain, *Können mobile Raumluftreiniger eine indirekte SARS-CoV-2 Infektionsgefahr durch Aerosole wirksam reduzieren?* 2020.
34. Yun, S., et al., *Proxy methods for detection of inhalation exposure in simulated office environments*. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology*, 2023. **33**(3): p. 396-406.
35. *VDI-EE 4300 Blatt 14, in Messen von Innenraumluftverunreinigungen - Anforderungen an mobile Luftreiniger zur Reduktion der aerosolgebundenen Übertragung von Infektionskrankheiten*. 2021, VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss.
36. *VDI 4258 Blatt 2, in Bioaerosole und biologische Agenzien - Herstellung von Prüfbioaerosolen - Anforderungen an Testsysteme*. 2019, VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss.
37. *VDI 4258 Blatt 1, in Bioaerosole und biologische Agenzien - Herstellung von Prüfbioaerosolen - Grundlagen und Anforderungen an Prüfbioaerosole*. 2017, VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss.
38. *VDI 4252 Blatt 2, in Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Aktive Probenahme von Bioaerosolen - Abscheidung von luftgetragenen Schimmelpilzen auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern*. 2004, VDI/DIN-Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) - Normenausschuss.
39. *DIN EN 16798-3, in Energetische Bewertung von Gebäuden - Lüftung von Gebäuden - Teil 3: Lüftung von Nichtwohngebäuden - Leistungsanforderungen an Lüftungs- und Klimaanlage und Raumkühlsysteme* 2017.
40. *Messen von Innenraumluftverunreinigungen - Anforderungen an mobile Luftreiniger zur Reduktion der aerosolgebundenen Übertragung von Infektionskrankheiten*, in *VDI EE 4300 Blatt 14*, F.U.V.D.-K.R.d.L.K.-. Normenausschuss, Editor. 2021.
41. *DIN EN ISO 10705-2, in Wasserbeschaffenheit - Nachweis und Zählung von Bakteriophagen - Teil 2: Zählung von somatischen Coliphagen (ISO 10705-2:2000)*. 2002.

42. Dreier, J., M. Störmer, and K. Kleesiek, *Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4551-7.
43. Gendron, L., et al., *Evaluation of Filters for the Sampling and Quantification of RNA Phage Aerosols*. Aerosol Science and Technology, 2010. **44**(10): p. 893-901.
44. Transfusionsmedizin, K.K.I.f.L.-u., *Forschungsvorhaben S 770 gefördert durch die Stiftung Industrieforschung: Analyse der Verbreitung aerogener Viren über Raumlufttechnische Anlagen und Entwicklung von Desinfektionsmaßnahmen*. 2009.
45. Leenheer, J. and J. Croue, *Characterizing dissolved aquatic organic matter*. Environ. Sci. Technol, 2003. **37**(1): p. 19-26.
46. Cox, C.S. and C.M. Wathes, *Bioaerosols handbook*. 1995: crc press.
47. Hogan, C.J., Jr., et al., *Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles*. J Appl Microbiol, 2005. **99**(6): p. 1422-34.
48. Walls, H.J., et al., *Generation and sampling of nanoscale infectious viral aerosols*. Aerosol Science and Technology, 2016. **50**(8): p. 802-811.
49. Lippmann, M., *Ozone*, in *Environmental and Occupational Medicine*, S.B.M. William N. Rom, Editor. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1445.
50. G. D. Clayton and F. E. Clayton (eds). *Patty's industrial hygiene and toxicology. Toxicology, 4th edn, vol. ii, parts A - f. John Wiley & Sons, New York, Part A, 1993; Parts B -; F, 1994; 5045 pp., total price £944/\$1350*. Journal of Applied Toxicology, 1995. **15**(5): p. 421-421.
51. *LV 45 Leitlinien zur Gefahrstoffverordnung*. 2018. p. 78.
52. *Ozone [MAK Value Documentation, 1998]*, in *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*. p. 172-199.
53. Seal, E., Jr., et al., *The pulmonary response of white and black adults to six concentrations of ozone*. Am Rev Respir Dis, 1993. **147**(4): p. 804-10.
54. King, M.E., *Toxicity of ozone. V. Factors affecting acute toxicity*. Ind Med Surg, 1963. **32**: p. 93-4.
55. Englert, N., *Ozon als Luftschadstoff*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2000. **43**(7): p. 487-493.
56. Freeman, G., et al., *Pathology of pulmonary disease from exposure to interdependent ambient gases (nitrogen dioxide and ozone)*. Arch Environ Health, 1974. **29**(4): p. 203-10.
57. Goldstein, E., et al., *Ozone and nitrogen dioxide exposure: murine pulmonary defense mechanisms*. Arch Environ Health, 1974. **28**(2): p. 85-90.
58. Hensel, H., *Thermoreception and temperature regulation*. Monogr Physiol Soc, 1981. **38**: p. 1-321.
59. Fanger, P.O. and N.K. Christensen, *Perception of draught in ventilated spaces*. Ergonomics, 1986. **29**(2): p. 215-235.
60. K. Fitzner, U.F., O. Zeidler *Wirksamkeit von mobilen Klimageräten*. BAUA.
61. *DIN EN 16798-1:2022-03*, in *Energetische Bewertung von Gebäuden - Lüftung von Gebäuden - Teil 1: Eingangparameter für das Innenraumklima zur Auslegung und Bewertung der Energieeffizienz von Gebäuden bezüglich Raumluftqualität, Temperatur, Licht und Akustik*.
62. *DIN EN ISO 7726:2021-03 Umgebungsklima - Instrumente zur Messung physikalischer Größen (ISO 7726:1998); Deutsche Fassung EN ISO 7726:2001*
63. *DIN EN ISO 7730:2006-05 Ergonomie der thermischen Umgebung - Analytische Bestimmung und Interpretation der thermischen Behaglichkeit durch Berechnung des PMV- und des PPD-Indexes und Kriterien der lokalen thermischen Behaglichkeit (ISO/DIS 7730:2023)*.
64. *Technische Anleitung zum Schutz gegen Lärm (TA Lärm)*, in *Sechste Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundes-Immissionsschutzgesetz*. 1998.
65. *DIN 45645-2:2012-09 Ermittlung von Beurteilungspegeln aus Messungen - Teil 2: Ermittlung des Beurteilungspegels am Arbeitsplatz bei Tätigkeiten unterhalb des Pegelbereiches der Gehörgefährdung*.

66. John D. Meyer, R.J.M., *Occupational Exposure to Noise*, in *Environmental and Occupational Medicine*, S.B.M. William N. Rom, Editor. 2007, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. p. 1295.
67. Schreier, W.J., et al., *Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction*. *Science*, 2007. **315**(5812): p. 625-9.
68. (SSK), S., *Risiken des Einsatzes von Fern-UVC-Strahlung zur Desinfektion in Anwesenheit von Menschen*. 2023, Strahlenschutzkommission.
69. Manufacturers, A.o.H.A., *AHAM AC-1. Method for Measuring Performance of Portable Household Electric Room Air Cleaners*. 2019.
70. *GB/T 18801-2022*, N.S.M.C. State Administration for Market Regulation, Editor. 2022.
71. *C22.2 NO. 187-M1986 (R2008) - Electrostatic Air Cleaners*. 1986, CSA Group.
72. (JEMA), J.E.M.A., *JEM 1467 - Residential Air Cleaners*. 1995.
73. *VDI 3926 Blatt 1*, in *Prüfung von Filtermedien für Abreinigungsfilter - Standardprüfung zur vergleichenden Bewertung von abreinigbaren Filtermedien*. 2004.
74. *DIN EN ISO 16890-2:2023-12*, in *Luftfilter für die allgemeine Raumlufttechnik - Teil 2: Ermittlung des Fraktionsabscheidegrades und des Durchflusswiderstandes* 2023.
75. *DIN 71460-1:2006-04*, in *Straßenfahrzeuge - Luftfilter für Kraftfahrzeuginnenräume - Teil 1: Prüfverfahren für Partikelfiltration*. 2006.
76. *VDI 6022 Blatt 1:2018-01*, in *Raumlufttechnik, Raumluftqualität - Hygieneanforderungen an raumlufttechnische Anlagen und Geräte (VDI-Lüftungsregeln)*. 2018.
77. *DIN/TS 67506: Entkeimung von Raumluft mit UV-Strahlung - UV-C-Sekundärluftgeräte*. 2022.
78. Foarde, K.K., *Development of a Method for Measuring Single-Pass Bioaerosol Removal Efficiencies of a Room Air Cleaner*. *Aerosol Science and Technology*, 1999a. **30**(2): p. 223-234.
79. Foarde, K.K., *Methodology to Perform Clean Air Delivery Rate Type Determinations with Microbiological Aerosols*. *Aerosol Science and Technology*, 1999b. **30**(2): p. 235-245.
80. Alan Beswick, J.B., Iwona Rosa, Claire Bailey, Charlotte Beynon, Stephen Stagg, and Neil Bennett, *Room-Based Assessment of Mobile Air Cleaning Devices Using a Bioaerosol Challenge*. *Applied Biosafety*, 2023. **28**(1): p. 1-10.
81. Manufacturers, A.o.H.A., *AHAM AC-5-2023. Method for Assessing the Reduction Rate of Key Bioaerosols by Portable Air Cleaners Using an Aerobiology Test Chamber*. 2023.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 30 m ³ Edelstahl-Prüfkammer (© Marek Kruszewski, WKI); schematische Darstellung der Positionen (LR Luftreiniger, D Phagensdosierung, ▶ Probenahmeports in der Kammerwand) .	13
Abbildung 2: Bereich der in der Luft gefundenen Surrogat-Konzentrationen (pfu/m ³ MS2) als Prozentsatz der Anfangskonzentration (absolute Minima und Maxima aller Messungen von 11 verschiedenen Luftreinigern) über die Zeit in der Prüfkammer mit (Modus 1) und ohne zusätzliche Luftumwälzung (Modus 2); die grüne Linie stellt die natürlichen Abklingrate dar („natural decay“, ND, ohne Luftreiniger, beispielhaft dargestellt durch die Ergebnisse einer Messreihe), die orangefarbene Linie die in der VDI-EE 4300 Blatt 14 geforderte Reduktion um eine Logstufe.....	14
Abbildung 3: Edelstahl-Prüfkanal in S2-Labor am Standort ITTN; Probenahmen mit Sammelköpfen und Impingern an vorläufigem baugleichen Prüfkanal aus mineralfaserverstärkten Polypropylen-Kanalgrundrohren zur Findung der optimalen Messpositionen	15
Abbildung 4: Ultrafeinpartikelanzahl und -größenverteilung nach Vernebelung von MS2-Phagen mit zwei verschiedenen Bioaerosolgeneratoren in der Prüfkammer.....	22
Abbildung 5: Vergleich der Größenverteilung der von zwei verschiedenen Biosaerosolgeneratoren erzeugten Ultrafeinpartikel direkt nach Vernebelung von MS2-Phagen und nach 90 Minuten Abklingzeit in der Prüfkammer	23
Abbildung 6: Größenverteilung der Ultrafeinpartikel in der Kammerluft unmittelbar nach Ende der Surrogatdosierung bei Vernebelung von MS2-Phagen, Staphylococcus xylosus oder Phi 6-Phagen mit dem medizinischen Vernebler.....	23
Abbildung 7: Größenverteilung der Feinpartikel in der Kammerluft unmittelbar nach Ende der Surrogatdosierung bei Vernebelung von MS2-Phagen, Staphylococcus xylosus oder Phi 6-Phagen mit dem medizinischen Vernebler, Ergebnisse des Optischen Partikelgrößenmessgeräts (OPS)	24
Abbildung 8: die mit Impingement erhaltenen mittleren Konzentrationen der drei in der Prüfkammer verwendeten Surrogate im Vergleich, mit (Säulen) laufendem Luftreiniger (UV-C-Gerät) und ohne (Linien; ND, natural decay).....	20
Abbildung 9: Vergleich der Konzentrationsverläufe luftgetragener Phagen in der Prüfkammer bei laufendem Luftreiniger zweier unterschiedlicher Typen als Anteil der Konzentrationen zum Zeitpunkt des Luftreiniger-Starts (T ₀).....	21
Abbildung 10: Erhaltene PFU/m ³ MS2 als Prozentanteile der rechnerischen Ausgangskonzentration aus Parallelmessungen mit Impingern, Filtern und Fliehkraftabscheidern in der Prüfkammer in Modus 2 (ohne Umwälzung der Kammerluft) ohne laufenden Luftreiniger (natural decay)	28
Abbildung 11: Wiederfundrate MS2-Phagen in 30m ³ -Kammer zu Probenahmezeitpunkt T ₀ ; Lage- und Streuungsmaße aus allen „natural decay“-Messungen in Modus 2 (ohne Umwälzung der Kammerluft).....	29
Abbildung 12: mit drei verschiedenen Sammelmethode erhaltenen Konzentrationsverläufe PFU/m ³ MS2 in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger	29
Abbildung 13: Konzentrationen von MS2 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.....	30
Abbildung 14: Konzentrationen von MS2 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.....	30
Abbildung 15: Konzentrationen von Phi6 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.....	31

Abbildung 16: Konzentrationen von Phi6 an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.....	31
Abbildung 18: Konzentrationen von MS2 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.	32
Abbildung 17: Konzentrationen von MS2 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.	32
Abbildung 19: Konzentrationen von Phi6 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 1 m/s.	33
Abbildung 20: Konzentrationen von Phi6 RNA Kopien an zwei Positionen (vorne, hinten) im Prüfkanal zeitgleich erfasst. Strömungsgeschwindigkeit 3 m/s.	33
Abbildung 21: Konzentrationsverläufe von Ultrafeinpartikeln, Ozon, Stickoxiden und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Ozongenerator).....	37
Abbildung 22: Konzentrationen luftgetragener MS2-Phagen (Kammer ohne Umwälzung, ohne Luftreiniger) anhand der Ergebnisse verschiedener Sammelmedien mit anschließender Ozon-Exposition.....	38
Abbildung 23: Konzentrationsverläufe von Feinpartikeln, Ozon, Stickoxiden und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Elektrostat)	42
Abbildung 24: Konzentrationsverläufe von Feinpartikeln, Ultrafeinpartikeln und MS2-Phagen in der Prüfkammer ohne Luftreiniger (natural decay).....	52
Abbildung 25: Konzentrationsverläufe von Feinpartikeln, Ultrafeinpartikeln und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Filtergerät)	52
Abbildung 26: Konzentrationsverläufe von Ultrafeinpartikeln und MS2-Phagen in der Prüfkammer mit laufendem Luftreiniger (Inaktivierung durch UV-Strahlung und Filter).....	53
Abbildung 27: exemplarischer Konzentrationsverlauf von MS2 in der Prüfkammer ohne Umwälzung mit laufendem Luftreiniger mit Steigungsgleichung und Bestimmtheitsmaß	53

UV-Messung am Luftreiniger (siehe Bilder 1 und 2), Multiflex Range Air Purifier, Model no. MF 40 am 10.08.2023 in der Prüfstelle der BG ETEM in Köln:

Messort: // ca. 2 cm hinter den Lüftergittern, in der Nähe der Netzzuleitung (*dichter geht nicht!*)
// an dieser im Bild festgehaltenen Position wurde die maximale UV-Bestrahlung ermittelt.
// ...jeder cm mehr Abstand zu den Lüftungsgittern verringert die UV-C Exposition enorm.
(Ein cm mehr Abstand verringert die UV-C Belastung um ca. den Faktor 2!)



Bild 1

Gerätebezeichnung:



Bild 2

Messergebnis aus Bild 1: **ACGIH = 12,2 mW** // Bewertung incl. $S(\lambda)$

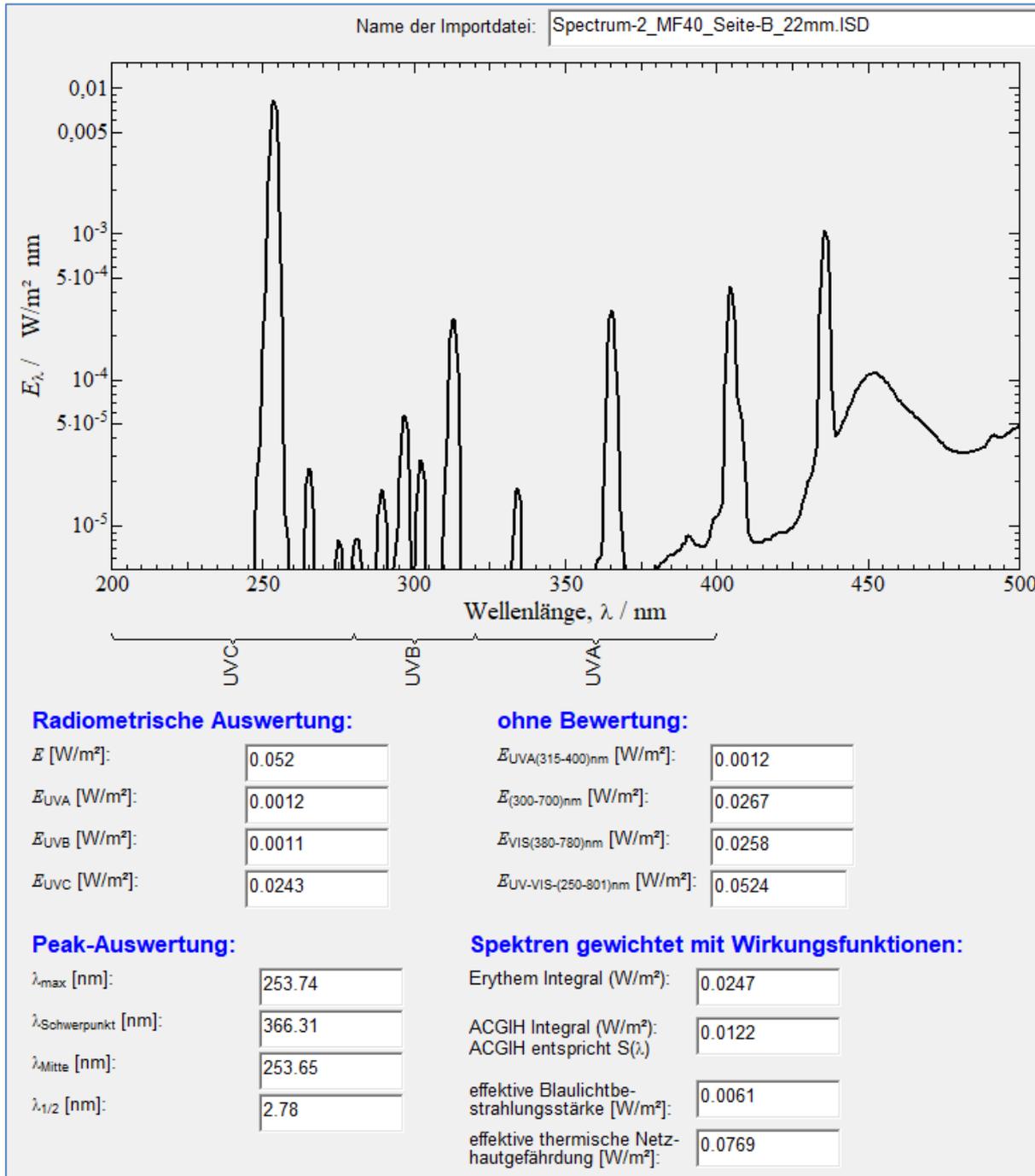


Bild 3

Gemessen wurde mit dem kalibrierten Spektrometer (spektrale Messung der Bestrahlungsstärke) der Fa. Instument Systems, Typ: CAS 140 CT-152, SN 136314211, mit der Einkoppeloptik EOP-146.

UV-Messung am Luftreiniger (siehe Bilder 4 und 5), UV-C STERILON, Model FLOW 1440W am 10.08.2023 in der Prüfstelle der BG ETEM in Köln:

Messort: sehr dicht am oberen Luftauslass (siehe Bild 4) ist die UV-C Strahlung deutlich geringer als an der untern Ansaugung (orangener Pfeil). Je höher an der Ansaugung (orangener Pfeil) gemessen wird umso höher ist die UV-C Strahlung. Das Messergebnis ist ca. um den Faktor 2 kleiner als beim Model MF40.

// ...jeder cm mehr Abstand zu den Lüftungsgittern verringert die UV-Exposition enorm.



Bild 4

Gerätebezeichnung:



Bild 5



Standard Operating Procedure (SOP)

Zellkultur & Influenza

Dr. Svea Matthiesen

**Stiftung Tierärztliche Hochschule
AG Tierhygiene & Tierhaltung, PD Dr. Jochen Schulz
Institut für Tierhygiene, Tierschutz und Nutztierethologie (ITTN)
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover**

Stand 28.09.23

Inhaltsverzeichnis

1. Biologisches Material	1
1.1 Zelllinien	1
1.2 Virusstämme.....	1
2. Medien und Medienzusätze	1
3. Zellkulturmethoden	2
3.1 Auftauen der Zellen.....	2
3.2 Kultivierung der Zellen	2
3.3 Kryokonservierung der Zellen	4
4. Virus-assoziierte Arbeiten	5
4.1 Herstellung von Influenza-Stocks.....	5
4.1.1 Herstellung von Influenza-Stocks in embryonierten Hühnereiern	5
4.1.2 Herstellung von Influenza-Stocks in MDCK-Zellen	8
4.2 Titerbestimmung eines Influenza-Stocks mittels TCID ₅₀	9
4.3 Bestimmung der Viruslast von Impinger-Proben mittels TCID ₅₀	13
Tabellenverzeichnis	15
Abbildungsverzeichnis	15

1. Biologisches Material

1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Name	Beschreibung	Herkunft
MDCK (NBL-2)	Kanine Nierenzellen, adhären	Merck

1.2 Virusstämme

Tabelle 2: Verwendete Virusstämme

Name	Herkunft
Influenza A/Hessen/40/2020 (A/H1N1pdm09)	Robert-Koch-Institut
Influenza A/Saarland/25/2019 (A/H3N2)	Robert-Koch-Institut
Influenza B/Berlin/23/2020 (B/Victoria)	Robert-Koch-Institut
Influenza B/Berlin/5/2020 (B/Yamagata)	Robert-Koch-Institut

2. Medien und Medienzusätze

Tabelle 3: Verwendete Medien und Medienzusätze

Name	Herkunft
Albumin-Lösung (BSA,7.5%)	Merck/Sigma-Aldrich
Cryopan-Einfriermedium	PanBioTech
Fetales Rinderserum (FBS)	Gibco/ThermoFisher Scientific
Gentamicin (50 mg/ml)	ThermoFisher Scientific
Glasgow-MEM (GMEM)	Gibco/ThermoFisher Scientific
HEPES	Carl Roth
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
Penicillin-Streptomycin	Gibco/ThermoFisher Scientific
Trypsin 0.25 %/EDTA 0.53 mM	PanBioTech
<i>L-1-Tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone</i> (TPCK)-treated Trypsin	Sigma-Aldrich

3. Zellkulturmethoden

3.1 Auftauen der Zellen

Die folgenden Protokolle beziehen sich ausschließlich auf die kanine Nierenzelllinie MDCK (engl. *Madin-Darby canine kidney*, auch NBL-2).

Kryokonservierte MDCK-Zellen werden aus dem Stickstofftank (-196°C) entnommen und in einem vorgeheizten Wasserbad (37°C) zügig aufgetaut. Dabei ist darauf zu achten, dass die Dichtung (O-Ring) nicht mit dem Wasser in Berührung kommt, um Kontaminationen zu vermeiden. Das Kryoröhrchen wird vor dem Öffnen desinfiziert und die Zellen in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml) mit 9 ml vorgewärmten MDCK *Growth Medium* (37°C, s. Tabelle 4: Verwendete Kulturmedien) überführt. Die Zellsuspension wird bei 125 xg (~ 1300 rpm) für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird verworfen. Um im nächsten Schritt die Rückgewinnung der Zellen nicht durch eine übermäßige Alkalität des Mediums zu gefährden, wird das im weiteren verwendete Kulturmedium für 15 Minuten im Inkubator akklimatisiert, damit es seinen regulären pH-Wert von 7,0-7,6 bereits erreicht hat, bevor es mit der Zellsuspension in Kontakt kommt. Das Zellpellet aus dem Originalstock/ECACC Vial wird in 10 ml MDCK *Growth Medium* resuspendiert und in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt. Für alle weiteren Zellpellets gilt, dass diese entsprechend ihrer Größe (\cong Zellkonzentration) in 10 ml MDCK *Growth Medium* resuspendiert und in 25 cm²- oder 75 cm²-Kulturflaschen überführt werden. Entsprechend der Zellkonzentration (die als Trübung im Kulturmedium sichtbar ist) werden der Suspension noch weitere 5-10 ml MDCK *Growth Medium* hinzugefügt.

3.2 Kultivierung der Zellen

Die MDCK-Zellen werden in Inkubatoren bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und in regelmäßigen Abständen mikroskopisch kontrolliert.

Für die Subkultivierung werden subkonfluente Zellkulturen (\cong 70-80% *Monolayer*/75 cm²-Kulturflasche) verwendet. Dabei wird das MDCK *Growth Medium* verworfen und der Zellrasen zweimal mit sterilem PBS oder Trypsin/EDTA (0.25%/0.53 mM) gewaschen, um alle Rest von Serum, das Trypsininhibitoren enthält, zu entfernen. Um den Zellrasen zu lösen, wird dieser mit 2-3 ml Trypsin/EDTA behandelt. In der Regel dauert dieser Vorgang 5-15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und sollte nicht durch Schlagen oder Schütteln der Flasche ergänzt werden, da dies zur Verklumpung der Zellen führen kann. Lösen sich durch dieses Vorgehen

nicht, können die Trypsin/EDTA-behandelten Kulturflaschen auch für einige Minuten im Brutschrank inkubiert werden, bis sich der Zellrasen aufgelöst hat. Um die Reaktion abzustoppen, werden 6-8 ml MDCK *Growth* Medium hinzugefügt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren aus der Flasche entfernt. Die Zellsuspension wird nun in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:10 auf neue 25/75 cm²-Kulturflaschen aufgeteilt, welche dann mit dem entsprechenden Volumen MDCK *Growth* Medium aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO₂ weiter kultiviert werden. Das Kulturmedium wird dabei alle zwei bis drei Tage erneuert.

Werden die MDCK-Zellen für Infektionsversuche mit Influenza geerntet, werden diese ebenfalls zunächst in MDCK *Growth* Medium ausgesät. Kurz vor der tatsächlichen Infektion wird das Kulturmedium dann entfernt und der Zellrasen zweimal mit Infektionsmedium (s. Tabelle 4: Verwendete Kulturmedien) gewaschen werden, um alle Reste von FBS zu entfernen, die das Viruswachstum hemmen. Anschließend wird der Zellrasen mit Infektionsmedium versetzt.

Die Basis des Infektionsmediums ist ein *Complete* Medium, dem unmittelbar vor der Verwendung *L-1-Tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone* (TPCK)-*treated* Trypsin hinzugefügt wird (s. Tabelle 4: Verwendete Kulturmedien). Zu diesem Zweck wird eine TPCK-Trypsin-Stocklösung mit einer Konzentration von 2 mg/ml hergestellt: 20 mg TPCK-Trypsin werden in 10 ml GMEM gelöst, durch eine 0,2 µm-Membran filter-sterilisiert und in 0,5 ml-Aliquots bei -70°C bis -80°C gelagert.

Tabelle 4: Verwendete Kulturmedien

Kulturmedium	Agenzien	Menge
MDCK <i>Growth</i> Medium	GMEM	445 ml
	FBS	50 ml
	Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)	5 ml
<i>Complete</i> Medium	GMEM	470 ml
	Penicillin G (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)	5 ml
	BSA-Lösung (7,5% → final 0,2%)	12,5 ml
Infektionsmedium	<i>Complete</i> Medium	500 ml
	TPCK-Trypsin-Stocklösung (2 mg/ml → final 2 µg/ml)	0,5 ml

Die Zellen wurden freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe Haltung & Tierschutz von Versuchstieren (ITTN) regelmäßig auf eine Mykoplasmenkontamination getestet.

3.3 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung wurde das kommerziell erhältliche Einfriermedium „Cryopan“ verwendet. Alternativ kann auch das MDCK *Growth* Medium mit 5% DMSO versetzt und zur Konservierung genutzt werden (= MDCK *Freeze* Mix).

Zunächst werden das MDCK *Growth* Medium, das Einfriermedium sowie die Kryoröhrchen kalt (auf Eis) gestellt. Dann werden die Zellen nach dem regulären Protokoll vom Flaschenboden gelöst (s. Abschnitt „Subkultivierung“ in Kapitel 3.2 Kultivierung der Zellen) und in dem gekühlten Kulturmedium gesammelt. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugationsröhrchen (15 ml) überführt und für 5 Minuten bei 125 xg (~ 1300 rpm) und 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird nun verworfen und die Zellen entsprechend der Größe des Zellpellets erneut in MDCK *Growth* Medium (~ 5-10 ml) aufgenommen. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt und auf $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. In Folge wird die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen des gekühlten Cryopan-Einfriermediums versetzt und sorgfältig auf und ab pipettiert. Von dieser Suspension werden je 1 ml in die kalten Kryoröhrchen gegeben. Alternativ wird die Suspension erneut abzentrifugiert (s. oben) und das Pellet in je 1 ml MDCK *Freeze* Mix pro Kryoröhrchen resuspendiert. Von dieser Suspension werden ebenfalls je 1 ml in die kalten Kryoröhrchen gegeben. Die Kryoröhrchen werden bis zur endgültigen Lagerung in einem Einfrierbehälter („Mr. Frosty) mit Isopropanol verwahrt. Für eine möglichst schonende Konservierung und um Kristallbildung zu minimieren, werden die Ampullen zunächst für 15 Minuten im Kühlschrank bei 4°C gestellt, damit das Einfriermedium in die Zellen eindringen kann. Anschließend werden die Zellen für zwei bis vier Stunden bei -20°C und schließlich über Nacht bei -70°C bis -80°C eingelagert. Sollte die Zeit limitiert sein, können die ersten beiden Schritte übersprungen und die Kryoröhrchen auch unmittelbar bei -70°C bis -80°C eingelagert werden. Am nächsten Tag werden die Kryoröhrchen für die dauerhafte Lagerung in den Stickstofftank (-196°C) umgelagert.

4. Virus-assoziierte Arbeiten

4.1 Herstellung von Influenza-Stocks

Alle Arbeiten mit den genannten Virusstämmen (s. Tabelle 2: Verwendete Virusstämme) sind entsprechend der biologischen Schutzstufe 2 (BSL-2) durchzuführen. Dazu zählen biologische Sicherheitswerkbänke der Klasse II sowie eine entsprechende persönliche Schutzausrüstung (PSA). Das Vorgehen im Havarie-Fall ist festgeschrieben und den zuständigen Mitarbeiter*innen bekannt. Bei Verdacht auf eine Influenza-Infektion des Personals wird entsprechend der RKI-Richtlinien ([Hinweise für die Labordiagnostik bei Verdacht auf eine Influenza-Virusinfektion - RKI](#)) verfahren.

4.1.1 Herstellung von Influenza-Stocks in embryonierten Hühnereiern

Die Infektion von embryonierten Hühnereiern wird auf Grund der hohen Ausbeute als „Gold-Standard“ bei der Vermehrung von Influenza-Viren angesehen (Spackman & Kilian, 2014, *Methods in Molecular Biology*). Dennoch etablieren sich zunehmend Protokolle für die Anzucht in Zellkultur. Diese resultieren in niedrigeren Virustitern (Differenz ~ 1 Log-Stufe, persönliche Kommunikation mit Dr. El-Sayed Mohammed Abd El-Whab, FLI), haben allerdings den Vorteil, dass sie während der Vermehrung keinen Einfluss auf die Haemagglutinincomposition nehmen und keine Unterschiede in der Empfänglichkeit verschiedener Virusisolate bestehen (Youil et al., 2004, *Journal of Virological Methods*; Tree et al., 2001, *Vaccine*). Die Arbeit mit embryonierten Hühnereiern folgt daher dem 3R-Prinzip ([3R-Prinzip - BfR](#)) und wird auf das notwendige Minimum reduziert. Die Arbeitsanweisungen in den folgenden Kapiteln folgen den Methodenpapern von Balish (Balish et al. 2013, *Current Protocols in Microbiology*) und Brauer (Brauer & Chen, 2015, *Journal of Visualized Experiments*).

Als Vorbereitung auf die Inokulation wird zunächst der Influenza-Stock verdünnt, der zur initialen Infektion dienen soll. Die Konzentration dieses Stocks gibt dabei vor, wie stark das Original verdünnt werden muss. Als Faustregel gilt: eine 1:10 bis 1:1000 Verdünnung ergibt eine optimale Virusvermehrung von 10^6 EID₅₀ (s. **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Zur Verdünnung wird Egg-Diluent oder eine Tryptose-Phosphat-Bouillon (s. Tabelle 5: Verwendete Lösungen zur Virusanzucht) genutzt.

Im nächsten Schritt werden pro Verdünnung drei bis fünf embryonierte Hühnereier (9 bis 11 Tage alt) mit dem Luftsack nach oben angeordnet. Als „stand“ wird ein autoklavierbarer, metallener Eierbecher genutzt. In die Position des Luftsackes zu arrangieren wird eine Schierlampe genutzt. Der Rand des Luftsacks wird rundherum mit einem Bleistift markiert (s. Abbildung 1, gestrichelte Linie). Anschließend wird ein steriles Tuch mit 70% Ethanol benetzt und zur Reinigung des Eis verwendet. Folglich wird das Ei zusätzlich noch einmal abgeflammt. Mit Hilfe einer ebenfalls abgeflammt kommerziellen Leder- oder Sacknadel können nun zwei Löcher (s. Abbildung 1, x_1 & x_2) in das Ei gestochen werden. Das erste Loch (x_1) dient zum Druckausgleich und wird direkt oben mittig des Luftsackes gesetzt. Das zweite Loch (x_2) dient zur Inokulation und wird einen halben Zentimeter unterhalb der markierten Bleistiftlinie am Luftsackrand gesetzt. Pro Ei können nun 0,2 ml Inokulum mit einer 21 G- oder 23 G-Kanüle und einer 1 ml-Spritze über das zweite Loch in die Allantoishöhle injiziert werden (s. Abbildung 1). Die Schutzdecke der benutzten Kanülen werden dabei niemals wieder auf die Kanüle gesetzt („recapping“). Schutzkappe und Kanüle werden zwingend einzeln in einem entsprechenden Abfallbehälter entsorgt. Um die Punktierungen wieder zu verschließen werden Paraffin-Stäbchen über einem Bunsenbrenner erhitzt und das Paraffin vorsichtig über die Öffnungen gestrichen. Je nach Virusstamm/-isolat werden die Eier in einem Ei-Inkubator 48 Stunden (Influenza A) oder 72 Stunden (Influenza B) bei 33°C bis 35°C inkubiert.

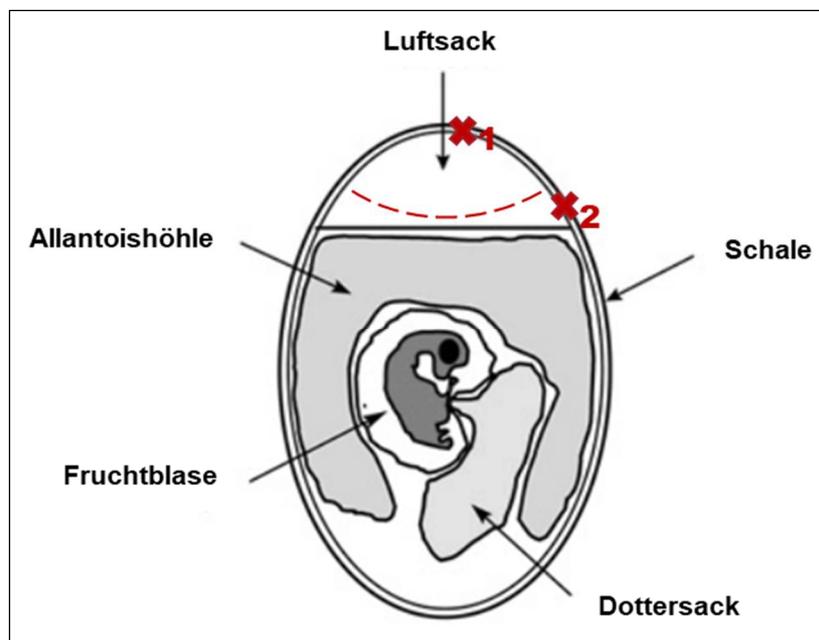


Abbildung 1: Verwendete Inokulationsroute bei der Infektion eines Hühnereis.
Modifiziert nach Short et al., 2011, Journal of Visualized Experiments.

Schematische Darstellung der Strukturen eines embryonierten Hühnereis mit Schale, Luftsack, Allantoishöhle, Fruchtblase und Dottersack. Die gestrichelte Linie zeigt die zu kennzeichnende Luftblase mittels Schierlampe sowie die roten Kreuze je ein Einstichloch zum Druckausgleich (x_1) sowie zur Inokulation (x_2).

Um das vermehrte Virus zu ernten, werden die Eier über Nacht (12-24 Stunden) bei 4°C bis 8°C gekühlt, was dazu führt, dass der Embryo verendet und die Blutgefäße verengt werden, um das Risiko einer Kontamination der infizierten Allantoisflüssigkeit mit Blut zu minimieren. Ferner besteht die Möglichkeit eines „*quick-chill*“-Verfahrens (Inkubation für 30 Minuten bei -20°C), dabei muss allerdings beachtet werden, dass es zu Verletzungen der Blutgefäße und so zu einem Bluteinfluss in die Allantoisflüssigkeit kommen kann. Dieser ist grundsätzlich zu minimieren, da die Erythrozyten das Virus absorbieren, was die Virusausbeute verringert. Die gekühlten Eier werden mit Ethanol gereinigt und die Schale entlang der gekennzeichneten Luftblase mit einer sterilen Schere entfernt. Anschließend wird die Allantoismembran mit einer sterilen Pinzette eröffnet. Bei Bedarf können der Embryo und der Dottersack unter Zuhilfenahme eines Spatels oder Löffels vorsichtig zur Seite geschoben werden. Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass der Dottersack nicht beschädigt wird. Sollte sich dennoch Allantoisflüssigkeit mit dem Dotter vermischen, ist die Flüssigkeit zu verwerfen. Mit einer sterilen Eppendorf-Pipette oder einer Einweg-Spritze (mit oder ohne Partikelfilter) kann die Allantoisflüssigkeit (5-10 ml/Ei) abgenommen und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen gesammelt und unbedingt auf Eis gestellt werden. Die gesammelte Virusausbeute wird anschließend bei 500 xg (~ 2100 rpm) und 4°C für mindestens 5 Minuten zentrifugiert, um etwaige Erythrozyten oder Gewebsteilchen zu pelletieren. Die entstandene klare Flüssigkeit wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Es kann unmittelbar ein Titrationstest angeschlossen werden (s. Kapitel 4.2 Titerbestimmung eines Influenza-Stocks) oder die Lösung wird zunächst aliquotiert (0,5-2 ml/2 ml-Eppi) und bei -70°C/-80°C (< 1 Jahr) gelagert. Für die Langzeitlagerung sind Temperaturen von -135°C bis -150°C notwendig.

Tabelle 5: Verwendete Lösungen zur Virusanzucht

Name	Agenzien	Menge
Egg-Diluent	KPBS (= PBS mit Kalium, 136 mM KCl & 10mM 10 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.3)	100 ml
	Penicillin G (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)	1 ml
	Gentamycin (50 mg/ml)	0,2 ml
	<i>0,2 µM filtriert für bis zu 2 Monate bei 4° bis 8°C haltbar</i>	
Tryptose-Phosphat-Bouillon	Tryptose-Phosphat-Bouillon	29,5 g
	Wasser (steril)	100 ml
	Gentamycin (50 mg/ml) → stets frisch hinzufügen!	2%
	<i>Autoklaviert bis zu 3 Monate bei 4° bis 8°C haltbar</i>	

4.1.2 Herstellung von Influenza-Stocks in MDCK-Zellen

Die MDCK-Zellen eignen sich für die Vermehrung von Influenza A- & B-Stämmen, sind aber, auf Grund von Inkompatibilität zwischen Zelloberflächenstrukturen und viralen Rezeptoren, nicht für Influenza C-Stämme geeignet (vgl. Balish et al. 2013, Current Protocols in Microbiology).

Für die Herstellung von Influenza-Stocks aus MDCK-Zellen, müssen die Ausgangsvirusstocks zunächst schonend in kaltem Wasser oder auf Eis aufgetaut und während der gesamten Zeit auf Eis gekühlt werden, um einen Verlust der Virusvitalität zu verhindern. Für anschließende Inokulation werden konfluente MDCK-Kulturen in 25 cm²-Zellkulturflaschen verwendet, was bedeutet, dass der gesamte Flaschenboden mit einem kompletten Zellrasen bedeckt ist. Sind die Zellen bereits überwachsen (\triangleq Areale mit überlappenden Zellen), werden diese nicht für eine Infektion genutzt werden, da diese weniger sensitiv auf die Viren reagieren. Mit Hilfe einer 10 ml-Pipette wird das Zellkulturmedium entfernt und der Zellrasen zweimal mit PBS (RT) gewaschen. Ein weiterer Waschschrift mit *Complete* Medium wird angeschlossen. Alle Waschschriffe dienen dazu, möglichst jegliche FBS-Rückstände zu entfernen, da diese einen negativen Einfluss auf den Viruseintritt haben. Es wird eine 1:5 bis 1:1000 Verdünnung des aufgetauten Virusstock in *Complete* Medium angesetzt und 200 μ l dieser Verdünnung vorsichtig auf den Zellrasen gegeben, um diesen nicht zu zerstören. Dabei wird die Zellkulturflasche rotierend gedreht, so dass der gesamte Zellrasen mit dem Inokulum bedeckt ist. Die inokulierten Zellkulturflaschen werden anschließend für 30 bis 60 Minuten in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) gestellt, um die Virusabsorption zu ermöglichen. Dabei ist zu beachten, dass eine Verlängerung dieser Inkubationszeit zum Austrocknen der Zellen und somit zu einer reduzierten Überlebensfähigkeit führen kann. Darauffolgend können 6 ml Infektionsmedium hinzugefügt und die Zellen weiter inkubiert werden – bei 33°C optimal für Influenza B-Stämme und bei 37°C optimal für Influenza A-Stämme. Der Zellrasen wird mit einem inversen Mikroskop täglich auf zytopathische Effekte (*cytopathic effects*, CPE) kontrolliert. Charakteristisch für CPE, die durch Influenza hervorgerufen werden, sind Abrundung und Ablösung der MDCK-Zellen. Der Kulturüberstand wird geerntet, wenn mindestens 75% des Zellrasens CPE zeigt. Dazu wird der Überstand in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen dekantiert und für 15 Minuten bei 300 xg (~ 1600 rpm) und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wird in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Zur verbesserten Stabilität des Virus kann ein Stabilisator (0,5% Glycerin, 0,5% Gelatine oder 7,5% BSA) hinzugefügt werden. Anschließend wird der Überstand in 2 ml-Kryoröhrchen aliquotiert und für bis zu einem Jahr bei -70/-80°C oder für die Langzeitkonservierung bei -135/-150°C gelagert.

4.2 Titerbestimmung eines Influenza-Stocks mittels TCID₅₀

Zur Titerbestimmung können eine Reihe verschiedener Methoden wie Haemagglutinierungsassays, *Virus Plaque*-Assays, *Focus Forming*-Assay oder Infektions-Dosis-Assays herangezogen werden (vgl. Balish et al. 2013, Current Protocols in Microbiology). Im Rahmen des DGUV-Projektes (Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung: „Entwicklung & Evaluierung eines Prüfstandards für die Wirksamkeit von Luftreinigern zur Reduktion der Virenfracht in der Luft“) werden die Titer über Infektions-Dosis-Versuche Zellkultur bestimmt.

Der *50% tissue culture infectious dose* (TCID₅₀)-Assay misst die Menge infektiöser Viren in einer Probe oder einem Stock durch die Bestimmung der höchsten Verdünnung, die noch 50% einer MDCK-Zellkultur infizieren kann. Dazu werden die MDCK-Zellen zunächst durch Trypsinierung geerntet (s. 3.2 Kultivierung der Zellen) und auf eine Zellzahl von $2\text{-}3 \times 10^5$ Zellen/ml in MDCK *Growth* Medium eingestellt. Von dieser Zellsuspension werden 100 μl in je ein Well einer sterilen 96-Well-Platte gegeben ($\approx 2\text{-}3 \times 10^4$ Zellen/Well) und die Platte zum Adhären (min. 30-45 Minuten bis maximal 24 Stunden) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gelagert. Pro Platte können zwei Stocks oder Proben in Vierfachbestimmung getestet werden (s. Abbildung 2).

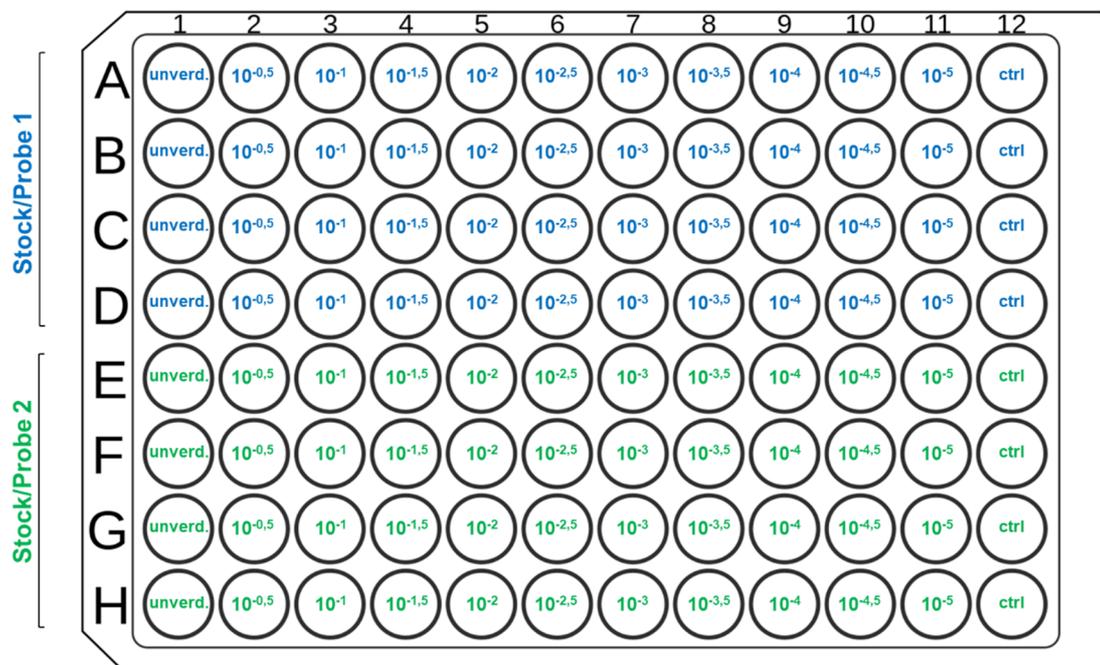


Abbildung 2: Verwendetes Pipettierschema für den TCID₅₀-Assay.

Halb-logarithmierte Verdünnungsreihe der unverdünnten Ausgangsprobe (unverd.) inklusive Negativkontrolle (ctrl) für zwei Stocks oder Proben (Stock/Probe 1 & 2) in Vierfachbestimmung.

In der Zwischenzeit wird der Virusstock bzw. die Virusprobe auf Eis aufgetaut und 1:100 in Infektionsmedium verdünnt. Folgend kann das MDCK *Growth* Medium mit einer Eppendorf-Pipette aus der Platte abgenommen werden, wobei darauf zu achten ist, den nun adhärenen Zellrasen nicht zu beschädigen. Anschließend werden die Zellen zweimal mit je 200 µl Infektionsmedium gewaschen, um FBS-Rückstände zu entfernen. Es werden dann je 100 µl Infektionsmedium in alle bis auf die ersten Wells der Platte gegeben (s. Abbildung 2). Folglich werden 146 µl des verdünnten Virusstocks (oder der verdünnten Virusprobe) in die ersten Wells gegeben und eine halb-logarithmierte ($\frac{1}{2} \log_{10}$) Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu werden je 46 µl von Well zu Well geben und die finalen 46 µl (aus Well 11, s. Abbildung 2) verworfen, da die letzte Reihe (12) als Negativkontrolle genutzt wird. Die Platte wird für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor das Inokulum abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 250 µl Infektionsmedium gewaschen werden. Es werden 200 µl 2% FBS-haltiges Infektions- oder MDCK *Growth* Medium hinzugefügt und die Platte für bis zu 72 Stunden weiter inkubiert. Während dieser Inkubationszeit werden die Zellen mit Hilfe eines inversen Mikroskops täglich auf CPE-Effekte und -Endpunkte hin kontrolliert. Hierbei werden die Wells bereits als CPE-positiv definiert, wenn auch nur ein kleiner Teil der Zellen bereits CPE-Effekte (Abrundung, Ablösung) aufweist. Der Endpunkt wird als letztes Well mit CPE-Effekten definiert. Nach maximal 72 Stunden werden die Platten fotografisch dokumentiert und der Titer wie folgend beschrieben nach Reed-Muench (vgl. Reed und Muench, 1938) berechnet.

Bei der Anwendung der Reed-Muench-Rechnung wird in drei Schritten vorgegangen. Zunächst werden dem Protokoll folgend die CPE/Well bestimmt (s. Abbildung 4).

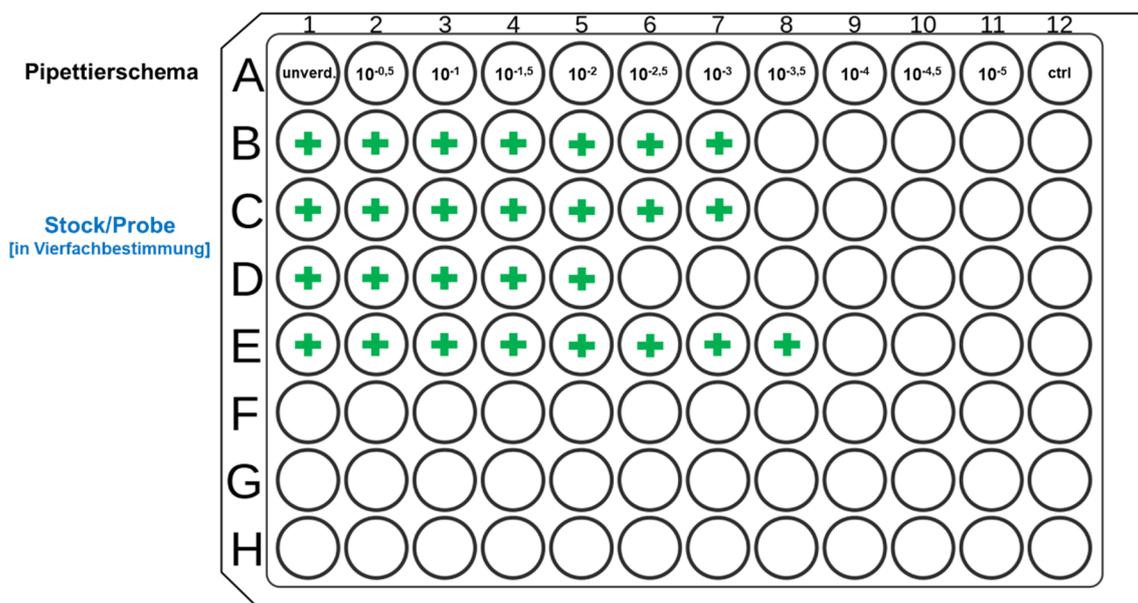


Abbildung 3: CPE-Bestimmung in einer 96 Well-Kulturplatte.

Entsprechend dem mikroskopischen Befundes werden die Wells als CPE-positiv oder -negativ bestimmt und mit einer Markierung (hier: +) gekennzeichnet.

Anschließend wird wie in Abbildung 4 gezeigt die TCID₅₀ kalkuliert.

Verdünnungsstufe	CPE auf Platte		Akkumulierte Zahlen		Total (A+B)	Prozent infiziert (%) (A/(A+B)*100)
	Anzahl infizierter Wells (CPE ⁺)	Anzahl nicht infizierter Wells (CPE ⁻)	Infiziert (CPE ⁺) (A)	Nicht infiziert (CPE ⁻) (B)		
unverd.						
10^{-0,5}	4	0	23	0	23	100 (23/23)
10⁻¹	4	0	19	0	19	100 (23/23)
10^{-1,5}	4	0	15	0	15	100 (23/23)
10⁻²	4	0	11	0	11	100 (23/23)
10^{-2,5}	3	1	7	1	8	88 (7/8)
10⁻³	3	1	4	2	6	67 (4/6)
10^{-3,5}	1	3	2	5	7	17 (2/7)
10⁻⁴	0	4	0	9	9	0 (0/9)
10^{-4,5}	0	4	0	13	13	0 (0/13)
10⁻⁵	0	4	0	17	17	0 (0/17)
ctrl						

Abbildung 4: TCID₅₀-Kalkulation nach Read & Muench.

Mit Hilfe einer Tabelle wird die Anzahl infizierter (CPE⁺) und nicht infizierter (CPE⁻) Wells bestimmt, die Zahlen akkumuliert (A & B) und auf dieser Grundlage der prozentuale Anteil der infizierten Wells bestimmt.

Und letztlich folgt die TCID₅₀-Berechnung auf Grundlage folgender Formel:

$$TCID_{50} = 10^{\log \text{ Gesamtverd\u00fcnnung \u00fcber 50\% - (I \times \log h)}}$$

dabei gilt:

I ≙ interpolierter Wert des 50%-Endpunktes; auch *proportionate distance* (PD) genannt bedeutet, bei den Verd\u00fcnnungen, die am n\u00e4chsten beieinanderliegen, d. h. \u00fcber 50% positiv und unter 50% positiv, wird der proportionale Abstand zwischen diesen beiden Verd\u00fcnnungen berechnet: $I = (\text{positiv \u00fcber 50\%} - 50\%) / (\text{positiv \u00fcber 50\%} - \text{\%positiv unter 50\%})$

h ≙ Verd\u00fcnnungsfaktor

Beispielrechnung:

1. Berechnung des interpolierten Wertes I

$$\begin{aligned} I &= (\text{positiv über } 50\% - 50\%) / (\text{positiv über } 50\% - \% \text{ positiv unter } 50\%) \\ &= (85,7 - 50) / (85,7 - 14,3) = \underline{\underline{0,5}} \end{aligned}$$

2. Bestimmung des Verdünnungsfaktor h

$$h = \text{Verdünnungsfaktor} = \underline{\underline{3,16}} \quad (\triangleq \text{halb-logarithmische Verdünnungsreihe})$$

3. Berechnung des $\text{LogID}_{50}/\text{ID}_{50}$

$$\begin{aligned} \text{LogID}_{50} &= \text{Gesamtverdünnung über } 50\% - (I \times \log(h)) \\ &= -3 - (0,34 \times \log(3,16)) = \underline{\underline{-3,17}} \rightarrow \text{ID}_{50} = \underline{\underline{10^{-3,17}}} \end{aligned}$$

Dies ist die Endpunktverdünnung (\triangleq die Verdünnung, die 50% der inokulierten Wells infiziert). Der Kehrwert dieser Zahl ist der Virustiter in Form von infektiösen Dosen pro Volumeneinheit und wird in $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ angegeben.

4. Berechnung des TCID_{50}

$$\begin{aligned} \text{TCID}_{50}/\text{ml} &= (1/\text{ID}_{50})/\text{Volumen des Inokulums in ml} \\ &= (1/10^{-3,17})/0,046 \text{ ml} = 32154,53 = \underline{\underline{3,2 \times 10^4}} \rightarrow \log(3,2 \times 10^4) = \underline{\underline{10^{4,5}}} \end{aligned}$$

Darüber hinaus gilt: Die TCID_{50} kann mit Hilfe der Poisson-Verteilung in plaquebildende Einheiten (PFU) umgerechnet werden. Dabei handelt es sich um eine Schätzung, die darauf basiert, dass bei der Grenzverdünnung, die 50% der angegriffenen Zellschichten infizieren würde, die Bildung einer einzigen Plaque in einer Zellmonolage zu erwarten ist (Umrechnung TCID_{50} in PFU).

4.3 Bestimmung der Viruslast von Impinger-Proben mittels TCID₅₀

Um einen Prüfstandard für die Wirksamkeit von Luftreinigern zur Reduktion der Virenfracht in der Luft zu etablieren, ein Projekt aus Mitteln des Forschungsfonds der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (DGUV), wird eine zu diesem Zweck konstruierte Messstrecke verwendet (s. Abbildung 5). Die Bioaerosolsammlung wird dabei nach dem Impingementverfahren ($\hat{=}$ Abscheidung von Partikeln in Flüssigkeiten) durch den Einsatz von All-Glass Impingern (AGI-30) erreicht. Die genaue Beschreibung der Messstrecke und ihrer Funktionsweise ist der entsprechenden SOP zu entnehmen.

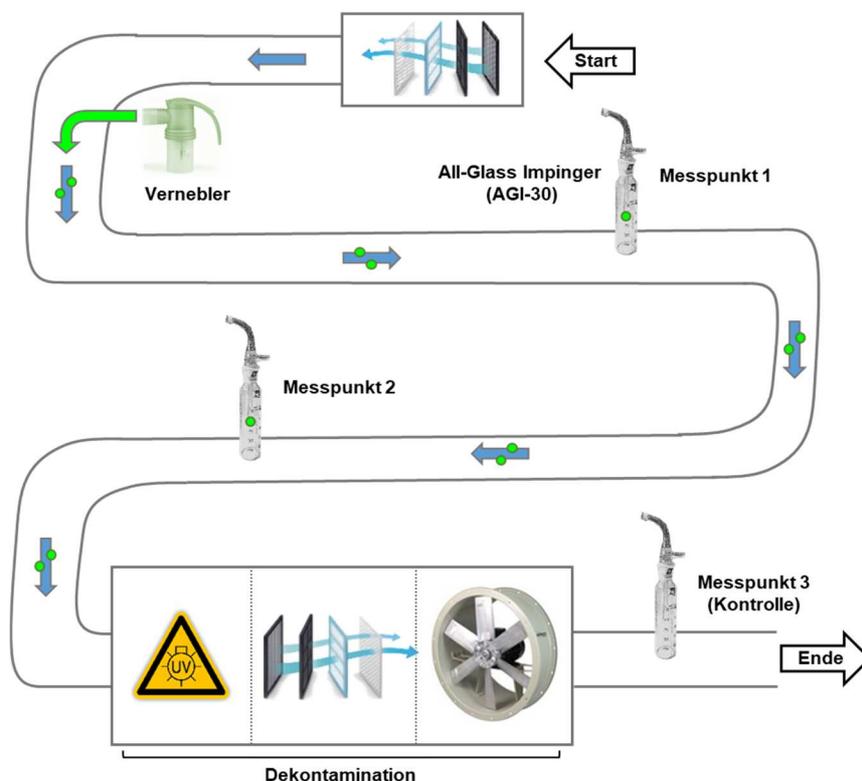


Abbildung 5: Schematische Abbildung der Messstrecke.

Die Bioaerosolsammlung innerhalb der Messstrecke erfolgt nach dem Impingementverfahren. Nach der Verneblung der Viren, werden diese an den Messpunkten 1 & 2 mit Hilfe von Impingern (All-Glass-Impinger, AGI-30) abgeschieden. Messpunkt 3 befindet sich am Ende der Messstrecke und dient als Kontrolle des Dekontaminationsabschnittes, der UV-Bestrahlung und HEPA-Filtration (H14) beinhaltet.

Um die Bioaerosolsammlung von Influenza-Viren innerhalb der Messstrecke zu untersuchen, werden die aus embryonierten Hühnereiern hergestellten Virusstocks (s.4.1.1 Herstellung von

Influenza-Stocks in embryonierten Hühnereiern) verwendet. Für die Verneblung (~ 9 ml mit einer Konzentration von ca. 10^9 Viren) sowie die Sammlung in den Impingern (30 ml) wird der Egg-Diluent (s. Tabelle 5) verwendet. Nach der Messung wird die Virussuspension aus den Impingern in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und auf Eis gestellt. Entsprechend der Titerbestimmung, können die Proben nun mittels TCID₅₀ (s. 4.2 Titerbestimmung eines Influenza-Stocks mittels TCID₅₀) auf ihre Infektiosität bzw. den Virustiter hin analysiert werden. Der Vergleich zwischen Start- und Endkonzentration gibt so Aufschluss darüber, wie viel infektiöses Virus durch das Impingementverfahren abgeschieden werden konnte.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien.....	1
Tabelle 2: Verwendete Virusstämme.....	1
Tabelle 3: Verwendete Medien und Medienzusätze	1
Tabelle 4: Verwendete Kulturmedien.....	3
Tabelle 5: Verwendete Lösungen zur Virusanzucht.....	7

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verwendete Inokulationsroute bei der Infektion eines Hühnereis.	6
Abbildung 2: Verwendetes Pipettierschema für den TCID ₅₀ -Assay.....	9
Abbildung 3: CPE-Bestimmung in einer 96 Well-Kulturplatte.....	10
Abbildung 4: TCID ₅₀ -Kalkulation nach Read & Muench.	11
Abbildung 5: Schematische Abbildung der Messstrecke.....	13