

KLINIKUM DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg



Institut für Virologie

HD. Dr. Stephan Becker

Institut für Virologie • Postfach 2360 • 35011 Marburg

Herr Dr. Völker
BioClimatic GmbH
Im Niedernfeld 4

31542 Bad Nenndorf

Hausanschrift: Robert-Koch-Str. 17, 35037 Marburg

Postanschrift: Postfach 2360, 35011 Marburg

Telefon: 06421-28-63061

Telefax: 06421-28-65482

E-mail: becker@staff.uni-marburg.de

WWW: [http://www.med.uni-marburg.de/
wwwmzh/viro.htm](http://www.med.uni-marburg.de/wwwmzh/viro.htm)

Datum: 01. November 2004

Gutachten

Zur Beurteilung der inhibierenden Wirkung eines Luftentkeimers der Fa. Bioclimatic auf die Infektiosität von SARS-Coronavirus

erstellt von

PD Dr. rer.nat. Stephan Becker

Klinikum der Philipps-Universität Marburg

Institut für Virologie

Robert-Koch-Str. 17

35037 Marburg

1. Untersuchungsgegenstand:

Untersucht wurde der Einfluss von ionisierter Luft und UV-Strahlen auf die Infektiosität des SARS-Coronavirus (SARS-CoV).

2. Testmethode

Zur Untersuchung des inhibitorischen Effekts des Luftentkeimers wurde ein Test durchgeführt, der die Infektiosität des SARS-Coronavirus in Zellkultur untersucht (TCID₅₀; Bonin 1973).

Geräte

Luftentkeimer der Fa. Bioclimatic ausgestattet mit speziellen Ionisationsröhren und UV-Sonderstrahlern

3. Experimentelle Ansätze

Das bioclimatic-Gerät (Ionisation + UV-Strahlung) wurde eingeschaltet. Zur Erreichung der Betriebstemperatur wurde das Gerät zunächst 1 Minute betrieben. Anschließend wurde die Zellkulturplatte unter der Sicherheitswerkbank dem Gerät ausgesetzt (Abstand Ionisationsröhren – Platte ca. 20 cm, Abstand UV-Strahler – Platte ca. 3 cm, höchste Leistungsstufe des Gerätes). Es wurden nach 0, 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, und 40 Minuten von der Zellkulturplatte aus jeweils 2 Vertiefungen je 500 µl Probe entnommen.



DAC-P-0121-00-00

Aus der Kontrollzellkulturplatte, die keiner UV-Strahlung und ionisierter Luft ausgesetzt war, wurde nach 0 und 40 Minuten eine Probe entnommen. Es wurden jeweils Doppelproben entnommen. Alle Proben wurden kühl gelagert.

55µl von allen Proben wurden anschließend in 96 well Zellkulturplatten überführt und in Vierfachbestimmung Verdünnungsreihen zur Basis 10 angelegt (10^0 bis 10^{-7}) Diese Verdünnungen wurden mit abtrypsinierten Vero-Zellen versetzt und für 4 Tage im Zellkulturinkubator bei 37°C in Gegenwart von 5% CO₂ inkubiert. Der Zustand der Zellen wurde täglich mit dem Mikroskop kontrolliert.

Das gesamte Experiment wurde in dem Hochsicherheitslabor des Instituts für Virologie, Marburg durchgeführt.

Ergebnisse:

Nach 4 Tagen wurde das Experiment beendet und abgelesen. Es ergab sich folgendes Bild: Die Infektiosität des SARS-CoV wurde durch die Behandlung mit Entkeimer drastisch reduziert. Innerhalb von 1 Minute lag der Titer unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 1 und 2). In den Proben, die nach 20 Minuten UVC Bestrahlung gewonnen wurden befand sich eine Substanz, die bei höchster Konzentration (10^0) toxisch auf die Zellkultur wirkte (Abb. 1). Dieser Effekt trat auch nach 30 und 40 Minuten auf. In der Kontrolle war dieser Effekt nicht zu bemerken (Abb. 1). Der toxische Effekt ließ sich gut von dem cytopathischen Effekt der Virusinfektion unterscheiden.

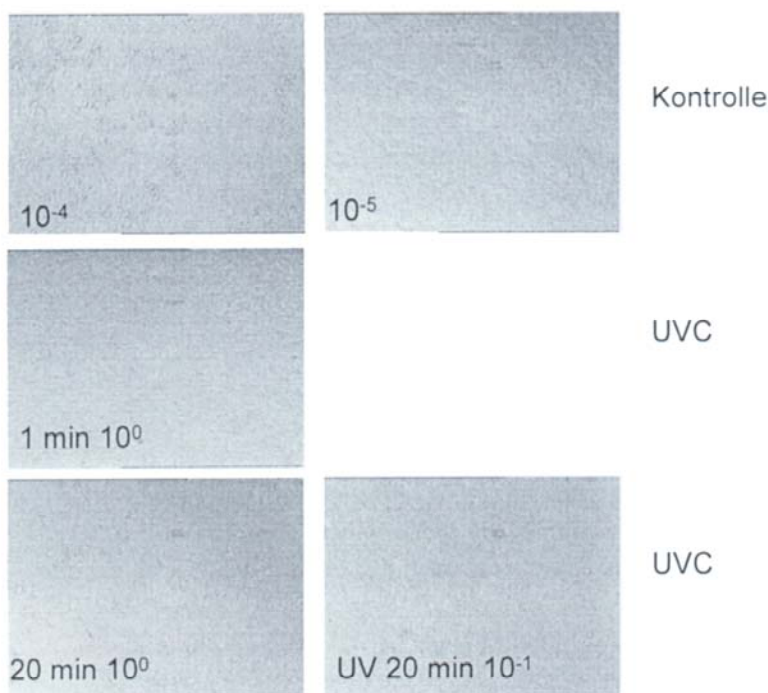


Abb. 1 Einfluss einer Kombination von ionisierter Luft und UV-Strahlen auf die Infektiosität von SARS-CoV. Eine Suspension von SARS-CoV wurde für 40 min der Behandlung ausgesetzt. Dargestellt sind Zellen, die mit Kontrollviren inkubiert wurden (Obere Reihe, keine Behandlung durch ionisierte Luft und UV) und Zellen, die mit einer Virussuspension behandelt wurden, die der Gerätekombination für 1 min ausgesetzt waren. Im Gegensatz zur Kontrolle, die erst bei einer Verdünnung von 10^{-3} keinen cytopathischen Effekt mehr verursacht, ist die behandelte Probe auch in der höchsten Konzentration (10^0) nicht mehr in der Lage, die Zellen zu infizieren. In den unteren Bildern (Behandlung über 20 min, Verdünnung 10^0 und 10^{-1}) ist der beobachtete toxische Effekt der Behandlung auf das Zellkulturmedium dargestellt. Nach 20 min Behandlung trat in Zellen, die mit der Virussuspension in höchster Konzentration behandelt wurden, ein toxischer Effekt auf, der zum Ablösen der Zellen und der kompletten Abrundung der verbliebenen Zellen führte. Bei einer Verdünnung von 10^{-1} war dieser Effekt nicht mehr zu detektieren.“

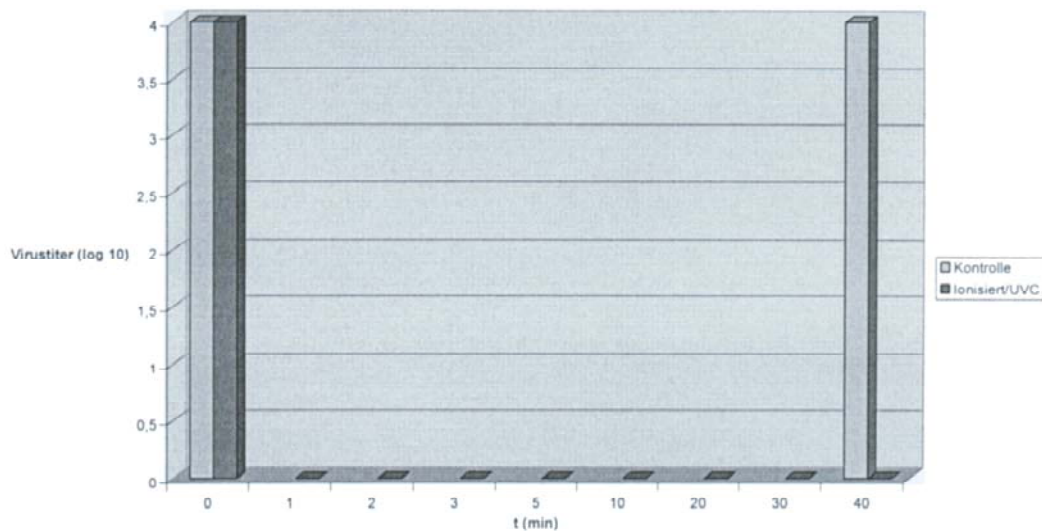


Abb. 2 Einfluss einer Kombination von ionisierter Luft und UV-Strahlen auf die Infektiosität von SARS-CoV. Eine Suspension von SARS-CoV wurde für 40 min der Behandlung ausgesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der erhaltenen Virustiter (n=8) "

Diskussion

Der Effekt des verwendeten Gerätes auf die Infektiosität war signifikant und schnell. Schon nach einer Minute waren keine infektiösen Viren mehr nachweisbar. Die Inaktivierung wurde durch die Anwesenheit von Serumproteinen nicht beeinträchtigt. In der Literatur wird angegeben, dass nach 1 h UV Behandlung die Infektiosität von SARS-CoV inaktiviert ist (Duan et al., 2003). Demgegenüber erscheint die von Bioclimatic eingesetzte Methode sehr effizient. Darüber hinaus muss festgestellt werden, dass die Volumina der virushaltigen Aerosoltröpfchen, gegen die das Gerät eingesetzt werden soll, sehr viel geringer sind, als in dem vorgestellten Experiment. Die UV-Strahlen können deshalb in den Aerosolen sehr viel effizienter ihr Ziel erreichen. Es kann vermutet werden, dass die Inaktivierung der Viren unter solchen Bedingungen noch schneller erfolgt.

4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Behandlung von SARS-CoV Suspensionen mit dem verwendeten Gerät der Fa. Bioclimatic reduzierte die Infektiosität innerhalb von einer Minute unter die Nachweisgrenze (Reduktion um mehr als 4 Log Stufen).

5. Literatur

Bonin, O., Quantitativ-virologische Methodik. Thieme, Stuttgart, 1973

Drosten, C., Gunther, S., Preiser, W., van der Werf, S., Brodt, H. R., Becker, S., Rabenau, H., Panning, M., Kolesnikova, L., Fouchier, R. A., Berger, A., Burguiere, A. M., Cinatl, J., Eickmann, M., Escriou, N., Grywna, K., Kramme, S., Manuguerra, J. C., Muller, S., Rickerts, V., Stürmer, M., Vieth, S., Klenk, H. D., Osterhaus, A. D., Schmitz, H., and Doerr, H. W. (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med* 348(20). 1967-76.

Duan SM, Zhao XS, Wen RF, Huang JJ, Pi GH, Zhang SX, Han J, Bi SL, Ruan L, Dong XP. (2003). Stability of SARS coronavirus in human specimens and environment and its sensitivity to heating and UV irradiation. *SARS Research Team. Biomed Environ Sci.* 2003 Sep;16(3):246-55.

Eickmann, M., S. Becker, H. D. Klenk, H. W. Doerr, K. Stadler, S. Censini, S. Guidotti, V. Massignani, M. Scarselli, M. Mora, C. Donati, J. H. Han, H. C. Song, S. Abrignani, A. Covacci, and R. Rappuoli. 2003. Phylogeny of the SARS coronavirus. *Science* 302:1504-5.

Kärber, G. (1931) 50% end-point calculation. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 162, 480-483.

Marburg, 05. November 2004

Stefan Bauer