



Aviäres Influenzavirus im Vogelkot und Feinstaub – Aerogene Übertragungsmöglichkeit ?





Aviäres Influenzavirus im Vogelkot und Feinstaub – Aerogene Übertragungsmöglichkeit ?



Impressum

Aviäres Influenzavirus im Vogelkot und Feinstaub – Aerogene Übertragungsmöglichkeit?
ISBN (Online-Version): 978-3-936385-36-6

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: (0821) 90 71 - 0
Fax: (0821) 90 71 - 55 56
E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de
Internet: www.lfu.bayern.de

Projekt-Koordination

LfU, Referat 21, Dr. Nadja Sedlmaier

Bearbeitung/Text/Konzept:

Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim
Dr. Klaus Hoppenheidt, bifa Umweltinstitut, Am Mittleren Moos 46, 86167 Augsburg
LfU, Referat 21, Dr. Nadja Sedlmaier

Redaktion:

Prof. Dr. Dr. Mathias Büttner, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim
Dr. Klaus Hoppenheidt, bifa Umweltinstitut, Am Mittleren Moos 46, 86167 Augsburg
LfU, Referat 21, Dr. Nadja Sedlmaier

Bildnachweis:

Bayerisches Landesamt für Umwelt
Dr. Klaus Hoppenheidt, bifa Umweltinstitut, Am Mittleren Moos 46, 86167 Augsburg:
Abb. 7, S. 26; Abb. 14, S. 37; Abb. 18, S. 43; Abb. 22, 23, S. 48; Abb. 28 (2-4), S. 53; Abb. 31, S. 57; Abb. 50, S. 75
Tab. 6, S. 37; Tab. 41, S. 98
PALAS GmbH, Greschbachstraße 3b, 76229 Karlsruhe:
Abb. 19, S. 45; Abb. 21, S. 47; Abb. 28(1), S. 53

Druck:

Eigendruck Bayerisches Landesamt für Umwelt
Gedruckt auf Papier aus 100 % Altpapier.

Stand:

Juni 2008

Diese Druckschrift wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Sofern in dieser Druckschrift auf Internetangebote Dritter hingewiesen wird, sind wir für deren Inhalte nicht verantwortlich.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	7
3	Problemstellung	7
4	Versuchsansatz	8
5	Projektrahmen	8
6	Versuche	9
6.1	Untersuchungen 1 und 2	10
6.2	Untersuchung 3	10
6.3	Untersuchungen 4 und 5	10
6.4	Molekularer Nachweis von Virusgenom	10
6.5	Ausbreitungsrechnung	11
7	Ergebnisse	11
7.1	Untersuchungen 1 und 2	12
7.2	Untersuchung 3	13
7.3	Untersuchungen 4 und 5	13
7.4	Quantitativer Nachweis von infektiösen Viruspartikeln	14
7.5	Eignung der RT-qPCR für „echte“ PM _{2,5} -Probenahmebedingungen	14
7.6	Ausbreitungsrechnung	14
8	Diskussion	16
9	Empfohlene Maßnahmen	17
10	Ausblick	18
11	Literatur	19
EXPERIMENTELLER TEIL: Aerosolerzeugung und Feinstaubabscheidung, Aufbau eines molekularen Nachweisverfahrens für aviäre Influenzaviren in Umweltproben		20
1	Zusammenfassung	21
2	Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens	23
2.1	Bedeutung von Influenza-Viren	23
2.2	Aspekte der Geflügelzucht	25

2.3	Umweltstabilität von (Influenza-)Viren	30
3	Projektrahmen	36
4	Projektbearbeitung und -ergebnisse	36
4.1	Auswahl von Hühnerkot und Influenzaviren	36
4.1.1	Probenahme und Aufbereitung von Hühnerkot	36
4.1.2	Herstellung von aviären Influenza-Virus-Suspensionen	38
4.2	Entwicklung, Aufbau und Betrieb einer Aerosolkammer	38
4.2.1	Vorbemerkung	38
4.2.2	Entwicklung und Aufbau der Aerosolkammer	41
4.2.2.1	Feinstaubprobenahme	42
4.2.2.2	Notwendige Virenanzahl im Hühnerkot	44
4.2.2.3	Aerosolgeneratoren	44
4.2.3	Realisierte Apparatur zur Erzeugung Virus-dotierter Feinstaubfilter	52
4.2.4	Einflussfaktoren auf die Aerosolerzeugung	57
4.2.4.1	Einfluss von Impaktoren auf das Partikelverteilungsmuster	59
4.2.4.2	Einfluss der Konzentration der Suspension auf das Partikelverteilungsmuster	61
4.2.4.3	Einfluss der suspendierten Probe auf die Partikelgrößenverteilung	66
4.2.4.4	Einfluss der Aufbereitung auf die Partikelgrößenverteilung	67
4.2.5	Fazit	69
4.3	Erzeugung und Lagerung von mit Viren dotierten Feinstaubfiltern	73
4.4	PCR-Analytik zum Nachweis von Influenza-Viren im Feinstaub	82
4.4.1	Überprüfung der RNA-Adsorption an Quarzfaserfiltern	82
4.4.2	Nachweis von Influenza-Virus-RNA	84
4.4.2.1	Nachweis von Influenza-Viren in Kotsuspensionen	86
4.4.2.2	Einfluss der Quarzfasern auf die Virusnachweisbarkeit	87
4.4.2.3	Überprüfung von Extraktionsverfahren zum Influenza-Nachweis in Feinstaubfiltern	88
4.4.2.4	Nachweis von Influenza-Viren in Allantoisflüssigkeit	90
4.4.2.5	Elution von Feinstaubfiltern und Virusextraktion	92
4.4.2.6	Untersuchung von Feinstaubfiltern aus LÜB-Messstationen auf Influenza-A-Virusgenome	98
4.4.2.7	Stabilität der viralen RNA während einer 24-h-Feinstaubprobenahme	101
4.4.3	Fazit	102

4.5	Prüfung der Stabilität der Virus-RNA in Staubproben	103
4.5.1	Ergebnisse der in Kunststofftüten gelagerten Virus-dotierten Feinstaubfilter	104
4.5.2	Ergebnisse der in Zentrifugenröhrchen gelagerten Virus-dotierten Feinstaubfilter	106
4.5.2.1	Feinstaubherstellung aus Virus-dotierter Hühnerkotsuspension	106
4.5.2.2	Feinstaubherstellung aus Virus-dotierter PBS-Lösung	114
4.5.3	Fazit	115
5	Literatur	117

1 Zusammenfassung

Mit einer neu entwickelten Apparatur wurde aus einem mit aviären Influenza-A-Viren (AIV) des apathogenen Subtyps H10N7 dotierten Hühnerkot modellhaft ein Feinstaub aerosol erzeugt, an dem die Virusstabilität bei unterschiedlichen Umweltbedingungen getestet wurde. 90 % der Aerosolpartikel hatten einen Durchmesser von $< 1,5 \mu\text{m}$ und repräsentierten daher die für die menschliche Gesundheit besonders relevante alveolengängige $\text{PM}_{2,5}$ -Feinstaubfraktion.

Die dotierten AIV waren bei den für Winter bzw. Sommer repräsentativen Temperaturen von 4 bzw. 20 °C bei geringen Luftfeuchtegehalten bis zu 4 Tage nachweislich infektiös (Brutei-Vermehrung, Hämagglutination, Nachweisgrenze: 10 infektiöse Viruspartikel). Als nicht mehr infektiös erwiesen sich die AIV bei diesen Temperaturen in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

In einer bei 4 °C nach 2 Tagen als infektiös getesteten Probe wurde über eine Titration ein Virusgehalt von 3.750 infektiösen Viruspartikeln/mg $\text{PM}_{2,5}$ -Feinstaub ermittelt. Mit dem Lagrangeschen Partikelmodell LASAT wurden für die aus früheren Untersuchungen bekannten PM_{10} - und $\text{PM}_{2,5}$ -Emissionen zweier Geflügelhaltungen unter sehr konservativen Annahmen die PM_{10} -Immissionskonzentrationen an der jeweils nächstgelegenen Wohnbebauung zu $140 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bzw. $95 \mu\text{g}/\text{m}^3$ berechnet. Über den ermittelten Virusgehalt von 3.750 Viren/mg $\text{PM}_{2,5}$ -Feinstaub wurden die maximalen Virus-Immissionskonzentrationen an der jeweils nächsten Wohnbebauung zu 530 bzw. 360 Viren/ m^3 abgeschätzt. Ein Erwachsener mit einem Atemvolumen von $20 \text{m}^3/\text{d}$ würde bei ganztägigem Aufenthalt, gleich bleibenden meteorologischen Verhältnissen und permanenter Vollexposition bei einer Immissionskonzentration von 530 Viren/ m^3 ca. 10^4 infektiöse aviäre Viruspartikel einatmen. Verglichen mit der in Zellkultur nachgewiesenen minimalen humaninfektiösen Dosis von 3 TCID₅₀ erscheint diese Viruslast relevant, auch wenn die Nachweisgrenze der Zellkultur geringer ist.

Für die Infektion eines Huhns in einem von der Emissionsquelle z. B. 550 m entfernten Stall lässt sich bei 24 stündiger Exposition eine tägliche Aufnahme von über 300 Viruspartikeln abschätzen. Somit scheint grundsätzlich ein Ansteckungsrisiko gegeben.

Für einen Ausbruch der Geflügelpest in einer Geflügelhaltung werden als emissions- und immissionsmindernde Maßnahmen die Eindüsung von Wasser in die betroffenen Stallabteile sowie die Abgasleitungen ggf. in Verbindung mit biologisch abbaubaren Desinfektionsmitteln empfohlen. Außerdem werden die Entnahme von Staubproben aus den Abgasleitungen befallener Stallabteile und die Analyse auf den Gehalt infektiöser AIV empfohlen.

Als begleitende Maßnahme werden PM_{10} - und $\text{PM}_{2,5}$ -Feinstaubmessungen an der nächstgelegenen Wohnbebauung bzw. in ca. 100 m Abstand im Lee der befallenen Anlage empfohlen. Des Weiteren wird bei Großbetrieben ein laufendes Monitoring durch Sammlung und regelmäßige Analyse von Stallstaub auf AIV-Vorkommen mittels Bergerhoffsammlern angeregt.

Das in dem F+E-Vorhaben angewandte Virusgenom-Nachweisverfahren könnte einen Beitrag zur Entwicklung eines standardisierten Nachweisverfahrens für Viren in Bioaerosolen leisten. Im Ausblick werden weitere Untersuchungen mit dem angewandten Nachweisverfahren unter den Bedingungen „echter“ PM_{10} - und $\text{PM}_{2,5}$ -Immissionsmessungen vorgeschlagen. Zusätzlich werden wegen möglicher humanpathogener Relevanz PM_{10} -Immissionsmessungen von aerogen übertragbaren Schweine-Influenza-A-Viren (SIV) angeregt.

2 Einleitung

Die aviäre Influenza (Vogelgrippe) trat in Deutschland erstmals im Februar 2006 bei Wildvögeln auf. Dabei kam es zu zahlreichen Geflügelpestfällen bei Wildvögeln in verschiedenen Ländern der Bundesrepublik, unter anderem auch in Bayern. Wegen eines möglichen Ausbruchs der aviären Influenza in Nutztierbeständen hat das Bayerische Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz (StMUGV) im März 2006 aus Vertretern des Bayerischen Landesamts für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) und des Bayerischen Landesamts für Umwelt (LfU) ein wissenschaftliches Beratergremium einberufen, das den Krisenstab „Vogelgrippe“ im StMUGV fachlich beriet. Dabei wurde festgestellt, dass erheblicher Forschungsbedarf insbesondere zu Fragen der Luftreinhaltung bestand. So war z. B. nicht bekannt, ob für Anwohner einer befallenen Geflügelhaltung oder für benachbarte Betriebe über den Luftpfad (Staub) ein signifikantes Ansteckungsrisiko besteht. Zudem gab es kein validiertes analytisches Verfahren für den Nachweis von Viren in Bioaerosolen. Im Oktober 2006 hat daher das StMUGV das LfU mit der Durchführung des vorliegenden F+E-Vorhabens „Aviäres Influenzavirus im Vogelkot und Feinstaub – Aerogene Übertragungsmöglichkeit?“ beauftragt.

3 Problemstellung

Die landwirtschaftliche Viehhaltung emittiert mit ca. 2.800 t/a PM_{10} -Feinstaub rund 12 % der gesamten PM_{10} -Feinstaubemissionen Bayerns (23.894 t/a, Emissionskataster Bayern 2004), die Geflügelhaltung allein ca. 450 t/a. Aviäre Influenza-A-Viren (AIV) des hoch pathogenen Subtyps H5N1 haben Partikelgrößen von ca. 100 nm und könnten damit in der inhalierbaren PM_{10} -Feinstaubfraktion einer befallenen Geflügelhaltung in enormer Anzahl vorhanden sein. Es kann daher grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, dass über die Feinstaubemissionen einer betroffenen Anlage H5N1-Viren in benachbarte Wohnungen und Betriebe gelangen.

Bislang ist noch nicht bewiesen, dass sich Menschen bei inhalativer Aufnahme eines virushaltigen Feinstaub-aerosols tatsächlich infizieren können. Nach aktuellem Kenntnisstand ist der Hauptinfektionsweg des Menschen mit H5N1-Viren nach wie vor der enge Kontakt zu Geflügel, das die Viren in großer Zahl über den Respirationstrakt und mit dem Kot ausscheidet. Nach dem Bundesinstitut für Risikobewertung (2006) kann es zu einer Infektion kommen, wenn mit Viren hoch angereicherter und getrockneter Vogelkot oder Sekrete eingeatmet werden. Verschiedene Literaturarbeiten weisen auf eine aerogene Übertragbarkeit hin (Tellier, 2006; EFSA, 2008). Bekannt ist jedenfalls, dass die Rezeptoren für H5N1-Viren im menschlichen Lungengewebe vorwiegend an der Oberfläche von Zellen der Bronchiolen und Alveolen in den tieferen Atemwegen lokalisiert sind (Van Riel, 2006). Insofern ist für die menschliche Gesundheit besonders die alveolengängige $PM_{2,5}$ -Feinstaubfraktion relevant. Allerdings ist die von AIV zur effizienten Zellinfektion benutzte Rezeptorkomposition bei den verschiedenen Wirtsspezies noch nicht endgültig geklärt (Nicholls, 2008).

Gezielte Untersuchungen zur Stabilität und Infektiosität von aviären Influenza-A-Viren im Feinstaub unter Umweltbedingungen lagen bisher nicht vor. Im Rahmen dieses Projekts sollten daher die aus einer mit AIV befallenen Geflügelhaltung zu erwartenden Feinstaubemissionen modellhaft dargestellt und die folgenden aus der Sicht der Luftreinhaltung wesentlichsten Fragen untersucht werden:

1. Sind AIV eines virushaltigen Kotstaub-Aerosols in der alveolengängigen $PM_{2,5}$ -Feinstaubfraktion enthalten und nachweisbar?
2. Sind AIV im Feinstaub über längere Zeit stabil und infektiös?
3. Sind AIV über die Feinstaubemissionen einer Geflügelhaltung in benachbarte Wohnungen und Betriebe in relevanten Konzentrationen eintragbar?

Der Staub aus Geflügelhaltungen setzt sich im Wesentlichen zusammen aus dem Abrieb von Kot, Einstreu und Federn. Daher sollte im Labor aus einem mit AIV dotierten Hühnerkot ein Feinstaubaerosol erzeugt werden, an dem die Virusstabilität unter Umweltbedingungen getestet werden konnte.

4 Versuchsansatz

Die Untersuchungen wurden ausgehend vom Kot einer Legehennen-Volierenhaltung in den folgenden Verfahrensschritten durchgeführt:

- Sterilisierter, gemahlener, gesiebter und virusfreier Hühnerkot mit einer maximalen Partikelgröße von 63 µm wurde in Wasser suspendiert und mit AIV des apathogenen Subtyps H10N7 versetzt (Konzentration wie bei maximaler Ausscheidung AIV befallener Wildvögel: 10^8 EID₅₀/g Kot)¹.
- Ein Teil dieser virushaltigen Suspension wurde mittels eines Aerosolgenerators versprüht und in eine neu entwickelte Aerosolkammer geleitet. Dabei wurden nur Aerosoltröpfchen mit einem Durchmesser von maximal 15 µm weitergeleitet. Größere Tröpfchen wurden in dem Zyklon des Aerosolgenerators abgeschieden, so dass bei den Untersuchungen keine zusätzlichen PM₁₀-/PM_{2,5}-Feinstaubabscheider zum Einsatz kamen.
- In der Aerosolkammer wurden die erzeugten Partikel getrocknet und auf Glasfaser-Filtern abgeschieden.
- Zur Simulation verschiedener Umweltbedingungen wurden die staubbeladenen Filter unterschiedlichen Temperaturen und Luftfeuchtegehalten über verschieden lange Zeiträume ausgesetzt und dann bei -70 °C zwischengelagert. Vergleichsfilter wurden direkt nach der Bestäubung eingefroren.
- Über eine Brutei-Beimpfung mit Filter-Eluaten wurde anschließend die Infektiosität der im abgeschiedenen Staub enthaltenen AIV bestimmt.
- Nach Erfassung der virusbedingten Embryonalsterblichkeit wurden intakte Viruspartikel über Hämagglutination (HA) nachgewiesen und die vorhandenen Virusgenomkopien mittels RT-qPCR² quantifiziert.
- An ausgewählten Filter-Eluaten, die als infektiös getestet waren, wurde zusätzlich die Anzahl der infektiösen Viruspartikel über eine Titration quantifiziert.
- Mit dem dabei ermittelten Virengehalt wurden beispielhaft für zwei Geflügelhaltungen die maximalen Viren-Immissionskonzentrationen an der nächsten Wohnbebauung berechnet.

5 Projektrahmen

Das Gesamtvorhaben wurde anteilig durch das LfU, das LGL und das bifa Umweltinstitut (bifa) bearbeitet.

Die Arbeiten zur Aerosolerzeugung und Feinstaubabscheidung sowie zum Aufbau eines molekularen Nachweisverfahrens für AIV in Umweltproben hat im Auftrag des LfU das bifa durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung dieser Arbeiten, insbesondere auch die zur Entwicklung der Aerosolkammer, erfolgt im experimentellen Teil des Berichts.

¹ EID₅₀ = Ei infektiöse Dosis 50%-Wert

² RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction)

Die fachliche Beratung zu virologischen Fragestellungen, zur Auswahl der Experimente und insbesondere die Untersuchungen zur Infektiosität von virushaltigen Feinstaubproben wurden dankenswerter Weise in Kooperation durch das LGL durchgeführt.

Die Ausbreitungsrechnungen erfolgten beispielhaft für die Feinstaubemissionen einer Legehennen-Käfighaltung und einer Mastgeflügel-Bodenhaltung durch das LfU.

Die Aufgabenverteilung zeigt Abb. 1.

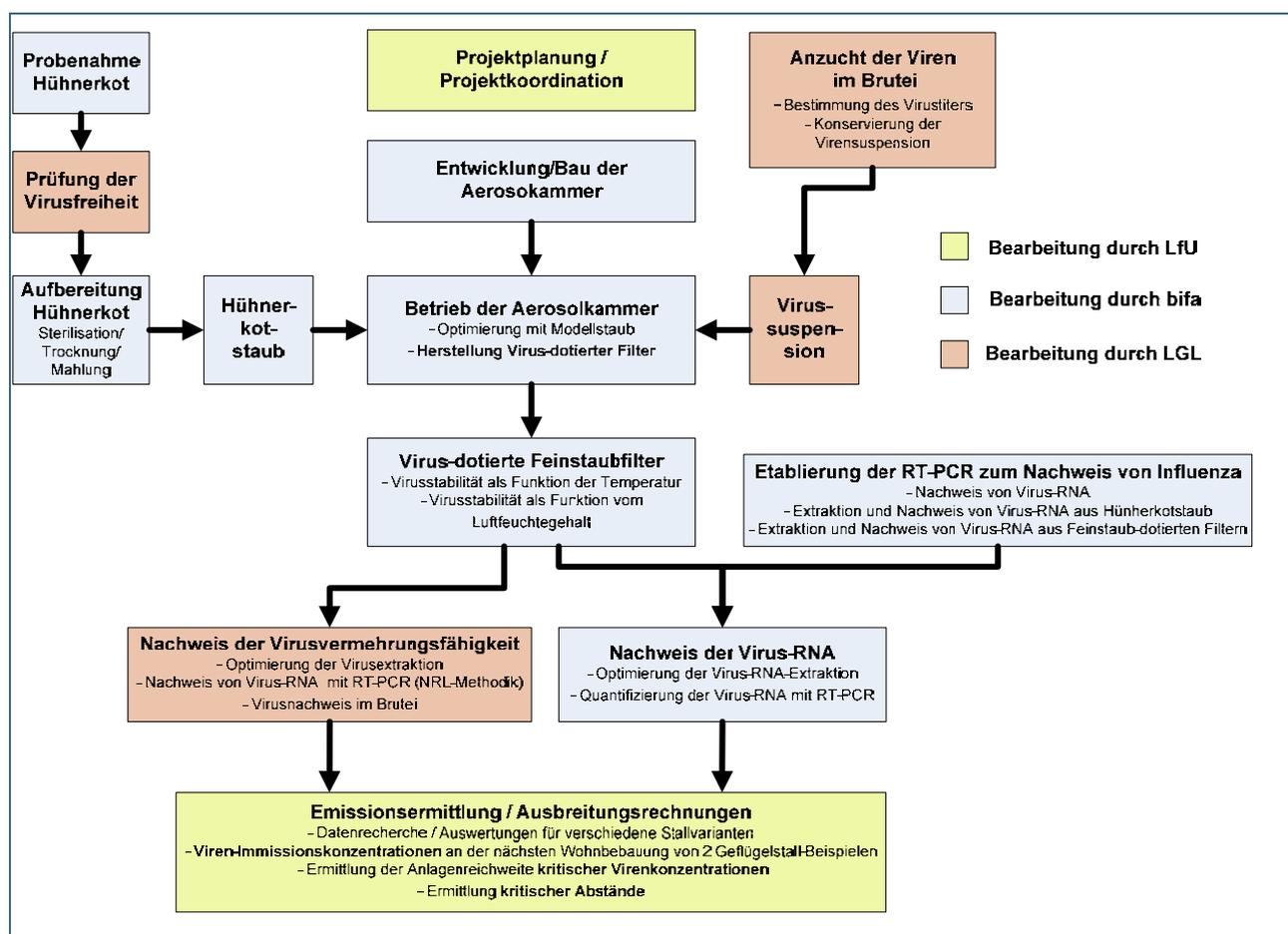


Abb. 1: Schema der Aufgabenverteilung

6 Versuche

Um den Einfluss verschiedener Versuchs- und Umweltbedingungen auf die Virusstabilität zu testen, wurden folgende Parameter variiert (Kotsuspension: 50 mg Kot/ml):

- pH-Wert der Suspension: 6 und 7
- Viruskonzentration: 5×10^6 und 10^7 infektiöse Viruspartikel/ml Suspension
- Staubmasse in mg: ca. 2, 3 und 5 je Filter
- „Umwelt“-Temperatur in °C: -20, 4, 20, 37 und 50

- „Umwelt“-Luftfeuchtegehalt: Aerosolkammer-bedingte Restfeuchte, wasserdampf-gesättigt und trocken über Silikagel
- Dauer der Umwelt-Bedingungen in h: 15, 48 und 96

6.1 Untersuchungen 1 und 2

Zunächst wurde untersucht, ob in der Feinstaubfraktion überhaupt infektiöse Viruspartikel nachweisbar waren und ob der pH-Wert der Kotsuspension einen Einfluss auf die Virusstabilität hatte. Hierzu wurden in zwei Untersuchungsreihen bei pH 6 und pH 7 ausgehend von der Viruskonzentration von 10^7 Viruspartikel/ml jeweils Filter mit ca. 5 mg Staubmasse erzeugt. Diese wurden zur Simulation von Umweltbedingungen mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte in verschlossenen Kunststoffütten bei Temperaturen von -20 °C , 4 °C , 20 °C und 37 °C bis zu 4 Tage gelagert.

6.2 Untersuchung 3

In den weiteren Untersuchungen wurde der physiologische pH-Wert von 7 zugrunde gelegt. Um möglichst realistische Verhältnisse abzubilden, wurden geringere Staubmassen von ca. 2 mg/Filter abgeschieden. Dies entspricht in etwa der Staubmasse, die an Einzeltagen mit Feinstaubwerten in der Außenluft von z. B. $40\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$ an den PM_{10} -Messgeräten des Lufthygienischen Landesüberwachungssystems Bayern (LÜB) abgeschieden wird. In den Untersuchungen wurde außerdem mit 5×10^6 Viruspartikel/ml eine Viruskonzentration eingestellt, die einer durchschnittlichen Virusausscheidung mit Kot AIV-erkrankter Wildvögel nahe kommt. Die bestaubten Filter wurden zur Umweltsimulation mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte in dicht verschlossenen Zentrifugenröhrchen bei Temperaturen von -20 °C , 4 °C , 20 °C , 37 °C und 50 °C bis zu 4 Tage gelagert. Zusätzlich wurden Filter bei 4 °C und 37 °C jeweils in wasserdampfgesättigter und in trockener Atmosphäre bis zu 4 Tage gelagert.

6.3 Untersuchungen 4 und 5

Zuletzt wurde gezielt der Einfluss der Luftfeuchte bei den für Winter und Sommer repräsentativen Temperaturen von 4 °C und 20 °C untersucht. In der Wiederholungsuntersuchung 5 b) wurden Proben, die mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte bei 4 °C und 20 °C bis zu 4 Tage gelagert und als infektiös getestet waren, zusätzlich einer Titration unterzogen.

6.4 Molekularer Nachweis von Virusgenom

Außerdem wurde geprüft, ob realer Feinstaub aus der Außenluft bzw. dessen wasserlöslichen Staubinhaltsstoffe den molekularen Nachweis von Virusgenomen stören. Dazu wurden Filtereluate ausgewählter Feinstaub-Tagesproben der LÜB-Messstationen Augsburg/LfU und Andechs vom Januar und Februar 2008 mit Virusisolat versetzt und mittels RT-qPCR analysiert. Zusätzlich wurde untersucht, ob das Virusgenom unter den einer Feinstaub-Tagesprobe vergleichbaren Probenahmebedingungen stabil ist. Hierzu wurde 24 h lang durch virushaltige staubbeladene Filter (Rückstellproben aus der Untersuchung 3: -70 °C , 0 h; -20 °C , 96 h) ein Raumluftvolumenstrom von $2,3\text{ m}^3/\text{h}$ gesaugt, der dem von LÜB-Feinstaub-Sammlern entspricht (Low volume sampler). Anschließend wurde das Filtereluat mittels RT-qPCR auf nachweisbares Virusgenom untersucht.

6.5 Ausbreitungsrechnung

Für die Ausbreitungsrechnung wurde auf die Ergebnisse der „Grundsatzuntersuchung über die Korngrößenverteilung im Abgas verschiedener Emittenten (< PM 2,5 und < PM 10)“ des TÜV Süddeutschland zurückgegriffen (TÜV, 2000). Mit den vom TÜV ermittelten Feinstaubemissionen wurden für diese Anlagen die PM₁₀-Immissionskonzentrationen an der nächsten Wohnbebauung berechnet. Die potentielle Virus-Immissionskonzentration an der nächsten Wohnbebauung wurde anschließend unter Zugrundelegung des Virusgehalts der in der Untersuchung 5 b) erzeugten Feinstaubprobe (infektiös nach 2 Tagen Lagerung bei 4 °C) abgeschätzt.

7 Ergebnisse

Mit der realisierten Apparatur gelang es, ausgehend von einer Kotsuspension der maximalen Partikelgröße von 63 µm, ein Feinstaub-Aerosol zu erzeugen. In der Regel hatten 90 % der auf den Filtern abgeschiedenen Partikel einen Durchmesser von < 1,5 µm (s. Abb. 2). Demzufolge wurde im gewählten Modellversuch die bei inhalativer Aufnahme besonders relevante, alveolengängige und damit potenziell humaninfektiöse PM_{2,5}-Feinstaubfraktion untersucht.

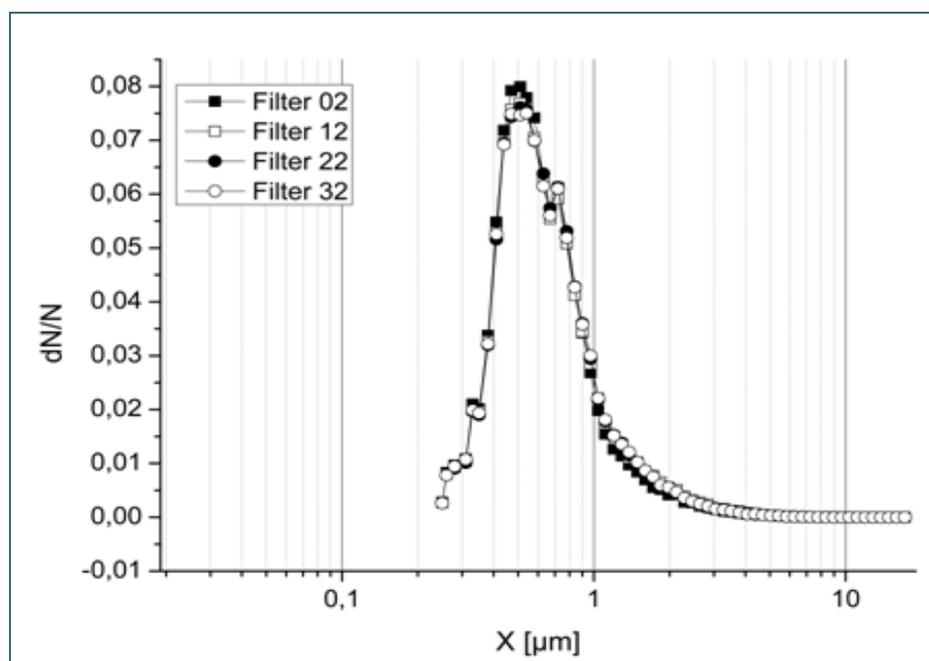


Abb. 2: Partikelanzahlverteilung für 4 Filter aus der Wiederholungsuntersuchung 5b, Lagerung bei 4 °C für 2 Tage mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte

Mit dem angewandten analytischen Nachweisverfahren (RT-qPCR, Brutei-Vermehrung, Hämagglutination) gelang es AIV des apathogenen Subtyps H10N7 in Feinstaubproben nachzuweisen. In der abgeschiedenen Staubmasse der PM_{2,5}-Feinstaubfraktion waren die Viruspartikel sogar bei 37 °C zum Teil noch über mehrere Tage lang stabil und infektiös.

Die nachfolgende Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Untersuchungsergebnisse zum Einfluss der Temperatur, Luftfeuchtegehalte und Zeit auf die Virusinfektiosität. Dargestellt sind die Staubmassen der untersuchten PM_{2,5}-Feinstaubfraktionen, die in der Brutei-Vermehrung infektiös (orange gefärbt), bzw. nicht infektiös (blau gefärbt) waren. Nicht in der Tabelle 1 dargestellt sind die Staubmassen der Vergleichsfilter, die sofort nach der Bestäubung bei -70 °C eingefroren wurden, und die der bei -20 °C gelagerten Proben, die jeweils alle infektiös waren. Ebenfalls nicht dargestellt sind die bei 50 °C gelagerten Proben, die alle nicht infektiös waren.

Tab. 1: Ergebnisübersicht zur Virusinfektiosität der Brutei-Untersuchungen 1 bis 5 unter Einfluss der Temperaturen 4, 20 und 37 °C und verschiedenen Luftfeuchtegehalten bei verschiedenen Lagerungszeiten

	Untersuchung Datum	1 09.10.07	2 12.11.07	3 21.01.08	4 03.03.08	5 08.04.08
	Aerosol- parameter	pH 7 10 ⁷ V/ml	pH 6 10 ⁷ V/ml	pH 7 5x10 ⁶ V/ml	pH 7 4x10 ⁶ V/ml	pH 7 5x10 ⁶ V/ml
Feuchte	Zeit in h / Temperatur	15 48 96	15 48 96	15 48 96	48 96	48 96
trocken über Silikagel	4 °C				3,0 3,0 1,4 1,3	2,4 2,8
	20 °C				1,7 1,6	2,3 2,3
	37 °C				2,7 2,6 1,9 1,4	
Aerosolkam- mer-bedingte Restfeuchte	4 °C	5,3 5,3 5,7	5,0 4,3 4,6	2,6 2,1 2,4	1,5 1,2	1,7 2,1
	20 °C	5,3 5,6 5,6	4,4 4,5 5,4	1,8 2,5 3,1	1,6 1,5	2,7 3,1
	37 °C	4,0 4,6 4,6	5,9 5,6 5,9	3,3 2,4 2,6	2,1 1,7	
wasserdampf- gesättigt	4 °C				2,9 2,7 1,6 1,3	2,3 2,3
	20 °C				1,9 1,8	2,7 3,0
	37 °C				2,7 2,9 1,6 1,3	
	Wiederholung Datum	1 a) 30.11.07	2 a) 07.01.08	3 b) 29.01.08		5 b) 30.05.08
	Aerosol- parameter	pH 7 10 ⁷ V/ml	pH 6 10 ⁷ V/ml	pH 7 5x10 ⁶ V/ml		pH 7 5x10 ⁶ V/ml
Feuchte	Zeit in h / Temperatur	15 48 96	15 48 96	15 48 96		48 96
trocken über Silikagel	4 °C					
	20 °C					
	37 °C					
Aerosolkam- mer-bedingte Restfeuchte	4 °C	4,8 5,4	4,5 5,0 4,5	1,5 1,9 1,6		2,0 2,1
	20 °C	5,7 5,4 5,8	4,3 4,8 4,9	2,0 1,3 1,8		2,1 2,0
	37 °C	3,5 3,8 4,7	5,4 6,2 5,9	1,4 2,3 1,9		
wasserdampf- gesättigt	4 °C					
	20 °C					
	37 °C					

V/ml (Viruspartikel je ml Kotsuspension); Die Zahlenwerte in den Feldern geben die auf dem untersuchten Filter abgeschiedene PM_{2,5}-Staubmasse in mg wieder. Orange markierte Felder bedeuten, dass in der Brutei-Vermehrung infektiöse Viruspartikel in der PM_{2,5}-Staubmasse nachgewiesen wurden (Nachweisgrenze: 10 infektiöse Viruspartikel). Die blau markierten Felder kennzeichnen die PM_{2,5}-Staubmassen, bei denen im Brutei-Versuch keine infektiösen Viruspartikel nachweisbar waren. Felder ohne Eintragung bedeuten "nicht untersucht"; 1 a) bzw. 2 a): Wiederholung der Brutei-Versuche an Rückstellproben der Untersuchungen 1 und 2; 3 b) bzw. 5 b): Wiederholung der Untersuchung 3 und 5 mit neuer Kotsuspension.

7.1 Untersuchungen 1 und 2

In den Untersuchungen 1 und 2 wurden Proben erzeugt, die hohe Staubauflagen mit hohen Viruskonzentrationen hatten. Die bestaubten Filter wurden mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte gelagert. Die Staubmassen enthielten soviel vermehrungsfähige Viruspartikel, dass die meisten Embryonen bereits nach 2 Tagen starben (Nachweisgrenze der Brutei-Vermehrung: 10 infektiöse Virusparti-

kel). Dass im Brutei tatsächlich eine Virusvermehrung stattgefunden hatte, wurde mit dem Hämagglutinationstest in der embryonalen Allantoisflüssigkeit¹ nachgewiesen. Sogar die Proben, die 4 Tage lang bei 37 °C gelagert waren, zeigten noch eine hohe Infektiosität. Nur die bei 4 °C und Restfeuchte gelagerten Proben waren bereits nach 2 Tagen nicht mehr infektiös. Im Wiederholungsversuch 1a) bzw. 2a) nach 2 Monaten an Rückstellproben der Untersuchungen 1 und 2 waren die bei 4 °C und Restfeuchte gelagerten Proben dann schon nach 15 Stunden nicht mehr infektiös. Diese Proben waren in Kunststofftüten verpackt. Offenbar konnte Feuchtigkeit der Kühltruhe in die Tüten eindringen, die dann in den 2 Tage lang bei 4 °C gelagerten Filtern eine zusätzliche Virusinaktivierung bewirkte. Für die späteren Versuche wurden daher als Verpackung dicht verschließbare Zentrifugenröhrchen verwendet.

Der pH-Wert hatte bei diesen Untersuchungen keinen erkennbaren Einfluss auf die Virusstabilität.

7.2 Untersuchung 3

In der anschließenden Untersuchung 3 bei pH 7 mit niedrigerer Staubauflage und Viruskonzentrationen, vergleichbar denen in den Ausscheidungen AIV-erkrankter Wildvögel, zeigte sich hinsichtlich der Infektiosität ein anderes Bild: Die der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte bei 37 °C ausgesetzten Proben waren bereits nach 15 Stunden nicht mehr infektiös. Dagegen waren die bei 4 °C gelagerten Proben auch noch nach 4 Tagen infektiös. Dies bestätigte sich im Wesentlichen auch im Wiederholungsversuch 3b). Hier war die bei 37 °C gelagerte Probe nicht einmal mehr nach 15 Stunden infektiös.

In trockener Atmosphäre waren die bei 4 °C gelagerten Proben ebenfalls 4 Tage lang infektiös, die bei 37 °C gelagerten Proben aber keine 2 Tage.

In wasserdampfgesättigter Atmosphäre waren sowohl die bei 4 °C, als auch die bei 37 °C gelagerten Proben nicht mehr infektiös.

Eine gewisse protektive Eigenschaft hatte bei höheren Temperaturen offenbar die das Virus umgebende Staubmasse. So enthielten die Feinstaubfilter mit höherer Staubbelastung bei 37 °C Lagerung über längere Zeit infektiöse Viren, als die Proben mit geringerer Staubauflage.

Im Gegensatz zu den nachfolgenden Untersuchungen 4, 5 und 5 b) waren die bei 20 °C gelagerten Proben bis zu 4 Tage infektiös. Dies ist vermutlich auf den geringeren Luftfeuchtegehalt der Laborluft während der Filterbestäubung dieser im Januar durchgeführten Untersuchung 3 zurückzuführen.

7.3 Untersuchungen 4 und 5

In den Untersuchungen 4 und 5 zeigte sich deutlich der Einfluss der Luftfeuchtigkeit auf die Virusstabilität: In trockener Atmosphäre waren sowohl die bei 4 °C als auch die bei 20 °C gelagerten Proben bis zu 4 Tage infektiös. In wasserdampfgesättigter Atmosphäre erfolgte in allen untersuchten Proben eine rasche Virus-Inaktivierung. Die Wiederholungsuntersuchung 5 b), bei der die Proben mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte bei 4 °C und 20 °C bis zu 4 Tage gelagert waren, bestätigten die Ergebnisse der Untersuchungen 4 und 5, wonach nur die bei 4 °C gelagerten Proben infektiös blieben. Die bei 20 °C mit Restfeuchte gelagerten Proben waren in allen drei Untersuchungen 4, 5 und 5 b) bereits nach 2 Tagen nicht mehr infektiös.

¹ Embryonaler Harn

7.4 Quantitativer Nachweis von infektiösen Viruspartikeln

Die Titrationsen der in der Untersuchung 5 b) bei 4 °C als infektiös getesteten Proben und die des Vergleichsfilters, der sofort nach der Bestäubung bei -70 °C eingefroren wurde, ergaben die nachfolgenden Gehalte an infektiösen Viruspartikeln/mg Feinstaub. Dazu wurden mit den Verdünnungsstufen 1 : 50 bzw. 1 : 10, die im Bruteiversuch noch als infektiös getestet waren (Nachweisgrenze: 10 infektiöse Viruspartikel) und mit den im Test eingesetzten Filtereluat-Volumina die Virusgehalte im unverdünnten Filtereluat hochgerechnet und auf die Staubmasse des jeweils beprobten Filters bezogen.

	infektiöse Viruspartikel/mg Feinstaub
• Vergleichsfilter bei -70 °C (1 : 50):	3.950
• Probe bei 4 °C nach 48 h (1 : 50):	3.750
• Probe bei 4 °C nach 96 h (1 : 10):	710

Demzufolge hatten die Lagerungsbedingungen bei 4 °C unter Restfeuchtepräsenz eine virusinaktivierende Wirkung. Bezogen auf den Virusgehalt des Vergleichsfilters bei -70 °C nahm die Anzahl der vermehrungsfähigen Viruspartikel innerhalb von 4 Tagen bei 4 °C um mehr als 80 % ab. Im Vergleich dazu hatte die Titration einer über 2 Tage lang bei 37 °C gelagerten und als infektiös getesteten Probe aus der Untersuchung 2 noch einen Gehalt an 2.680 vermehrungsfähigen Viruspartikeln/mg Feinstaub ergeben. Bei dieser Untersuchung hatte die Kotsuspension noch die höhere Viruskonzentration von 10^7 Viruspartikel/ml und die abgeschiedene Staubmasse war mit 5,6 mg/Filter fast dreimal so hoch wie bei der Untersuchung 5 b).

7.5 Eignung der RT-qPCR für „echte“ PM_{2,5}-Probenahmebedingungen

Wie die Untersuchungen an realen Feinstaubproben der LÜB-Messtationen Augsburg/LfU und Andechs gezeigt haben, wird die der angewandten RT-qPCR –Methode zugrundeliegende, enzymatische Reaktion durch lösliche Staubinhaltsstoffe offenbar nicht gestört. Auch unter den Bedingungen, die einer „echten“ Feinstaub-Tagesmittel-Probenahme von 24 Stunden vergleichbar waren, war das Virusgenom stabil genug für dessen Nachweis mittels RT-qPCR.

7.6 Ausbreitungsrechnung

Mit dem Virusgehalt von ca. 3.750 vermehrungsfähigen Viruspartikeln/mg Feinstaub wurden beispielhaft für zwei Geflügelhaltungen Viren-Immissionskonzentrationen abgeschätzt. Dazu wurde eine Ausbreitungsrechnung mit dem Lagrangeschen Partikelmodell LASAT durchgeführt. Durch die Annahme einer sehr stabilen Schichtung in Verbindung mit einer geringen Windgeschwindigkeit (1 m/s) wurde von einer ungünstigen Ausbreitungssituation, d. h. einer maximalen Belastung an der Wohnbebauung, ausgegangen. Die Rechnungen erfolgten für einen Stall mit ca. 120.000 Masthähnchen in Bodenhaltung und einen Stall mit ca. 40.000 Legehennen in Käfighaltung. Die Staubfrachten bei voller Belegung lagen beim Masthähnchenstall bei ca. 1,3 kg/h, bei der Legehennenhaltung bei knapp 0,45 kg/h. Die Untersuchungen der Korngrößenverteilung durch den TÜV im Jahr 2000 zeigten, dass die Staubemissionen des Masthähnchenstalls zu 59 % als PM₁₀ und zu 9 % als PM_{2,5} emittiert wurden. Bei der Legehennenhaltung war der Feinstaubanteil mit 33 % PM₁₀ und 3 % PM_{2,5} deutlich geringer. Da sich die nächsten Wohngebäude jeweils in Verlängerung der Längsachse des Stalls befinden, wurde bei den Berechnungen von einer Windrichtung in Richtung der Längsachse ausgegangen. Etwaige Schädigungen der Viren während der Verfrachtung über den Luftpfad wurden nicht berücksichtigt.

Die Ergebnisse der Berechnungen sind in den folgenden Abbildungen Abb. 3 und Abb. 4 dargestellt. Danach treten im Fall des Masthähnchenstalls im unmittelbaren Nahbereich des Stallgebäudes PM_{10} -Immissionskonzentrationen von $850 \mu\text{g}/\text{m}^3$ auf. An der in ca. 350 m Entfernung nächstgelegenen Wohnbebauung wurden PM_{10} -Konzentrationen von $140 \mu\text{g}/\text{m}^3$ berechnet. Wie die Untersuchung 5 b) gezeigt hat, beträgt der Virengehalt bei einer $\text{PM}_{2,5}$ -Konzentration von $1 \text{ mg}/\text{m}^3$ ca. 3.750 infektiöse Viren/ m^3 . Unter der Annahme, dass dieses Verhältnis auch für die PM_{10} -Fraktion angesetzt werden kann, ergeben sich aus den Berechnungen im Bereich der nächstgelegenen Wohnbebauung Virengehalte von ca. 530 Viren/ m^3 .

Auf Grund der geringeren Emissionen wurden bei dem Legehennenstall geringere Konzentrationen berechnet. Hier liegt die PM_{10} -Belastung im Nahbereich des Stalls bei $370 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Im Bereich der ca. 150 m ost-südöstlich gelegenen Wohnbebauung wurde eine PM_{10} -Konzentration von $95 \mu\text{g}/\text{m}^3$ berechnet, die einem Virengehalt von ca. 360 Viren/ m^3 entspricht.

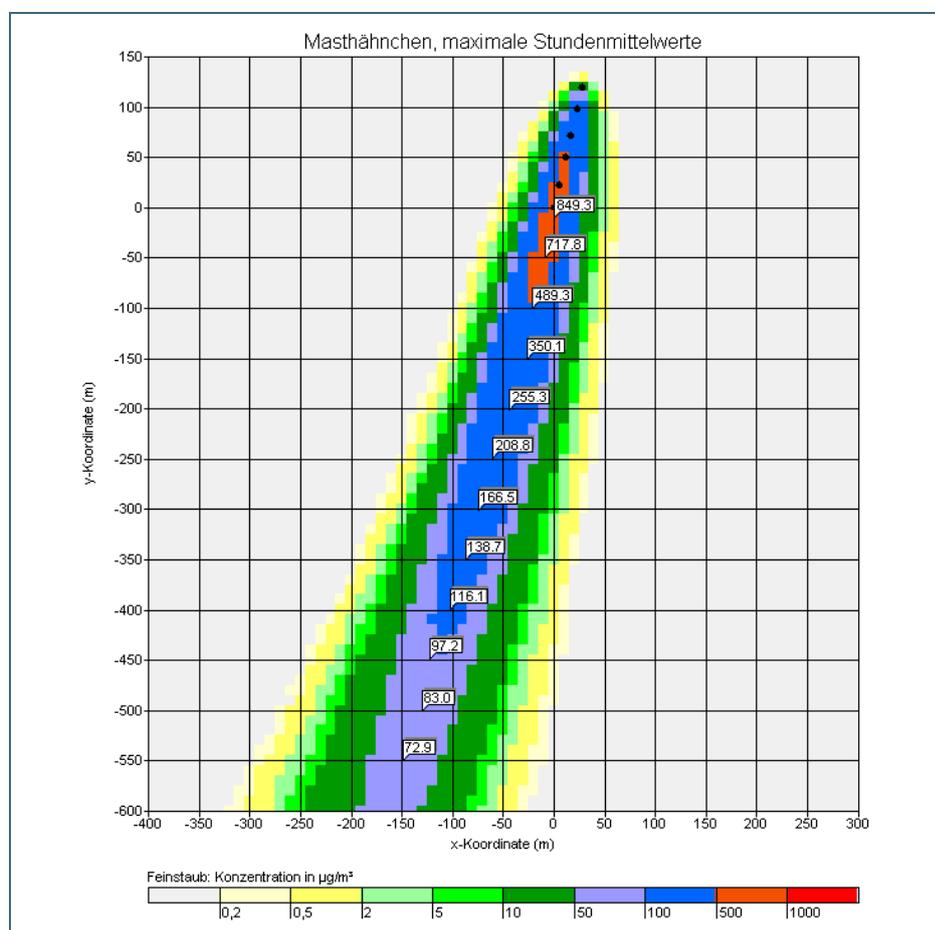


Abb. 3: Entfernungsabhängige PM_{10} -Immissionskonzentration in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ eines Masthähnchenstalls mit 120.000 Tierplätzen (Bodenhaltung); Emissionsquellen: schwarze Punkte am oberen Bildrand; Staubfracht bei voller Belegung ca. $1,3 \text{ kg}/\text{h}$, davon 59 % als PM_{10} und 9 % als $\text{PM}_{2,5}$

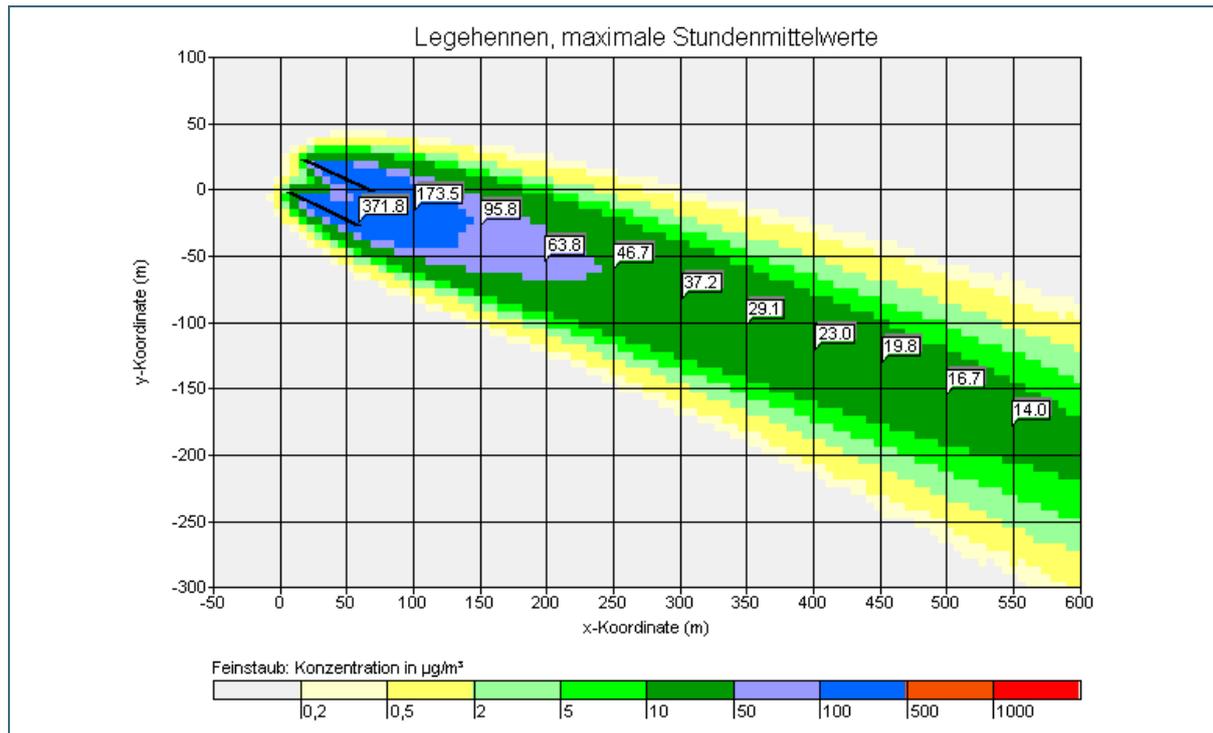


Abb. 4: Entfernungsabhängige PM_{10} -Immissionskonzentration in $\mu\text{g}/\text{m}^3$ eines Legehennenstalls mit 40.000 Tierplätzen (Käfighaltung); Emissionsquellen: schwarze Linien am linken oberen Bildrand; Staubfracht bei voller Belegung ca. 0,45 kg/h, davon 33 % als PM_{10} und 3 % als $\text{PM}_{2,5}$

8 Diskussion

Wie die Untersuchungen gezeigt haben, können im modellhaft erzeugten Kotstaub aus einer Legehennen-Volierenhaltung AIV des apathogenen Subtyps H10N7 bei Temperaturen von 4 °C und 20 °C bei niedriger Luftfeuchte mehrere Tage lang stabil bleiben. Da im abgeschiedenen Filterstaub der für die menschliche Gesundheit besonders relevanten, alveolengängigen $\text{PM}_{2,5}$ -Feinstaubfraktion im Modellversuch die AIV nachweislich 4 Tage infektiös waren (Brutei-Vermehrung), ist nicht auszuschließen, dass über die Feinstaubemissionen einer von Geflügelpest befallenen Hühnerhaltung infektiöse Influenza-A-Viren in nahe gelegene Wohnungen und Betriebe eingetragen werden.

Bei dem in der Untersuchung 5 b) ermittelten Virengehalt von 3.750 infektiösen Viruspartikeln/mg $\text{PM}_{2,5}$ -Feinstaub wurde für die nächste Wohnbebauung in 350 m Entfernung zur Masthähnchenanlage eine Virus-Immissionskonzentration von ca. 530 Viruspartikeln/ m^3 berechnet. Ein Erwachsener mit einem Atemvolumen von 20 m^3/d würde damit unter der extrem konservativen Annahme von gleichbleibenden, ungünstigen meteorologischen Verhältnissen an einem Tag bei permanenter Vollexposition ca. 10^4 infektiöse aviäre Viruspartikel einatmen. Es liegen keine Angaben zur minimalen humaninfektiösen Dosis vor, die mit der sensitiven Brutei-Vermehrung ermittelt wurde. Nach Tellier (2006) wurde beim Menschen im Zellkulturtest, der weniger sensitiv ist als die Brutei-Vermehrung, die minimale humaninfektiöse Dosis für humanpathogene AIV-Subtypen zu 0,6 – 3,0 TCID_{50}^1 ermittelt. Obwohl beide Verfahren hinsichtlich der Nachweisgenauigkeit nicht miteinander vergleichbar sind, erscheint die hier für AIV beispielhaft berechnete inhalative Viruslast zumindest bedeutend.

¹ TCID_{50} (50 % tissue culture infective dose), in Resusaffen-Nierenzellen

Für das Huhn wurde die aerosolbedingt übertragbare Infektiosität auf 2 TCPD₅₀¹ (Safatov, 2007) geschätzt. Mit einem Atemvolumen von ca. 1,2 m³/d würde ein Huhn z. B. in einem ca. 550 m entfernten gelegenen Nachbarbetrieb bei der dann noch vorhandenen Immissionskonzentration von ca. 270 Viruspartikeln/m³ ca. 320 Viruspartikel am Tag inhalieren. Ein Ansteckungsrisiko scheint daher grundsätzlich gegeben.

Auch wenn zu erwarten ist, dass die Stabilität der Viren im Feinstaub aerosol aufgrund der Verdünnung mit der Außenluft wesentlich geringer ist als im abgeschiedenen Modell-Feinstaub, kann nicht vorhergesagt werden, ob und wie viele der emittierten infektiösen Viruspartikel auch noch immissionsseitig infektiös sind. Hierzu wären gezielte Messungen im Umfeld einer Virus-emittierenden Anlage erforderlich, die aber im Rahmen dieses Projekts nicht realisierbar waren.

9 Empfohlene Maßnahmen

Aus Vorsorgegründen sollten bei einem Ausbruch der Geflügelpest in einer Geflügelhaltung die Staubemissionen der Anlage soweit wie möglich minimiert werden. Wie aus den Untersuchungen hervorgeht, haben hohe Temperaturen und hohe Luftfeuchtigkeiten eine Virus-destabilisierende Wirkung. Daraus ergeben sich für den Bedarfsfall folgende Emissions-/Immissionsminderungsmöglichkeiten:

- Eindüsen von Wasser in den Stallinnenraum der befallenen Anlage
- Eindüsen von Wasser in das Abgas der befallenen Anlage

Durch diese Maßnahmen könnte erreicht werden, dass die virushaltigen Feinstaubpartikel zu größeren Partikeln aggregieren, die dann im Stallgebäude bzw. im Nahbereich der Anlage deponieren. Eine weite Verfrachtung von PM₁₀- und PM_{2,5}-Feinstaub sollte dann nicht mehr in dem berechneten Umfang möglich sein. Zudem dürfte die hohe Luftfeuchtigkeit - wie unter Versuchsbedingungen festgestellt - eine rasche Inaktivierung der Viren bewirken. Durch den Zusatz von biologisch abbaubaren Desinfektionsmitteln im Sprühwasser könnte diese Wirkung sehr effizient werden. Es gilt natürlich zu bedenken, dass bei den zu Grunde gelegten Tierzahlen der beiden Haltungsformen nicht gleichzeitig alle Tiere schlagartig schwer erkranken und maximale Mengen an Virus ausscheiden. Wie in § 4 der Geflügelpest-Verordnung vom 18.10.2007 vorgeschrieben, müssen auffällige Tierverluste bzw. Krankheitssymptome sofort den Veterinärbehörden gemeldet werden, so dass nach spätestens 48 Stunden ein AIV Verdacht ausgesprochen wird und entsprechende Sperrmaßnahmen eingeleitet sind.

In jedem Fall sollten aber aus den Abgasleitungen der betroffenen Stallabteile Staubreste entnommen und in der Brutei-Vermehrung auf den Gehalt an infektiösen H5N1-Viruspartikeln untersucht werden.

Außerdem sollten vorsorglich begleitende Immissionsmessungen an der nächsten Wohnbebauung bzw. im Lee der Anlage in z. B. 100 m Entfernung mit PM₁₀- und PM_{2,5}-Feinstaubsammlern durchgeführt werden. In den dabei gewonnenen Tagesproben könnte mit dem in diesem F+E-Vorhaben angewandten Nachweisverfahren abgeklärt werden, ob und wie viele infektiöse Viruspartikel in den untersuchten PM₁₀- und PM_{2,5}-Feinstaubfraktionen enthalten waren. Derzeit ist noch nicht bekannt, ob die Probenahmebedingungen bei PM₁₀- und PM_{2,5}-Immissionsmessungen mittels der Feinstaubsammlergeräte des LÜB einen negativen Einfluss auf die Virusstabilität von AIV haben. Erste Laboruntersuchungen lassen erwarten, dass das Virusgenom stabil genug für eine Nachweisbarkeit in 24 h-Tagesmittel-Proben ist. Die Nachweisgrenze lag hierbei bei 10 Virusgenomkopien/m³. Entsprechende Untersuchungen könnten daher auch Erkenntnisse für die Entwicklung eines standardisierten Nachweisverfahrens für AIV in Bioaerosolen liefern.

¹ TCPD₅₀ (50 % tissue culture cytopathic dose), MDCK-Zellen

Zur vorsorglichen Beobachtung könnten bei Großbeständen in allen Stallabteilen Bergerhoff-Becher in einer für die Tiere nicht erreichbaren Höhe aufgestellt werden. In regelmäßigen Intervallen könnte der erfasste Staubbiederschlag mittels RT-qPCR auf die Präsenz von AIV-Genom untersucht werden. Hierzu fehlen jedoch noch praxisnahe Erfahrungen aus dem Nutzgeflügelbereich. Ein derartiges System würde zwar Infektionseinträge nicht verhindern, aber ohne große Kosten und ohne Beeinträchtigung der Tiere die Gesamtheit einer Betriebspopulation überwachen lassen.

10 Ausblick

Nachdem die bisherigen Untersuchungen an **autoklaviertem und anschließend** virusdotiertem Hühnerkot gezeigt hatten, dass AIV des Subtyps H10N7 im modellhaft erzeugten Feinstaub je nach Umweltbedingungen zum Teil mehrere Tage lang infektiös blieben, könnte eine Überprüfung dieser Ergebnisse an **nicht autoklaviertem** Material vorgenommen werden. Allerdings sind dabei keine wesentlich anderen Ergebnisse zu erwarten, da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass AIV des Subtyps H5N1 bzw. H7N2 im Kot infizierter Hühner trotz dessen chemisch- und enzymatisch-aggressiver Zusammensetzung je nach Temperatur und UV-Stahlung bis zu 4 bzw. 23 Tage stabil sind (EFSA, 2008).

Für sinnvoll erachtet werden Untersuchungen, die abklären, wie stabil das Virusgenom tatsächlich unter den realen Bedingungen einer PM₁₀- und PM_{2,5}-Feinstaubsammlung ist und wo die effektive Nachweisgrenze liegt, da dies im Rahmen dieses Projekts aus zeitlichen Gründen nicht mehr möglich war. Unter Verwendung der RT-qPCR zur sensitiven Detektion von AIV-Genom wäre durch PM₁₀-/PM_{2,5}-Immissionsmessungen z. B. im Bereich von geeigneten Zugvögel-Rastplätzen und Wasservogel-Brutplätzen zu untersuchen, ob AIV-Genom im Feinstaub nachweisbar ist. Diese Untersuchungen könnten durch Staubbiederschlagsmessungen mittels Bergerhoff-Sammlern ergänzt werden.

Vor dem Hintergrund der bisher bekannten H5N1-Erkrankungen beim Menschen warnt die European Food and Safety Authority (EFSA, 2008) vor der potentiellen Gefahr, die von einer simultanen Infektion des Menschen mit AIV und humanen Influenza-A-Viren ausgeht, da dabei ein neuer Influenzavirusstamm mit effektiver Verbreitung in der menschlichen Bevölkerung entstehen könnte. Influenza-Infektionen beim Menschen treten fast ausschließlich in den ersten vier bis fünf Monaten des Jahres mit einer ausgeprägten Häufung¹ zwischen der 5. und der 14. KW auf. Diese Saisonalität ist bisher noch nicht abschließend geklärt (Lofgren, 2007). Nach Angaben des Robert Koch Instituts² sind jährlich bis zu 11.000 Todesfälle in Deutschland auf Influenza-Infektionen zurückzuführen. In den letzten Jahren zirkulierten in der menschlichen Bevölkerung überwiegend³ Influenza-A-Viren des Subtyps H1N1 bzw. H3N2. Der für die Saison 2007/2008 verwendete humane Grippeimpfstoff beinhaltet Derivate beider Subtypen. Influenza-A-Viren des Subtyps H1N1 bzw. H3N2 sind auch in den europäischen Schweinen enzootisch (EFSA, 2008). Schweine-Influenza-A-Viren (SIV) sind aerogen übertragbar und können Menschen infizieren (van Reeth, 2007). Viele SIV der Subtypen H1N1, H3N2 und H1N2 sind Reassortanten mit Mischungen aus humanen, aviären und porcinen Virusgenen (EFSA, 2008). Bisher sind 50 nachgewiesene Humaninfektionen mit SIV beschrieben (Myers, 2007). Es stellt sich daher die Frage, ob zwischen den Grippeerkrankungen beim Menschen und Influenza-Infektionen bei Schweinen ein Zusammenhang bestehen könnte. Mit den genannten molekularen Nachweisverfahren und einer weiter gehenden Influenzavirus-Genotyp Charakterisierung wäre zu untersuchen, ob SIV-Genom im Feinstaub aus Schweinehaltungen nachweisbar ist und welche potentielle

¹ Internetangebot des LGL: http://www.lgl.bayern.de/gesundheits/influenza2007_2008.htm

² Internetangebot des RKI: http://www.rki.de/cln_091/nn_200132/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Mbl_Influenza.html

³ Internetangebot des RKI: <http://influenza.rki.de/index.html?c=viren>

Gefährdung für den Menschen abzuleiten wäre. Bisher wurden SIV nur im Kot eines im Labor infizierten Schweins nachgewiesen (van Reeth, 2007). Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem plötzlichen Auftreten der humanen Grippewelle ab der 5. KW und dem Ende des Düngerausbringverbots¹ ab der 5. KW wäre zu überprüfen.

11 Literatur

BfR: Gemeinsame Stellungnahme Nr. 018/2006 des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR), des Friedrich-Loeffler-Instituts und der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel vom 14. März 2006: Geht von Muscheln und Fischen ein Infektionsrisiko bezüglich aviärer Influenza-A-Viren (H5N1) für den Menschen aus?

EFSA: European Food Safety Authority (2008): Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from The European Commission on Animal health and welfare aspects of avian influenza and the risk of its introduction into the EU poultry holdings. The EFSA Journal 715, 1-161

Lofgren, E.; Fefferman, N.H.; Naumov, Y.N.; Gorski, J.; Naumova, E.N. (2007): Influenza Seasonality: Underlying Causes and Modelling Theories. Journal of Virology Vol. 81, No. 11, 5429-5436

Myers, K.P.; Olsen, C.W.; Gray, G.C. (2007): Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. Clin Infect Dis. 44(8): 1084-1088

Nicholls, J.M.; Chan, R.W.Y.; Russell, R.J.; Air, G.M.; Peiris, J.S.M. (2008): Evolving complexities of influenza virus and its receptors. Trends in Microbiology Vol. 16 No.4

Safatov, A.S.; Agranovski, I.E.; Mikheev, V.N.; Kiselev, S.A.; Pyankov, O.V.; Skarnovich, M.O.; Petrishchenko, V.A.; Buryak, G.A.; Shishkina, L.N.; Sergeev, A.N.; Drozdov, I.G. (2007): Avian influenza (subtype H5N1) transmission mechanisms. European Aerosol Conference 2007, Salzburg, Abstract T04A012

Tellier, R. (2006): Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus. Emerging Infection Diseases Vol. 12, No. 11, p. 1657-1662

TÜV Süddeutschland (2000): Bericht über „Grundsatzuntersuchung über die Ermittlung der Korngrößenverteilung im Abgas verschiedener Emittenten (< PM_{2,5} und < PM₁₀). Projekt II: Anlagen der Chemieindustrie, Raffinerien, Automobilindustrie, Holzindustrie und Tierhaltungen“. Auftraggeber: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz. Az. 1/6-100-72/99

Van Reeth, K. (2007): Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. Vet. Res. 38, 243-260

Van Riel, D.; Munster, V.J.; de Wit, E. Rimmelzwaan, G.F.; Fouchier, R.A.M.; Osterhaus, A.D.; Kuiken, T. (2006): H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. Science 312:399

¹ Verordnung über die Anwendung von Düngemitteln, Bodenhilfsstoffen, Kultursubstraten und Pflanzenhilfsmitteln nach den Grundsätzen der guten fachlichen Praxis beim Düngen (Düngeverordnung - DüV) vom 05. März 2007

EXPERIMENTELLER TEIL: Aerosolerzeugung und Feinstaubabscheidung, Aufbau eines molekularen Nachweisverfahrens für aviäre Influenzaviren in Umweltproben

Dokumentationsblatt

1. Bericht-Nr. Schlussbericht	2.	3. ISSN/ISBN
4. Sachtitel Aviäres Influenzavirus im Vogelkot und Feinstaub - Aerogene Übertragungsmöglichkeit? Teil: Aerosolerzeugung und Feinstaubabscheidung, Aufbau eines molekularen Nachweisverfahrens für aviäre Influenzaviren in Umweltproben	5. Abschlussdatum 24.11.2008	
	6. Veröffentlichungsdatum --	
7. Untertitel --	8. Ber. Nr. Auftraggeber --	
9. Autoren Hoppenheidt, K.; Krist, H.	10. Förderkennzeichen Az. 21-8721.27-28384/2006	
	11. Projektnr. 610077	
12. Durchführende Institution bifa Umweltinstitut, Augsburg	13. Fördernde Institution BayLfU	
	14. Berichtsart, -zeitraum Schlussbericht	
	15. Seitenzahl 120	
16. Fördernde Institution Bayerisches Landesamt für Umwelt, Augsburg	17. Literaturangaben 60	
	18. Tabellen 53	
	19. Abbildungen 61	
20. Zusätzliche Angaben --		
21. Kurzfassung Im Rahmen des Vorhabens wurde eine Apparatur zur Erzeugung von Feinstäuben entwickelt, errichtet und betrieben. Mit ihrer Hilfe wurden auf handelsüblichen, zur Feinstaubbestimmung eingesetzten Quarzfaserfiltern Feinstaubpartikel aus Hühnerkot abgeschieden, der mit einem aviären Influenza-Teststamm dotiert war. Anschließend wurden die Feinstaubfilter verschiedenen Umwelteinflüssen (Temperatur, Feuchte) über bis zu 96 h ausgesetzt und die Stabilität der Influenza-Viren auf den Feinstaubfiltern untersucht. Der Nachweis von aviärem Influenza A Virus (AIV) erfolgte einerseits über die Präsenz viraler RNA mithilfe der RT-qPCR und andererseits durch Verimpfen der Proben in bebrütete Hühnereier zur Erfassung von vermehrungsfähigem Virus. Die mit der RT-qPCR detektierte Teilstruktur der viralen RNA erwies sich unter den geprüften Umweltbedingungen als stabil; über einen Zeitraum von 96 h wurde keine signifikante Abnahme der Virusgenomanzahl im Feinstaub gefunden. Dagegen nahm die Infektiosität der im Feinstaub aus Hühnerkot gelagerten Influenza-Viren in wassergesättigter Luft rasch ab. Bei einer trockenen Lagerung wurde erst bei höheren Temperaturen (37 °C, 50 °C) eine Virusinaktivierung beobachtet. Staubfeucht und trocken bei 4 bis 20 °C über 96 h gelagerte Virus-dotierte Feinstäube waren im Brutei noch infektiös. Aus infektionsprophylaktischen Gründen sollten Feinstaubemissionen aus Influenza-infizierten Tierstallungen schnellstmöglich minimiert werden.		
22. Deskriptoren/Schlagwörter Aviäres Influenza-A-Virus (AIV), Aerosolgenerator, Feinstaub, Hühnerkot, Umweltstabilität, PCR-Nachweismethodik, Infektiosität im Brutei		
23. Bezugsquelle --		
24. --	25. --	26. Preis --

1 Zusammenfassung

In einer Literaturrecherche wurden Daten zur Umweltstabilität von Influenza-Viren vergleichend analysiert (s. 2.3). Biologische, chemische und physikalische Einflüsse können die Stabilität von Influenza-Viren beeinflussen. Hohe Stabilität haben die Viren bei tiefen Temperaturen, geringen Feuchten, alkalischen pH-Werten und bei Abwesenheit von UV-Strahlung. Davon abweichende Umweltbedingungen können zu einer raschen Inaktivierung der Viren führen.

Im Stoffwechsel von Geflügel geht der größte Massenstrom auf die Atmung und die Kotausscheidung zurück. Influenza-infizierte Vögel reichern beide Teilströme z. T. mit sehr hohen Virusmengen an, die über den Luftpfad vor allem über den Feinstaub in die Umwelt emittiert werden können. Zur umwelt-hygienischen Beurteilung derartiger Emissionen sollte in diesem Vorhaben geklärt werden, ob die Literaturbefunde zur Virusstabilität auch auf den Feinstaub von Hühnerkot übertragbar sind.

Zu diesem Zweck wurde eine Apparatur zur Erzeugung von Feinstäuben aus Hühnerkot entwickelt, errichtet und betrieben (s. 4.2). Mit ihrer Hilfe wurden auf handelsüblichen, zur Feinstaubbestimmung eingesetzten Quarzfaserfiltern Feinstaubpartikel aus Hühnerkot abgeschieden, der mit einem aviären Influenza-Teststamm (H10N7) dotiert war. Der für die Projektdurchführung notwendige Hühnerkot wurde aus einem Legehennenbetrieb (Volierenhaltung) entnommen und für die Aerosolgenerierung aufbereitet. Kontrolluntersuchungen des LGL zeigten, dass der Kot keine Grundbelastung mit Influenza-A-Viren hatte und auch bakteriell unauffällig war. Das LGL hat den apathogenen, aviären Influenza-A-Virusstamm (Influenza A/H10N7) im Brutei vermehrt, geerntet und tiefgefroren asserviert. Dieser Teststamm wurde zur Beimpfung des Hühnerkots eingesetzt.

In 11 Untersuchungsreihen wurden 391 virusdotierte Feinstaubfilter hergestellt und verschiedenen Umwelteinflüssen (Temperatur: -70 °C bis + 50 °C, Feuchte: Wassergesättigte bis wasserfreie Atmosphäre) über bis 96 h ausgesetzt (s. 4.3).

Zum **Nachweis der Virusgenomanzahl in Feinstäuben** aus Hühnerkot, die auf handelsüblichen Quarzfaserfiltern abgeschieden waren, wurde eine Arbeitsmethodik entwickelt und erprobt (s. 4.4). Die Elution der Viren von den Quarzfaserfiltern erwies sich als unproblematisch. Die anschließende Extraktion der Virus-RNA mit dem MagMAX™ AI/ND Viral RNA Isolation Kit (Applied Biosystems) ermöglichte eine sehr gute Abtrennung von Störstoffen, sodass der quantitative Nachweis der Influenza-Virusgenomanzahl mithilfe der Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)¹ mit dem TaqMan® Influenza A Detection Kit (Applied Biosystems) problemlos war. Der Median der Virusgenomkopien pro Filter lag bei den Untersuchungsreihen im Bereich von $1,9 \times 10^6$ bis $9,4 \times 10^6$ Genomkopien pro Filter.

Das mit dem Nachweissystem detektierte Teilstück des Influenza-Virusgenoms erwies sich bei allen untersuchten Umweltbedingungen als stabil, sodass keine signifikante Abnahme der Genomkopienanzahl mit der Zeit beobachtet wurde. Ergänzend durchgeführte Untersuchungen bestätigten, dass die Nachweismethodik auch unempfindlich gegenüber anderen Feinstaubqualitäten ist: Feinstäube von Filtern aus PM₁₀-Tagesproben der Messstationen Augsburg/LfU und Andechs des „Lufthygienischen Landesüberwachungssystem Bayern - LÜB“ störten die Nachweismethodik nicht. Eine Abschätzung zeigte, dass auf Feinstaubfiltern Influenza-Viren nachweisbar wären, wenn mehr als 375 Virusgenomkopien pro Filter vorliegen. Unter praxisüblichen Bedingungen der LÜB-Feinstaubprobenahme wären somit bereits 10 Virusgenomkopien pro m³ Luft erfassbar. Dieser Wert ist um mehr als 4 Zehnerpotenzen niedriger als jene Virusanzahl, die in der Abluft von Tierstallungen Influenza-infizierter Bestände erwartet werden kann. Auch in mehreren Hundert Meter Entfernung von entsprechenden Tierstallungen sollten in der Luft noch Anzahlen von Virusgenomkopien weit oberhalb der Nachweisgrenze der im Vorhaben genutzten Methodik vorliegen.

¹ RT-qPCR (reverse transcription quantitative polymerase chain reaction)

Die verwendete Nachweis-Methodik kann alle bekannten Influenza-A-Virus-Varianten detektieren. Deshalb könnte sie ein Baustein für ein Feinstaub-basiertes Umweltmonitoring von Influenza-A-Viren sein. Bislang fehlen Kenntnisse darüber, bis in welche Entfernung von Emittenten mit erhöhten Virengehalten in der Luft gerechnet werden muss. Emissionsrelevant wären z. B. Tierstallungen mit Influenza-erkrankten Tieren und die Ausbringung von Wirtschaftsdüngern aus Stallungen mit erkrankten Tieren.

Die **Prüfung der (Rest-)Infektiosität und Vermehrungsfähigkeit** der im Feinstaub gelagerten Influenza-A-Viren wurde vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL; Prof. Dr. Dr. Büttner) durchgeführt (s. 4.5). Hierzu wurden Filtereluat hergestell und im bebrüteten Hühnerbrut eingesetzt. Die Brutei-Befunde wurden durch Untersuchungen der viralen RNA mittels PCR und Bestimmungen der Agglutinationstiter abgesichert.

Anfangs wurden die Virus-dotierten Filter in Kunststofftüten **staubfeucht**, d. h. mit der Aerosolkammerbedingten Restfeuchte bei verschiedenen Temperaturen bis zu 96 h gelagert. Im Brutei erwiesen sich nur einige der bei 4 °C gelagerten Feinstaubfiltereluat als nicht mehr infektiös. Bei -70 °C (Kontrolle), -20 °C, 20 °C und 37 °C gelagerte Filter waren auch nach 96 h noch infektiös. Bei der Bearbeitung war jedoch aufgefallen, dass bei den bei 4 °C gelagerten Filtern Feinstaub an den Tüten haftete, was auf eine erhöhte Feuchtigkeit bei der Lagerung (Kondensation von Luftfeuchtigkeit) hindeutete.

Deshalb wurden die Virus-dotierten Filter danach in Kunststoffröhrchen gelagert, die die Anhaftung von Feinstaub an der Wand verhinderten. Außerdem wurden die Filter nun in wassergesättigter Luft („feucht“), staubfeucht und in trockener Luft („trocken“) bei -70 °C (Kontrolle), -20 °C, 20 °C, 37 °C und 50 °C bis zu 96 h gelagert.

Alle **in wassergesättigter Luft („feucht“) gelagerten Filter** ergaben im Brutei durchgehend negative Befunde: Bereits nach 48-stündiger feuchter Lagerung war die (Rest-)Infektiosität der Viren soweit herabgesetzt, dass im Brutei keine Influenzainfektion mehr stattfand.

Bei 4 °C **staubfeucht gelagerte Filter** erwiesen sich auch nach 96 h noch als infektiös. Offenbar waren die bei einer Filterlagerung in Kunststofftüten bei 4 °C beobachteten Virusinaktivierungen auf die bei diesen Lagerungsbedingungen auftretenden erhöhten Feuchtigkeiten zurückzuführen. Dieses Feuchteartefakt konnte bei der Lagerung in Kunststoffröhrchen vermieden werden, sodass das Influenza-A-Virus nunmehr auch bei 4 °C stabil blieb.

Bei Temperaturen über 20 °C war in den meisten Fällen nach 48 h keine Infektiosität im Brutei mehr nachweisbar.

In trockener Luft („trocken“) gelagerte Filter waren bei 4 °C ebenfalls nach 96 h im Brutei noch infektiös. Bei 20 °C erwiesen sich einzelne Filter auch nach 96 h noch als infektiös. Lediglich bei einer Lagerung bei 37 °C war bereits nach 48 h keine Infektiosität im Brutei mehr nachweisbar.

Zusammenfassend zeigten die Befunde für die untersuchten Influenza-A-Viren, dass diese auch im Feinstaub aus Hühnerkot bei hohen Feuchten und höheren Temperaturen (> 20 °C) relativ schnell inaktiviert werden. Bei kühler und trockener Witterung emittierte Feinstäube aus Influenza-infizierten Stallungen könnten den Befunden zufolge über mehrere Tage infektiös bleiben. Da Feinstäube innerhalb von Tagen über große Entfernungen verfrachtet werden können, sollten Staubemissionen aus Influenza-infizierten Tierbeständen aus infektionsprophylaktischen Gründen schnellstmöglich reduziert werden.

2 Aufgabenstellung und Ziele des Vorhabens

2.1 Bedeutung von Influenza-Viren

Nach Modrow et al. (2003) kennt man heute 3 Virusfamilien¹, deren Vertreter ein RNA-Genom mit negativer Orientierung besitzen, das in den infektiösen Viruspartikeln nicht als ein kontinuierliches RNA-Molekül, sondern in mehreren Segmenten vorliegt. Das in Segmenten vorliegende Genom ermöglicht den Viren die Bildung von sog. Reassortanten: Hier können bei Doppelinfektion derselben Wirtszelle mit unterschiedlichen Virustypen die RNA-Moleküle während der Replikation gemischt werden. Die Nachkommen-Viren können so Neukombinationen ihrer RNA-Segmente und damit neue Eigenschaften erhalten. Dieses Ereignis wird als *antigenic shift* bezeichnet und kann bei den Influenza-A-Viren als Segmentaustausch unter den Subtypen vorkommen. Auf diese Weise können kurzfristig wesentlich tief greifender veränderte neue Viren-Stämme entstehen, als dies durch Punktmutationen möglich ist, die den genetischen Code der Viren ohnehin laufend verändern (*antigenic drift*). Diese Virusveränderungen bedingen einerseits, dass kein dauerhafter Schutz gegen alle Influenza-A-Virussubtypen erreichbar ist und andererseits, dass es immer wieder zur Ausbildung von hochpathogenen Virusvarianten bis hin zur Entstehung von sog. Pandemiestämmen kommen kann.

Die Influenza-Viren sind die bekanntesten Vertreter der Familie der Orthomyxoviren. Aufgrund molekularer und serologischer Charakteristika lassen sich bei den *Orthomyxoviridae* verschiedene Virus-Genera unterscheiden, die beim Menschen und bei Tieren Virusinfektionskrankheiten hervorrufen können, die teilweise symptomlos sind und teilweise schwerwiegende Erkrankungen zur Folge haben können.

Tab. 1: Gattungen der Orthomyxoviren sowie häufige Wirte

Genera	Mensch	Tier
Influenza-A-Virus	Ja	Schweine, Pferde, Robben, Nutzgeflügel und sonst. Vögel
Influenza-B-Viren	Ja	Robben
Influenza-C-Viren	Ja	Schwein
Thogotovirus	--	Zecken, Rinder, Schafe, Ziegen, Nagetiere
Isavirus	--	Lachse

Die gesundheitliche Bedeutung der Influenzaviren wird maßgeblich durch deren Proteinkomposition beeinflusst, deren wesentliche Elemente schematisch in Abb. 5 zusammengefasst sind. Die Influenza-A-Viruspartikel haben meist eine sphärische Form mit einem Durchmesser von 80-120 nm und 200-300 nm Länge. Sie bestehen aus 8 segmentierten RNA-Molekülen, die vom Kapsid und einer Hüllmembran umgeben sind. In diese sind viruscodierte, glykosylierte Oberflächenproteine („spikes“) eingelagert. Bei Influenza A- und B-Viren sind die Wichtigsten das Hämagglutinin („H“) und die Neuraminidase („N“). Das Hämagglutinin ist für die Adsorption des Virus an Neuraminsäuren auf der Oberfläche der Wirtszellen verantwortlich. Daneben kann es Membranen fusionieren und Erythrocyten agglutinieren. Das Neuraminidase-Protein spaltet endständige Neuraminsäuren von komplexen Kohlenhydraten ab. Das Matrixprotein ist mit der Innenseite der Lipiddoppelschicht in der Hülle assoziiert und kleidet diese aus. Die RNA-Segmente sind über ihre gesamte Länge mit Nucleoproteinen komplexiert und an jedem Abschnitt sind die Proteine des Polymerasekomplexes gebunden. Die Genomsequenz der Influenzaviren ist (weitgehend) bekannt. Influenza-A-Viren haben 13.600 und Influenza-B-Viren 14.600 Basen. Die 3'- und 5'-Enden der einzelnen Segmente sind über kurze Bereiche zueinander

¹ Orthomyxoviridae; Bunyaviridae; Arenaviridae

komplementär und bilden damit Doppelstränge aus, die der RNA eine quasizirkuläre Form geben. Jedes RNA-Segment codiert für unterschiedliche Virusproteine. Die Viruspartikel haben eine Molekülmasse von 250×10^6 und eine spez. Dichte von $1,19 \text{ g/cm}^3$ (Modrow et al., 2003; ICTV, 2007).

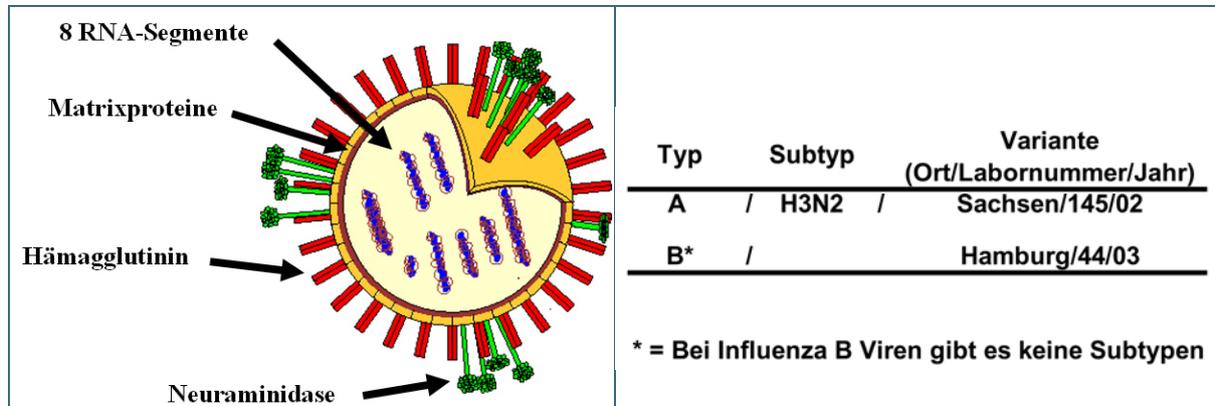


Abb. 5: Links: Schematischer Aufbau von Influenzaviren mit wichtigen „Bausteinen“; rechts: Nomenklatur der Influenza-Viren (n. Buchholz et al., 2005)

Jedem neuen, in Kultur vorliegenden Virus wird ein Name gegeben, der als Erstes den Typ (A, B) beinhaltet. Nur bei Influenza A-Viren erfolgt eine weitere Subtyp-Charakterisierung nach den Hämagglutinin- und Neuraminidase-Komponenten, also z. B. H3N2 oder H1N1. Für Influenza B-Viren gibt es keine Subtypen. Für eine genauere Bezeichnung folgt dann noch die Herkunft des Virus als Ort oder Region, die Laboreingangsnummer (vom Nationalen Referenzzentrum (NRZ) vergeben) und das Jahr, in dem das Virus isoliert wurde. Beispiel: A/H3N2/Sachsen/145/02

Bei Influenza-A-Viren lassen sich serologisch und molekularbiologisch 16 Hämagglutinin- und 9 Neuraminidase-Subtypen unterscheiden, wobei innerhalb jedes Subtyps weitere Variationen auftreten können. Influenza-A-bedingte Grippeerkrankungen des Menschen werden vor allem durch die Subtypen H1N1, H2N2 und H3N2 hervorgerufen. In Deutschland sterben jährlich 7.000-14.000 zumeist ältere Menschen an den Folgen einer Influenza-Erkrankung (Virus Taxonomy Online, 2007; Buchholz et al., 2005). Darüber hinaus hat es im 20.ten Jahrhundert 3 Grippewellen mit hochpathogenen Virusvarianten („Pandemien“) gegeben, bei denen weltweit mehrere Millionen Menschen starben.¹ Man hat mittlerweile festgestellt, dass z. B. das Pandemievirus von 1917/18 ein stark verändertes Virus rein aviären Ursprungs (Enten oder sonstige Geflügel) war (Modrow et al., 2003).

Influenzaviren kommen praktisch weltweit in Wassergeflügel (Enten, Gänse, Möwen) vor, doch bei ihnen verlaufen die Infektionen meist altersabhängig i. d. R. subklinisch. Im Unterschied zum Menschen und den Säugetieren vermehren sich die Viren in Vögeln nicht überwiegend im Respirations- sondern auch im Gastrointestinaltrakt, sodass mit dem Kot große Virusmengen ausgeschieden werden, die Ausgangspunkt von neuen Infektionen sein können. Bestimmte Subtypen der Influenzaviren verursachen in Nutzgeflügel (vor allem bei Hühnern und Puten) systemische Infektionen mit schweren Erkrankungen. So sind hochvirulente Stämme der Subtypen H5N1 und H7N1 seit Langem als Erreger der klassischen Geflügelpest (aviären Influenza) bekannt (Rolle/Mayr, 2007).

¹ 1918 „Spanische Grippe“ (A/H1N1); 20 - 40 Millionen Tote / 1957 „Asiatische Grippe“ (A/H2N2); 2 Millionen Tote / 1968 „Hongkong Grippe“ (A/H3N2); 0,75-1 Million Tote

Seit einem Jahrzehnt werden neue Infektionen des Menschen durch Virustypen beobachtet, die zuvor in Geflügel und Wildvögeln massenhaft auftraten und bei verschiedenen Vogelarten eine sehr hohe Mortalität aufwiesen. So erkrankten 1997 in Hongkong erstmals 18 Menschen an Influenza A/H5N1, von denen 6 verstarben. 1998 und 1999 wurden Menschen in China durch H9N2-Virustypen infiziert. Bis März 2008 sind an hochpathogenen aviären Influenza-A-Viren des Subtyps H5N1 weltweit 373 Menschen erkrankt, von denen 236 verstarben (WHO, 2008a). Außerdem verursacht die Geflügelpest große wirtschaftliche Schäden an Nutz- und Wildgeflügel und ist inzwischen weltweit verbreitet (Abb. 6).

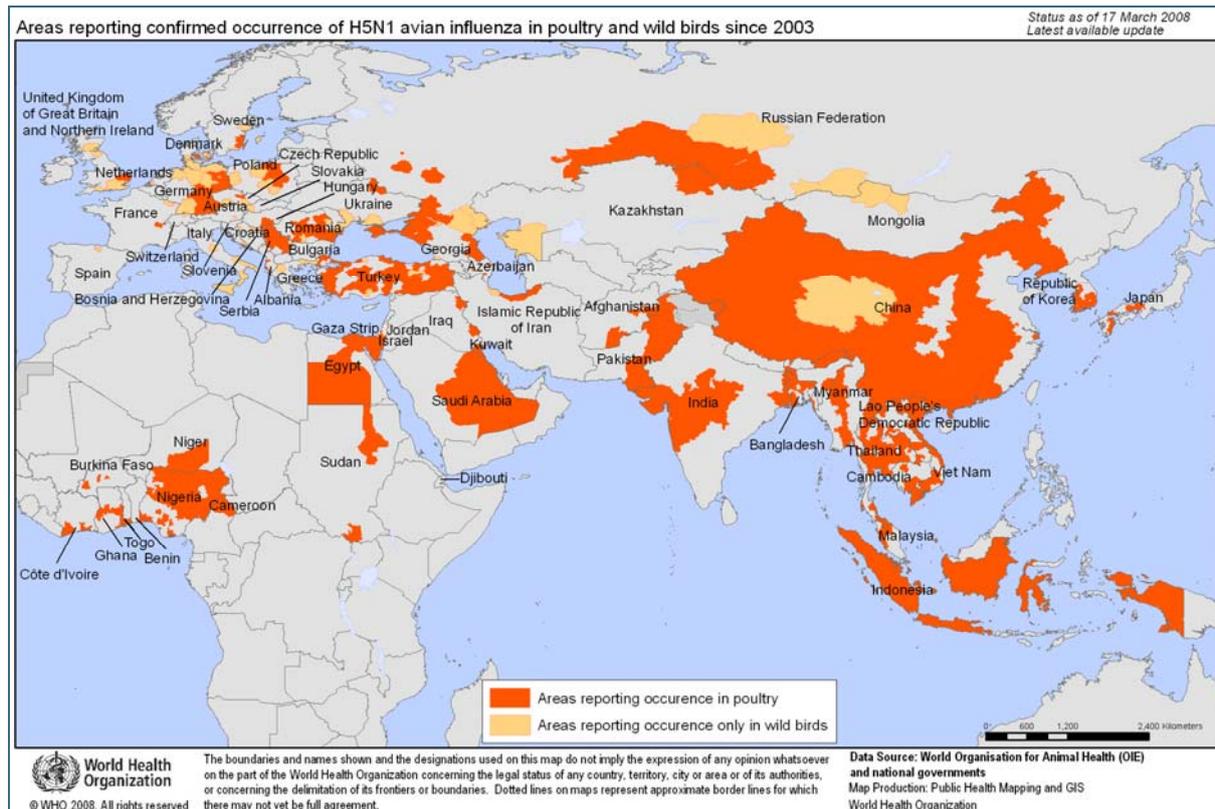


Abb. 6: Auftreten der aviären Influenza (H5N1) bei Nutzgeflügel und Wildvögeln (WHO 2008b)

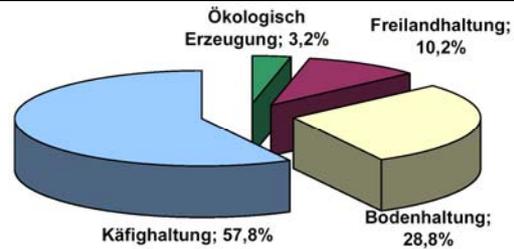
Weltweite Maßnahmen zur Bekämpfung der aviären Influenza sollen die Bestände des Nutz- und Wildgeflügels schützen, die wirtschaftlichen Folgen der Geflügelpest reduzieren und insbesondere verhindern, dass von erkrankten Vogelbeständen neuartige Infektionsgefahren für den Menschen ausgehen.

2.2 Aspekte der Geflügelzucht

Aus Bayern stammen rd. 10 % des in Deutschland gezüchteten Geflügels. Den bayerischen Geflügelbestand sowie die Struktur der Legehennenbetriebe zeigt Tab. 2. Die Daten verdeutlichen, dass 175 Legehennenbetriebe 72 % der Legehennenplätze und 90 Hühnermastbetriebe rd. 97 % der Masthähnchen repräsentieren. Der größte Teil des Geflügels stammt somit aus Großbetrieben.

Tab. 2: Geflügelbestand der landwirtschaftlichen Betriebe in Bayern sowie Struktur der Legehennenplätze (BStMLF, 2006)

Geflügelart	Anzahl der Halter	Tierbestand
Legehennen*	28.910	3.546.257
Masthähnchen**	509	4.370.000
Truthahn	321	660.000
Gänse/Enten	--	~ 100.000



* 98 % der Betriebe haben weniger als 250 Legehennen/Betrieb und zusammen rd. 16,4 % der Hennen; 0,6 % der Betriebe halten > 3.000 Hennen/Betrieb und zusammen rd. 72 % der Hennen / ** 90 Betriebe mit mehr als 10.000 Tieren/Betrieb halten rd. 97 % der Masthähnchen

Für die Geflügelhaltung gibt es eine große Bandbreite von Haltungsverfahren für Legehennen und Mastgeflügel. Ausgangspunkt für beide Nutztierarten ist die Züchtung von Jungtieren, die meist in darauf spezialisierten Betrieben erfolgt. Hier werden Elterntiere beiderlei Geschlechts gemeinsam gehalten und die bebrüteten Eier im Brutschrank ausgebrütet. Aus Gründen des Infektionsschutzes erfolgt die Aufzucht von Jungtieren meist in geschlossenen Stallungen.

Für die Mast bestimmte Jungtiere werden anschließend in Bodenhaltung gemästet, wobei die Stallungen mit Stroh oder Sägespäne ausgelegt sind. Die Tiere (beiderlei Geschlechts) verbleiben bis zum Mastende in dem Stall, wobei zwischen Kurzmast (32-34 Tage), der Mittelmast (38-40 Tage) und der Langmast (Hennen bis 45 Tage; Hähne bis 60 Tage) unterschieden wird. In den verschiedenen Mastphasen kommen unterschiedliche Futtertypen und -mengen zum Einsatz und durch die Klimatisierung werden optimale Stalltemperaturen, Lichtverhältnisse, Luftfeuchten und -qualitäten eingestellt. Anschließend wird der Stall gereinigt, desinfiziert und neu bestückt (Krafeldt, 2004; Sudhop, 2006).



Links: Käfighaltung
Mitte: Bodenhaltung und Kleinvoliere
Rechts: Freilandhaltung
Quelle:
<http://www.deutsche-legehennen.de>

Abb. 7: Haltungssysteme für Legehennen

Die Legehennenhaltung ist im Vergleich dazu variantenreicher. Prinzipiell lassen sich 5 Haltungsverfahren unterscheiden:

Käfighaltung: Bis Ende 2006 dominierte diese Haltungsform mit mehr als 80 % der Legehennenplätze die Eierproduktion in Deutschland. Ab Ende 2008 (in Ausnahmefällen ab Ende 2009) ist die konventionelle Käfighaltung in Deutschland verboten. Hierbei wurden 4-5 Legehennen in einem Käfig gehalten, aus dem über Förderbänder Eier und Kot abgeführt wurden. Die Käfige waren ansonsten noch mit einer Wasser- und Futterdosierung ausgestattet. Zahlreiche Käfige waren übereinander und nebeneinander angebracht und zahlreiche Käfigreihen standen gemeinsam in einem Stall.

- **Kleingruppenhaltung:** Das Verbot der Käfighaltung führte zur Entwicklung der Kleingruppenhaltung. Laut Informationskreis Legehennenhaltung (IKL) sollen bei der Kleingruppenhaltung die Bedürfnisse der Tiere durch ein größeres Platzangebot und die Strukturierung in Einstreufläche, Nest und Sitzstangen erfüllt sein. Mit einem abgedunkelten Nest zur ungestörten Eiablage, Sitzstangen für erhöhtes Ruhen und Einstreu zur Ausübung von Scharren und Picken, soll die Kleingruppenhaltung den Legehennen ein verhaltens- und tiergerechtes Leben ermöglichen. Die Gruppengröße von mindestens 20 bis zu 60 Hennen bietet eine damit verbundene, entsprechend erweiterte Bewegungsfläche von bis zu 4,5 m² pro Tier. Es wird erwartet, dass mit dieser Haltungsform in Deutschland zukünftig 50 % der Eier produziert werden.
- **Bodenhaltung:** Die Bodenhaltung ist die älteste Form der Stallhaltung und sie wurde durch die Käfighaltung auf 9,4 % der Legehennenplätze zurückgedrängt, setzt sich nun aber wieder durch. Der Stall hat 3 Funktionsbereiche:
 - den Scharrraum: Mit Sägemehl oder Stroh eingestreuter Bereich
 - die Kotgrube: Sie ist zwischen Scharrraum und Nest angeordnet und 50 – 80 cm hoch. Die Abdeckung besteht aus Kunststoffrosten, durch die der Kot fällt und in der Grube bis zum Austrag verbleibt. Im Bereich der Roste sind auch die Tränken und die Fütterungen sowie Sitzstangen zu finden.
 - das Nest: Vom Rost der Kotgrube gelangen die Hennen in das Nest, aus dem die Eier mit einem Förderband abtransportiert werden.
- **Volierenhaltung:** Der Volierenstall ist ein relativ neues Haltungssystem. Im Prinzip handelt es sich um einen Bodenhaltungsstall mit bis zu drei übereinander liegenden Ebenen, zwischen denen sich die Tiere hin- und herbewegen können. Neben einem (auch mehretägigen) Lege- nest mit automatischem Eierabtransport befinden sich im Stall mehretägige Volieren mit Rosten und Kotbändern sowie Sitzstangen, Tränken und Fütterungen. Der Stallboden ist als Scharrraum ausgestaltet.
- **Freilandhaltung:** Bei der Freilandhaltung wird ein normaler Bodenhaltungs- oder Volierenstall mit einer Weide als Auslauf für die Hennen kombiniert. Bislang wurden 9,8 % der Hennen auf diese Weise gehalten. Aufgrund der Bedrohungen der Geflügelbestände durch Influenza-infizierte Wildvögel wurde die Freilandhaltung inzwischen jedoch (zeitweilig) eingeschränkt und eine Stallpflicht für Geflügel angeordnet.

Zusammenfassend ergeben sich damit die in Abb. 8 schematisch dargestellten Stoffströme bei der Geflügelzucht. Die in quantitativer Hinsicht dominanten Stoffströme sind in Abb. 8 rot markiert, wobei der mit weitem Abstand größte Stoffstrom durch die Belüftung des Stalls verursacht wird.

Körpermasse	1,5 - 3,5 kg, stark rasseabhängig
Körperkerntemperatur	40,5 - 43,0 °C
Atemfrequenz	15 - 32 / min.
Geschlechtsreife	4 - 5 Monate
Legereife	5 - 6 Monate
Eimasse	58 ± 5 g
Brutdauer	20 - 21 Tage
Bruttemperatur	37,5 °C
Futteraufnahme	100 - 250 g / 24 Std
Wasseraufnahme	250 - 450 ml / 24 Std
Lebensdauer	5 - 8 Jahre (max. 15)

Atemvolumen: ca. 0,031 l
Atemfrequenz: 27/min (Flindt, 2000)

„Hühner nehmen die Nahrung mit dem Schnabel auf. Im Mund wird die Nahrung ein wenig eingeschleimt und gelangt in den Kropf. Der Kropf ist eine Ausbuchtung der Speiseröhre. Er ermöglicht, dass das Huhn größere Nahrungsmengen aufnehmen kann. Im Kropf wird die Nahrung gespeichert und in unregelmäßigen Schüben in den Magen befördert. Das Huhn hat zwei Mägen, einen Drüsenmagen und einen Muskelmagen. Der Drüsenmagen erzeugt Verdauungssäfte, die sich mit dem Futter zu einer schleimigen Masse vermischen. Die eigentliche chemische und mechanische Verdauung beginnt im Muskelmagen. Im Muskelmagen befinden sich kleine Steinchen, die das Huhn mit seiner Nahrung (als sogenannter Grit) aufnehmen muss. Der Muskelmagen erzeugt durch Muskelkontraktionen einen Reibungsdruck, durch den die Nahrung unter Hilfe der Steinchen zu einem sehr feinen Brei zermalmt wird. Im Muskelmagen wird die Nahrung ca. zwei Stunden behandelt, dann wird sie in den Darm transportiert. Zusätzlich zu Dünndarm und Dickdarm besitzt das Huhn zwei Blinddärme. In den Blinddärmen wird Rohfaser durch Mikroorganismen aufgeschlossen und damit teilweise für das Huhn verdaulich gemacht. Der Darm des Huhns ist relativ kurz. Deshalb ist auch die Darmdurchgangszeit der Nahrung kurz: 3 bis 6 Stunden nach der Nahrungsaufnahme beginnt die Ausscheidung. Die nicht verwertbaren Stoffe werden durch die Kloake ausgeschieden. Das Huhn hat zweierlei Kot: Dickdarmkot mit fester Konsistenz und Blinddarmkot, der dünnbreiig, dunkel und stark stinkend ist. Ebenfalls durch die Kloake wird der Harn ausgeschieden. Der Harn des Huhnes ist die halbfeste, weißliche Masse, die zusammen mit dem Kot ausgeschieden wird.“¹⁴

Abb. 9: Links: Organe eines Huhns – Verdauungstrakt farbig markiert (n. Remane et al., 1981); rechts: Rahmendaten zur Haltung von Hühnern (GVSOLAS, 2006)

Tab. 3: Literaturwerte zum Virusvorkommen

Literaturdaten zum Virengehalt	Quelle
Bis 3×10^9 EID ₅₀ /Gramm Vogelkot	WHO (2006)
$3,2 \times 10^7$ EID ₅₀ /ml im Vogelkot	Zitiert in: Van Reth (2006)
Bis 5×10^8 EID ₅₀ /Gramm Vogelkot	Zitiert in: Kamps et al. (2006)
Bis $6,3 \times 10^7$ EID ₅₀ /Gramm Vogelkot	Webster et al., 1978
$1,5 \times 10^4 - 3,2 \times 10^6$ EID ₅₀ /ml Oropharyngealsekret (H5N2)	Zitiert in SPS (2006)
$3,2 \times 10^4$ /ml Faeces (H5N2)	Zitiert in SPS (2006)
4×10^4 EID ₅₀ /ml Oropharyngealsekret (H5N1)	Zitiert in SPS (2006)
4×10^4 EID ₅₀ /ml Faeces (H5N1)	Zitiert in SPS (2006)
$3,2 \times 10^7$ EID ₅₀ /ml Faeces (H5N1)	Zitiert in SPS (2006)
Bis zu 10^7 TCID ₅₀ /ml Nasenschleim (Mensch)	Tellier (2006)

EID: Ei-infektiöse Dosis; TCID: tissue culture infective dose

¹⁴ Quelle: <http://www.payer.de/entwicklung/entw08711.htm#1>

Mit dieser Datenbasis zeigt eine erste Abschätzung, dass erkrankte Tiere ein hohes Virenemissionspotenzial haben. Krafeldt (2004) gibt als Planungsgrundlage für die Broilermast eine Lüfterleistung von mindestens 4,5 Kubikmeter Abluft je Kilogramm Lebendmasse und Stunde an. Pro Tag würden dann bei einem Mastendgewicht von 1,5 kg/Tier mindestens 162 m³ Abluft/Tier anfallen. Messungen des TÜV Süddeutschland (1999) hatten Gesamtstaubkonzentrationen von 6,2 mg/m³ in einer Broilerzucht und 3,1 mg/m³ für einen Legehennenbetrieb ergeben. Scharf (2004) ermittelte Staubkonzentrationen bei der Entenmast mit einem Median von 1,4 mg/m³ und einem Wertebereich von 0,3-10,3 mg/m³.

Bei einer angenommenen Staubkonzentration der Abluft von 5 mg/m³ und einer Abluftmenge von 162 m³ pro Tier und Tag, werden pro Tier rd. 0,8 g Staub pro Tag emittiert. Da es sich dabei überwiegend um Kotpartikel handelt, könnten bereits von einem Tier bis zu 10⁹ Viren pro Tag über den Staub in die Umgebungsluft emittiert werden. Hinzu kämen die über den Atmungstrakt freigesetzten Viren, für die bislang keine Daten recherchierbar waren.

2.3 Umweltstabilität von (Influenza-)Viren

Grundbausteine von Viren sind Biomoleküle, deren Stabilität durch biologische, chemische und physikalische Faktoren beeinflusst wird.

Biomoleküle sind grundsätzlich bioabbaubar, sodass Viren im biologisch aktiven Milieu enzymatisch zerstört werden können. Dementsprechend beobachteten Lu et al. (2003) eine raschere Virusinaktivierung sowohl in unsterilisierten als auch in sterilisierten Virus-dotierten Versuchsansätzen. In H7N2-dotiertem Hühnermist blieben die Viren bei einer Lagerung bei 4 °C über mehr als 20 Tage infektiös; bei Raumtemperatur verloren die Viren im Mist bereits nach weniger als 2 Tagen ihre Infektiosität. Wurde der Virus-dotierte Mist bei 56 °C gelagert, waren bereits nach weniger als 30 Minuten keine infektiösen Viren mehr nachweisbar (Lu et al., 2003). Bei diesen Untersuchungen konnten die gleichen Autoren außerdem zeigen, dass die Viren in wenigen Minuten bei 60 °C oder bei pH 2 und Raumtemperatur inaktiviert wurden. pH-Werte von 5 bis 12 hatten bei Einwirkzeiten von maximal 15 Minuten aber keinen Virus inaktivierenden Effekt.

Chumpolbanchorn et al. (2006) konnten mit H5N1-inokuliertem Hühnerkot zeigen, dass der mit $2,38 \times 10^{5,25}$ ELD₅₀ dotierte Kot (ELD: Ei-letale Dosis) bei einer Lagerung bei 40 °C bereits nach 15 Minuten nicht mehr infektiös war; bei 25 °C gelagerter Kot war nach 24 h nicht mehr infektiös. Eine 4-stündige UV-Bestrahlung bewirkte keine effiziente Virusinaktivierung.

Scholtissek (1985) überprüfte die Einflüsse von pH und Temperatur auf diverse Influenza-Virusstämme und konnte zeigen, dass die Stabilität bei verschiedenen Virusstämmen über einen weiten Bereich schwanken kann. pH-Werte unter 4,6 oder Temperaturen von 54 °C führten innerhalb weniger Minuten zu einer Virusinaktivierung. Dementsprechend reichen nach Angaben des BfR (2006) übliche Pasteurisierungsverfahren aus, um Influenza-A-Viren in Flüssigeiprodukten vollständig zu inaktivieren. Thomas u. Swayne (2007) haben überprüft, ob H5N1-Viren beim Kochen von Hühnerfleisch inaktiviert werden: Ausgehend von $> 10^{7,5}$ EID₅₀ pro Gramm Fleisch konnten sie zeigen, dass bei 73,9 °C bereits nach 0,041-0,073 Sekunden eine 90%ige Virusinaktivierung („d-value“) erreicht wird. Bei 57 °C sind jedoch noch 241,2 bis 321,1 Sekunden für eine entsprechende Virusinaktivierung notwendig.

Tiefgefroren oder lyophilisiert behalten Influenza-Viren über lange Zeiträume ihre Infektiosität. Auch in sterilem Wasser sollen aviäre Influenza-Virus suspensionen bei 17 °C über 200 Tage und bei 28 °C über 100 Tage infektiös bleiben (Stallknecht et al., 1990b). Brown et al. (2007) haben die Persistenz von verschiedenen aviären H5- und H7-Influenzaviren sowie von 2 hochinfektiösen H5N1-Varianten in Wasser (17 °C und 28 °C; drei unterschiedliche Salzgehalte) geprüft. Hierbei zeigte sich wiederum, dass die Viren in Wasser vor allem bei niedrigen Temperaturen und Salzgehalten lange Zeit infektiös

bleiben können. Die hochinfektiösen H5N1-Influenzaviren waren etwas labiler als die anderen geprüften Virusvarianten.

Bean et al. (1982) überprüften die Inaktivierung von Influenza-Viren, die auf unterschiedliche Oberflächen ausgebracht und bei Temperaturen von 27-29 °C und Luftfeuchten von 35-56 % angetrocknet wurden (s. Abb. 10). Bereits nach wenigen Minuten konnten von Händen keine infektiösen Viren mehr nachgewiesen werden, doch wiesen Plastik und Stahl noch nach mehr als 48 h Restgehalte infektiöser Viren auf (vergl. auch Boone u. Gerba, 2007). Noyce et al. (2007) konnten nachweisen, dass Influenza-A-Viren auf Kupferoberflächen wesentlich rascher inaktiviert werden als auf Stahloberflächen. Tiwari et al. (2006) haben den Einfluss von 12 porösen und nichtporösen Oberflächen auf die Inaktivierung von aviären Influenzaviren geprüft. Dabei blieben die Viren auf den nichtporösen Materialien länger (6 bis 9 Tage) infektiös.

Viren und insbesondere behüllte Viren sind nicht nur gegenüber physikalischen Einwirkungen (Wärme, pH und UV-Strahlung (Hollaender u. Oliphant, 1941)) vergleichsweise empfindlich; sie werden auch durch Lösungsmittel (z. B. Alkohole), nicht-ionische Detergentien, Formaldehyd und oxidierend wirkende Stoffe schnell zerstört (ICTV, 2007), sodass vergleichsweise leicht eine Desinfektion von Geräten und Oberflächen erreicht werden kann.

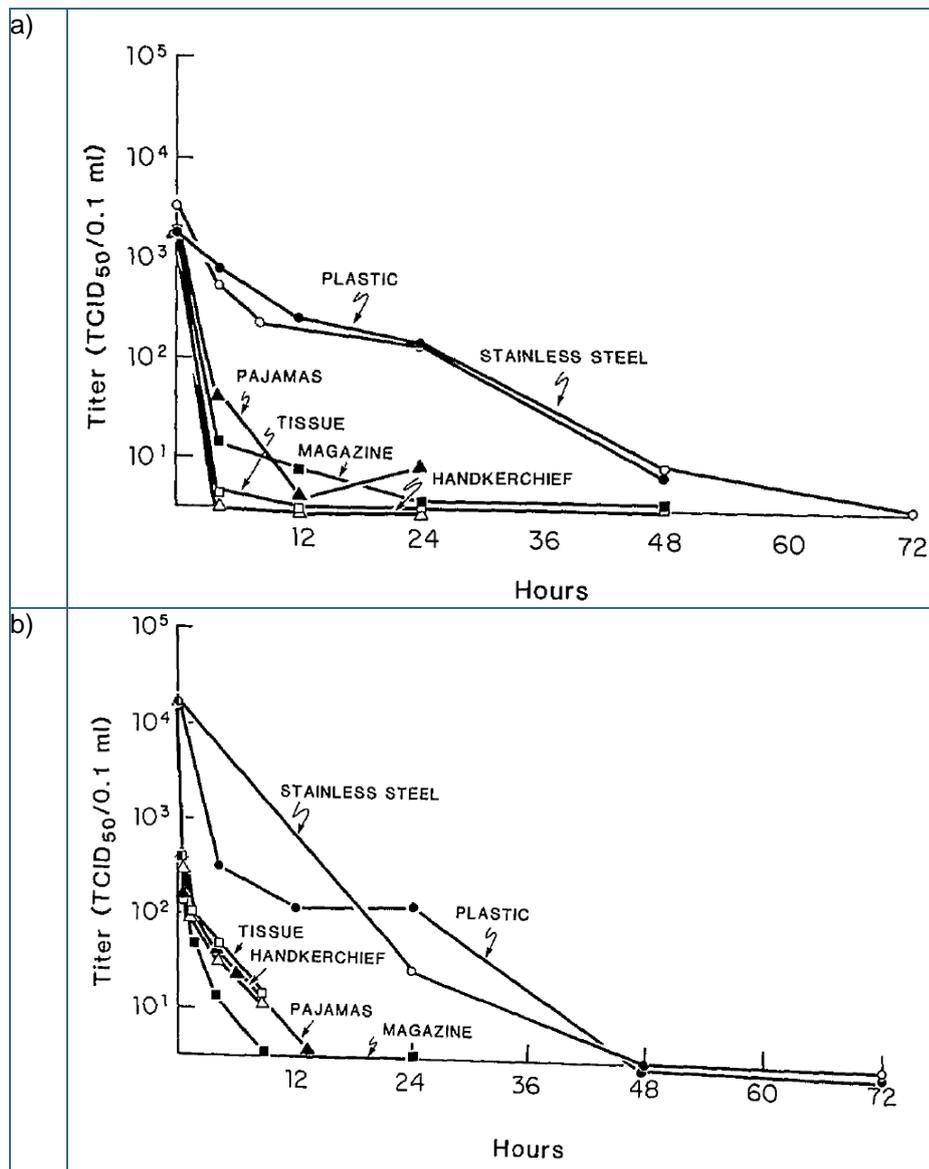


Abb. 10: Zeitlicher Verlauf der Infektiosität von Influenza A (a) und Influenza B (b) auf unterschiedlichen Oberflächen (Bean et al., 1982)

Obwohl Influenza-Viren in Wasser über relativ lange Zeiträume stabil sind, werden sie in feuchter Luft innerhalb weniger Minuten inaktiviert (s. Abb. 11 u. Abb. 12). Bemerkenswert ist an den Befunden von Hemmes et al. (1962), dass Poliomyelitis-Viren dagegen in trockener Luft rasch absterben. Lowen et al. (2007) konnten mit Meerschweinchen zeigen, dass die Influenza-Viren-Transmission bei kühlen Temperaturen und trockener Luft wesentlich effizienter ist als bei warmer, feuchter Luft. Eine Messkammer wurde bei 27-29 °C und unterschiedlichen Luftfeuchtegehalten betrieben und mit Influenza-Viren angereichert. Nach unterschiedlichen Zeiträumen wurden Mäuse für 20 Min. in die Kammer eingebracht und anschließend bei ihnen das Auftreten von Lungenschäden kontrolliert.

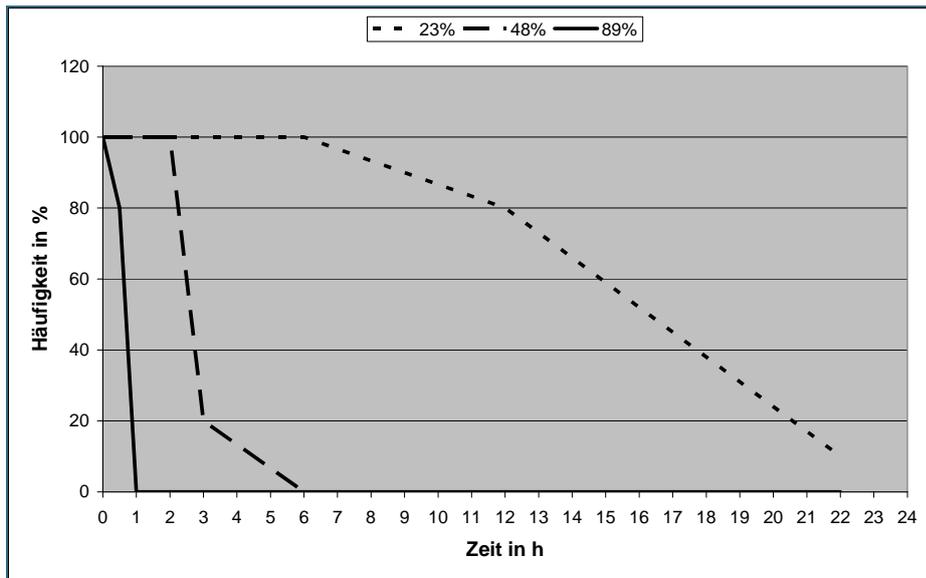


Abb. 11: Einfluss des Luftfeuchtegehalts auf die Infektiosität von Influenza-Viren (n. Loosli et al., 1943)

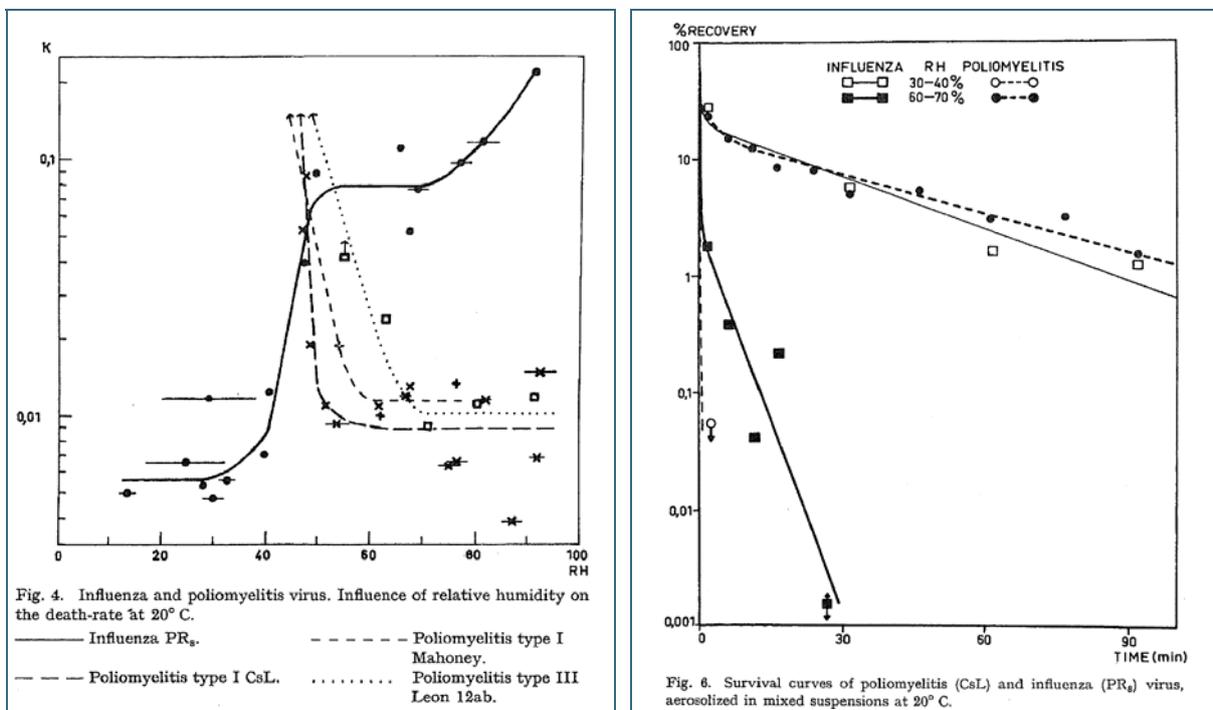


Abb. 12: Einfluss des Luftfeuchtegehalts auf die Tenazität von Influenza und Poliomyelitis-Aerosolen (Hemmes et al., 1962)

In Geflügelställen ist durch die Wasserabgabe der Hühner über die Atemluft sowie die Trocknung des Kots eher mit vergleichsweise feuchter Luft mit Luftfeuchten über 55 % zu rechnen. In die Luft emittierte Viren sollten deshalb unter diesen Bedingungen nur wenige Stunden stabil bleiben. Safatov et al. (2007) haben jedoch experimentell nachweisen können, dass H5N1-Influenza-Viren von erkrankten Hühnern auf gesunde Hühner sowohl über Fäkalien als auch über die Luft übertragen werden können. Sie ermittelten für die Infektion durch ein Aerosol eine infektiöse Dosis von 2 Einheiten (bestimmt als TCPD₅₀ pro Milliliter Suspension mit MDCK-Zellkulturen (TCPD: tissue culture cytopathic dose)). In diesem Zusammenhang ist ein weiteres Ergebnis dieser Autoren von Interesse: Das aviäre Influenza-Virus soll in der Luft 3-4mal instabiler gewesen sein als ein humanes Influenza-A-Virus (H3N2) und 50mal instabiler als das in Luft äußerst stabile Vaccinia Virus. Beachtenswert ist zudem die Beobachtung von Barbazan et al. (2008): Sie haben in Moskitos aus einem H5N1-infizierten Geflügelstall in Thailand das entsprechende Influenza-Virus gefunden. Ob das Influenza-Virus von Vektoren rein mechanisch auch auf gesundes Geflügel übertragen werden kann, muss jedoch erst noch geklärt werden. Sawabe et al. (2004) nehmen zumindest an, dass Schmeißfliegen Influenza-Viren mechanisch übertragen können.

Bisher sind erst sehr wenige Berichte über den Nachweis luftgetragener aviärer Influenza-Viren bekannt. Power (2005) berichtet, dass Kontrollmessungen innerhalb eines H7N3-Influenza-Viren-infizierten Stalls positive und als „sehr hoch“ eingeschätzte Virusbefunde ergaben. Außerhalb der Ställe wurden über 24 h insgesamt 240 Luftproben Luv und Lee des Lüfters genommen und in keiner Probe waren aviäre Influenza-Viren nachweisbar. Ausführlicher sind die Kontrollmessungen von Schofield et al. (2005) beschrieben. Danach wurden 240 der 256 entnommenen Luftproben mit einem low-volume-Sammler (slit sampler) gewonnen, doch war mit diesem Gerät die Nachweisempfindlichkeit zu gering, denn in keiner Probe waren mittels PCR Influenza-Viren detektierbar. Bei den 16 mit einem high-volume-Sammler (XMX sampler) entnommenen Luftproben ergaben 3 Proben einen positiven Influenza-Nachweis mittels PCR. Bei den im infizierten Stall entnommenen Luftproben konnten auch mithilfe des Zellkulturnachweises infektiöse Influenza-Viren in der Luft erfasst werden: Das Resultat wurde mit 292 Virus-Dosen/m³ Stallluft angegeben. Auch bei einer Luftprobe aus dem Umfeld des Stalls wurden mittels PCR Influenza-Viren nachgewiesen. Die Ergebnisse deckten aber erheblichen Entwicklungsbedarf hinsichtlich des Nachweises von luftgetragenen Viren auf, da eine hocheffiziente Abscheidung der Viren aus der Luft erreicht werden muss, ohne dass die Infektiosität der Viren durch die Probenahme verfälscht wird. Außerdem müssten die Probenahmegeräte leicht zu reinigen und desinfizieren sein, damit keine falsch-positiven Befunde erhalten werden. Zudem muss eine Verschleppung von Virusmaterial mit der Probenahmeeinrichtung in virusfreie Bereiche sicher ausgeschlossen werden.

Während trockene Luft für die Stabilität von Influenza-Viren positiv ist, wurde für Viren im Kot ein gegenteiliger Effekt beobachtet: Bei 37 °C waren bereits nach einem Tag keine infektiösen Viren im Kot mehr nachweisbar. Bei 20 und 4 °C blieb die Infektiosität jeweils im feuchten Kot über längere Zeiträume erhalten als im trockenen Kot. Unter den Feuchte- und Temperaturbedingungen der Geflügelställe sollten die Viren im Kot somit über wenigstens einige Tage infektiös bleiben.

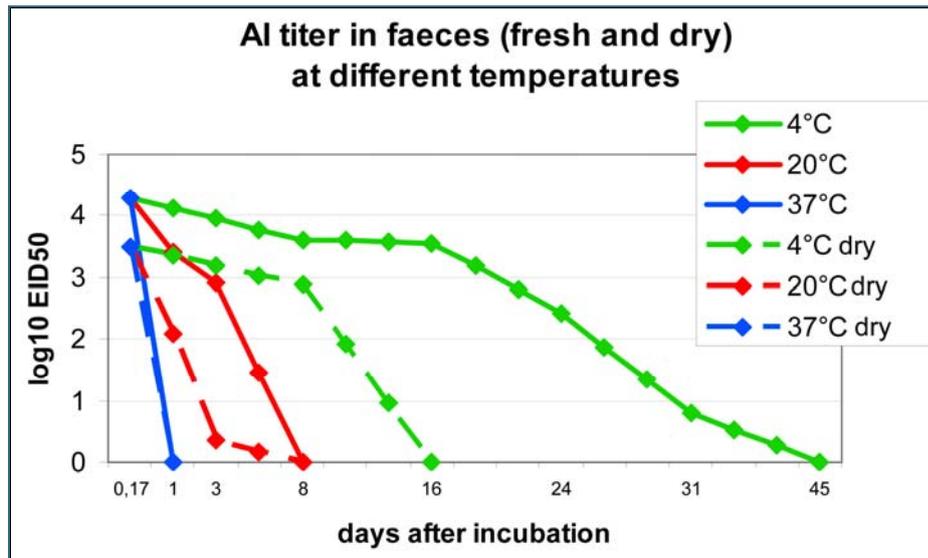


Abb. 13: Infektiosität von aviären Influenza-Viren in feuchtem und trockenem Geflügelkot bei 4, 20 und 37 °C (de Witt, 2006)

Inwieweit die Virusinfektiosität des Virus beeinflusst wird, wenn der Kot in Form von Staubpartikeln in die Luft gelangt, ist bislang unbekannt und Erkenntnisse hierzu sollte das aktuelle Vorhaben liefern. Ferner ist über die Stabilität von Influenza Virus-RNA in unterschiedlichen Substraten wenig bekannt. In dem Projekt sollten hierzu unter anderem durch Virusgenomnachweis im Feinstaub über RT-qPCR erste Daten gewonnen werden. Eine Reihe weiterer Literaturhinweise zur Stabilität von Influenza-Viren hat die WHO zusammengestellt und diese sind in Tab. 4 wiedergegeben.

Tab. 4: Datensammlung zur Influenza-Persistenz aus WHO (2007)

Medium	Virus Category ¹	Reported Finding ²	Reference (see listing following table)
Water	AIV	Faeces diluted in untreated Mississippi River water (pH =6.8) were infective up to 4 days at 22°C.	Webster et al., 1978
Water	AIV	Faeces diluted in untreated Mississippi River water (pH =6.8) were infective over 30 days at 0°C (Dt = 8.4 days).	Webster et al., 1978
Water	AIV	Water inoculated with infected duck faeces retained infectious virus 4 days at 22°C.	Hinshaw et al., 1979
Water	AIV	Water inoculated with infected duck faeces retained infectious virus over 30 days at 0°C.	Hinshaw et al., 1979
Water	AIV	Viable up to 32 days.	Animal Health Australia, Ausvetplan 2005
Water	AIV	Stable over pH range of 5.5 to 8.	Animal Health Australia, Ausvetplan 2005
Water	AIV	Estimated infectivity of LPAI viruses in distilled water 207d at 17°C (Dt = 21-34.5 days) based on linear regression.	Stallknecht et al., 1990a
Water	AIV	Estimated infectivity of LPAI viruses in distilled water 102 days at 28°C (Dt = 5-17 days) based on linear regression.	Stallknecht et al., 1990a
Water	AIV	Estimated infectivity of H6N1 virus was longest at 17°C (100 days) and shortest at 28°C (9 days) based on linear regression in distilled water system.	Stallknecht et al., 1990b
Water	AIV	AIVs are stable at neutral to 8.5 pH and more stable than human IVs below 6.0 pH.	Stallknecht et al., 1990b
Water	AIV	Modeled and natural systems show duration of infectivity decreasing with increased salinity and pH (greatest infectivity with cooler, freshwater habitats ranging 7.4-7.8 pH).	Stallknecht et al., 1990b
Water	AIV	For solids-associated viruses in water, no convincing evidence that pond water temp, bacterial count or pH of duck faeces had significant effect on virus occurrence.	Markwell and Shortridge, 1982

Water	General	Viruses are less persistent in natural waters and other media compared to same media that have been sterilized (microbes play role in viral inactivation).	Sobsey and Meschke, 2003
Water	General	Temperature is the most important predictor of virus persistence in well water.	Yates et al., 1985
Water	General	Viruses persisted for longer periods in well water than surface water samples incubated at similar temp.	Yates et al., 1985
Untreated Sewage/waste	AIV	H7N2 mixed with field chicken manure effectively inactivated in less than 1 week at ambient (15-20°C) temp.	Lu et al., 2003
Untreated Sewage/waste	General	Viruses are not eliminated by conventional treatment and may be enriched in solids fraction.	Sobsey and Meschke, 2003
Untreated Sewage/waste	General	Enveloped viruses are less persistent than nonenveloped viruses.	Sobsey and Meschke, 2003
Faeces	AIV	Infective for 7 days at 20°C.	Webster et al., 1978
Faeces	AIV	Infective over 30 days at 4°C.	Webster et al., 1978
Faeces	AIV	Viable up to 32 days in waterfowl.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Faeces	AIV	Longer survival in high moisture, low temperature conditions.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Faeces	AIV	H5N2 detectable in infective, wet manure at ambient temperature after 105 days.	European Food Safety Authority, 2005
Birds	H5N1	Ducks inoculated with 2003/2004 isolates shed 11-17 days.	Hulse-Post et al., 2005
Birds	H5N1	Ducks inoculated with 2002 isolates shed up to 10 days from trachea and up to 4 days from cloacae.	Sturm-Ramirez et al., 2004
Birds	AIV	Shed in faeces and from respiratory tract 2 weeks-30 days after recovery.	Webster et al., 1978
Birds	AIV	Recovered virus after 23 days at 4°C from wild bird carcasses (other than waterfowl).	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Birds	AIV	Recovered virus up to 7 days from game birds.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Birds	AIV	Cloacal shedding more than 30 days.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Birds	AIV	Virus not detected four weeks after infection.	Cardona (online, no date)
Birds	AIV	H7N2 virus not detected in most infected chickens after one week, but up to 31 days for one sample.	Lu et al., 2003
Birds	AIV	H7N2 infectivity in chorioallantoic fluid destroyed in less than 30 minutes at pH 2 or by heating at 56°C or by exposure to 70% ethanol.	Lu et al., 2003
Other Animals	AIV	Recovered virus several days post- infection in pig, ferrets and cats.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Dust/Fomites	AIV	Detected in poultry house 2 weeks post-depopulation.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Dust/Fomites	IV	Influenza A viruses survived 24-48 hours on hard, nonporous surfaces.	Bean et al., 1982
Dust/Fomites	IV	Influenza A viruses survived less than 8-12 hours on paper, cloth and tissues.	Bean et al., 1982
Dust/Fomites	IV	Influenza A viruses survived on hands up to 5 minutes after transfer from environmental surface.	Bean et al., 1982
Dust/Fomites	IV	Influenza can survive several weeks on dust, cotton sheets and glass slides at 22°C.	Sobsey and Meschke, 2003
Aerosols/Air	AIV	Longer survival in high relative humidity, low temperature conditions.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Aerosols/Air	AIV	Detected virus in air samples only to 45 metres downwind of infected flocks.	Animal Health Australia, Ausvetplan, 2005
Aerosols/Air	IV	Generally, viruses with lipids in outer coat are more stable at low relative humidity.	Sobsey and Meschke, 2003

¹ AIV: avian influenza virus IV: influenza virus General: multiple virus types

² Not for citation. Reader should refer to original reference for context and study limitations before using this information.

3 Projektrahmen

Das Gesamtvorhaben wurde anteilig durch das Bayerische Landesamt für Umwelt (LfU), das Bayerische Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) und das bifa Umweltinstitut (bifa) bearbeitet.

Im Rahmen des Vorhabens sollten Filter hergestellt werden, die mit Influenza-Viren dotiertem Feinstaub aus Hühnerkot beaufschlagt waren. Diese Filter sollten anschließend bei verschiedenen Umwelteinflüssen gelagert werden. Nach definierten Zeitpunkten sollte die Virusstabilität im Feinstaub überprüft werden. Hierzu sollte die Infektiosität der Viren über Bruteibeimpfung und Erfassung der virusbedingten Embryonalsterblichkeit, sowie die Nachweisbarkeit intakter Viruspartikel über Hämagglutination (HA) und der vorhandenen Virusgenomkopien mithilfe der quantitativen real time RT-qPCR geprüft werden. Diese Untersuchungsergebnisse sollten die angestrebten Ausbreitungsberechnungen unterstützen. Vorzugsweise sollte zudem versucht werden, Feinstaubfilter zu erzeugen, die Feinstaub mit Partikelgrößen < 1 µm, < 2,5 µm und < 10 µm enthalten, um zu prüfen, ob die Viren vor allem in einer bestimmten Partikelgrößenklasse zu finden sind.

Für die Erzeugung des Feinstaubes sollte realer Hühnerkot aus einem gewerblich betriebenen Hühnerstall herangezogen werden, der nach der Verarbeitung zu Feinstaub mit einer Virus-Suspension dotiert werden sollte.

4 Projektbearbeitung und -ergebnisse

4.1 Auswahl von Hühnerkot und Influenzaviren

4.1.1 Probenahme und Aufbereitung von Hühnerkot

Die Hühnerkotprobe wurde von einem Legehennenbetrieb bereitgestellt, der die Hennen in Volieren hält. Der Kot wird zu 90 % bei der Futteraufnahme abgegeben und über Kotbänder abtransportiert. Die Kenndaten des Hühnerkots zeigt Tab. 5.

Probe	610077-0061124-001
Feuchtsubstanz	8,24 kg
Trockensubstanz (TS)	2,39 kg
Wassergehalt	71 %
Wasserlöslicher Anteil der Trockensubstanz	51 %
pH-Wert im wässrigen Extrakt (10 g TS/l)	7,12

Tab. 5: Kenndaten Hühnerkot

Eine Teilprobe des Hühnerkots wurde ans LGL versandt, das den Kot auf Influenza-Viren sowie auf das Vorkommen pathogener Bakterien untersuchte. Die Untersuchung mit Real-Time-Multiplex-PCR ergab keinen Nachweis von aviären Influenza-A-Viren. Auch die bakteriologischen Untersuchungen erfassten nur typische Fäkalkeime wie E. coli, Enterococcus faecalis, Aerococcus viridans und Proteus mirabilis.

Für die weitere Bearbeitung wurde der Hühnerkot 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert, anschließend flach auf Aluminiumbleche ausgebracht und bei 70 °C getrocknet. Der getrocknete Kot wurde mit einer Schneidmühle auf Korngrößen < 0,5 mm gemahlen. Das Mahlgut wurde mit einem 0,063-mm-Sieb in zwei Teilfraktionen aufgetrennt:

- Grobfraction mit Korngrößen von $< 0,5$ mm und $> 0,063$ mm
- Feinfraction mit Korngrößen von $\leq 0,063$ mm

Von der Grob- und der Feinfraction wurde der wasserlösliche Anteil bestimmt. Bei einer Konzentration von 10 g TS/l lösten sich bei der Feinfraction 51 % und bei der Grobfraction 58 % der Trockensubstanz einwaage in dest. Wasser und waren durch eine Zentrifugation nicht mehr aus der Kotsuspension abtrennbar (vergl. hierzu auch Abschnitt 4.2.2).



Abb. 14: Löslicher und unlöslicher Hühnerkotanteil; links: Grobfraction; rechts: Feinfraction

Tab. 6: Fotodokumentation Hühnerkotaufbereitung

<p>Hühnerkot, frisch</p>	<p>Hühnerkot, autoklaviert und auf Alu-Folie getrocknet</p>
<p>Hühnerkot, Grobfraction $< 0,5$ mm und > 63 μm Korngrößen</p>	<p>Hühnerkot, Feinfraction < 63 μm Korngröße</p>

4.1.2 Herstellung von aviären Influenza-Virus-Suspensionen

Für das Untersuchungsprogramm wurde ein apathogener Stamm des AIV vom Subtyp H10N7 eingesetzt. Dieser Stamm wurde am LGL im Brutei vermehrt, über die Allantoisflüssigkeit geerntet und bis zur weiteren Verwendung mit Phosphat gepufferter Lösung bei -70 °C eingefroren.

Eine Überprüfung der Virussuspension durch das LGL ergab einen Hämagglutinationstiter von 1:2048 und einen Zellkulturtiter von 3×10^5 KID₅₀/ml in MDCK-Zellen (KID: Kultur-infektiöse Dosis). Zusätzlich wurde eine Verdünnung der Virussuspension durchgeführt und bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-7} wurden mithilfe der PCR positive Signale erhalten. Mit dem am bifa etablierten PCR-Nachweis für Influenza-A-Viren wurde im Projektverlauf eine Anzahl von $3,9 \times 10^8$ Virusgenomkopien pro Milliliter Virussuspension ermittelt. Für abschließende Untersuchungen wurde vom LGL eine zweite Influenza-Viren-Charge desselben Stammes hergestellt. Die Überprüfung der Virussuspension durch das LGL ergab ebenfalls einen Hämagglutinationstiter von 1:2048 und einen Zellkulturtiter von 3×10^5 KID₅₀/ml in MDCK-Zellen.

4.2 Entwicklung, Aufbau und Betrieb einer Aerosolkammer

4.2.1 Vorbemerkung

Die nachfolgenden Definitionen sind einem aktuellen Bericht der Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Immissionsschutz entnommen (LAI, 2006). Danach sind Partikel, Schwebstaub oder PM (Particulate Matter) ... Sammelbegriffe, die luftschwebende Teilchen beschreiben. Partikelbeladene Gase sind Mehrphasengemische und Aerosole, wobei das Gas die kontinuierliche Phase ist, in der die Partikel dispergiert sind. Nach Richtlinie VDI 2310 (VDI 1992) gehören alle festen und flüssigen Partikel, die in der Luft quasistabil und quasihomogen dispergiert sind und somit zumindest einige Zeit in der Schwebe verbleiben, zum Schwebstaub.

Partikel treten in der Atmosphäre als Aerosole, d. h. Suspensionen von fein verteilten festen oder flüssigen Teilchen auf. Häufig wird der Begriff Aerosol als Synonym für den Begriff Partikel verwendet. Aerosole sind mehrphasige Systeme von Luft oder anderen Gasen und darin dispers verteilten Feststoffen oder Flüssigkeiten, wobei das Partikel mehr mit einem Feststoff assoziiert wird. Partikel können aus einem unlöslichen und einem löslichen Anteil bestehen.

Für die toxikologische Bewertung sind heutzutage folgende Partikelfractionen von Bedeutung:

Schwebstaub (Total Suspended Particles, TSP): Der Schwebstaub ist die Aerosolkomponente der in der Luft vorhandenen Partikel bis zu einem oberen aerodynamischen Durchmesser von 30 µm.

PM₁₀: Der thorakale Schwebstaub (Thoracic Particles, PM₁₀) umfasst Partikel, die einen in der ISO 7708 definierten größenselektierenden Lufteinlass passieren, der für einen aerodynamischen Durchmesser von 10 µm eine Abscheidewirksamkeit von 50 % aufweist.

PM_{2,5}: Der alveolengängige Schwebstaub (Respirable Particles, PM_{2,5}) umfasst Partikel, die einen in der ISO 7708 definierten größenselektierenden Lufteinlass passieren, der für einen aerodynamischen Durchmesser von 2,5 µm eine Abscheidewirksamkeit von 50 % aufweist. Er wird auch als Feinstaub bezeichnet. Der alveolengängige Staub besitzt zwei Depositionsmaxima:

1. Depositionsmaximum bei einem Durchmesser von 2-4 µm (Feinstaubbereich)
2. Depositionsmaximum bei einem Durchmesser von 30-50 nm (Ultrafeinstaubbereich)

Im deutschen Sprachraum wird der Begriff „Feinstaub“ hiervon abweichend aus historischen Gründen oftmals für alle Korngrößen < PM₁₀ verwendet. Dieser Definition entsprechend wurden im aktuellen Vorhaben „Feinstäube“ aus Hühnerkot hergestellt, die Partikel der Größenklassen PM₁₀ und kleiner enthielten.

„Grobe“ Partikel (Coarse Particles): Als "grobe" Partikelfraktion ("coarse particles" / „coarse mode“) wird im Gegensatz zur Fraktion der „feinen“ Partikel („fine mode“ / $PM_{2,5}$) die Fraktion PM_{10} - $PM_{2,5}$ bezeichnet. Größere Partikel tragen relativ stärker zur Partikelmassenkonzentration bei. Im deutschen Sprachraum wird der Begriff „Grobstaub“ hiervon abweichend aus historischen Gründen oftmals für alle Korngrößen $> PM_{10}$ verwendet.

Ultrafeine Partikel (UF): Als "ultrafeine Partikel" werden im Allgemeinen solche mit einem aerodynamischen Durchmesser ≤ 100 nm bezeichnet. Ultrafeine Partikel befinden sich nicht lange in der Atmosphäre, da sie koagulieren oder kondensieren. Sie sind bis zu einem bestimmten Grad immer anwesend, da sie durch Verbrennungsprozesse entstehen. Feine und ultrafeine Partikel werden hauptsächlich durch Emissionen aus Verbrennungsprozessen freigesetzt. Aufgrund des geringen Beitrags von ultrafeinen Partikeln zur Partikelmassenkonzentration bei gleichzeitig großer Anzahl und Gesamtoberfläche kann ihre Konzentration treffender als Partikelzahl pro Volumen wiedergegeben werden.

Schwebstaub enthält auch diverse Bestandteile mit biologischem Ursprung (vgl. Abb. 15), von denen Viren, Zellfragmente, Bakterien und Pilzsporen zur lungengängigen Feinstaubfraktion zu zählen sind, wenn diese in freier Form im Aerosol vorkommen. Sehr häufig sind die Bioaerosolbestandteile jedoch mit sonstigen Aerosolbestandteilen vermischt (Bodenpartikel, Hautschuppen, ...), sodass es größere Aggregate sind, die leichter aus der Luft abgeschieden werden können und die eine schlechtere Lungengängigkeit haben als frei schwebende Viren, Bakterien und Pilzsporen.

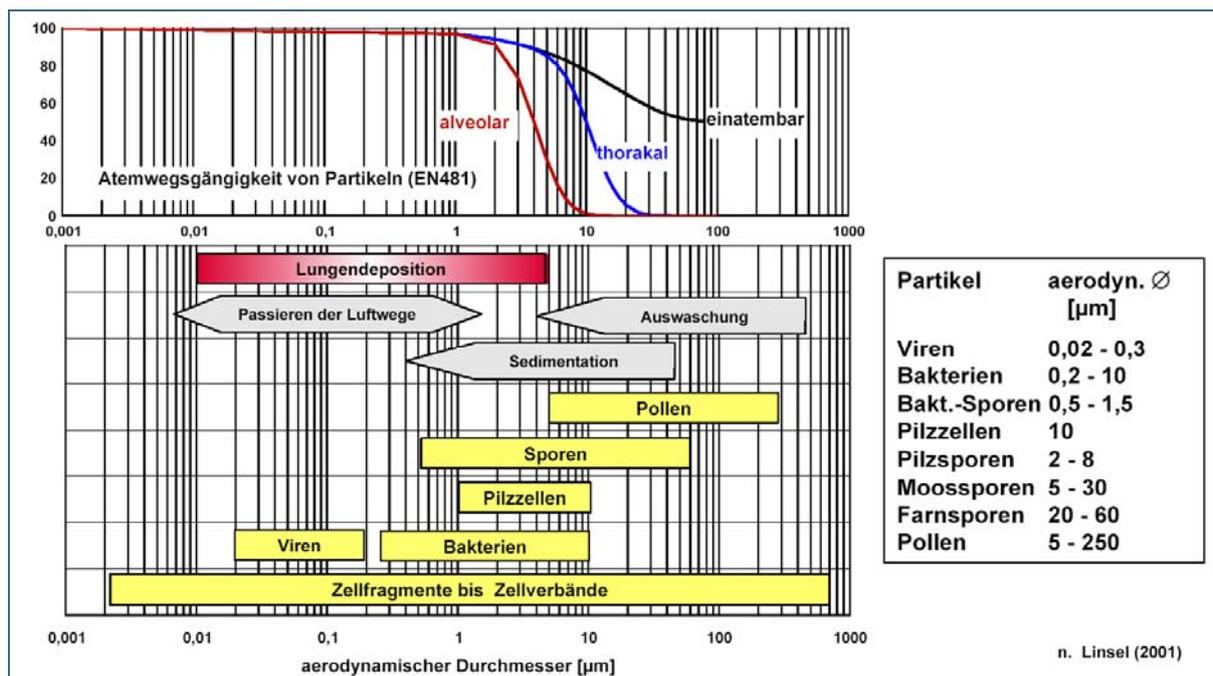


Abb. 15: Schematische Gegenüberstellung der Atemwegsgängigkeit von unterschiedlich großen Partikeln und den typischen Größenbereichen wichtiger Bioaerosolbestandteile (n. Linsel, 2001; verändert)

Welche Bestandteile der Staub aus Geflügelställen im Detail besitzt, ist bislang unbekannt. Abb. 8 lässt jedoch erwarten, dass es sich bei den Schwebstaubkomponenten in erster Linie um Abrieb von getrocknetem Kot, um Hautschuppen und Abrieb der Hühnerfedern sowie um Abrieb des Futters und des Einstreus handelt. Hinzu können Partikel kommen, die aus Tröpfchen von Sekreten aus dem Atemtrakt der Vögel hervorgegangen sind. Diese Komponenten bereichern die Partikelfracht an, die über die Zuluft in den Geflügelstall gelangt ist und diesen über den Luftpfad wieder verlässt.

Influenza-erkrankte Tiere werden Viren überwiegend über den Kot und z. T. über die Atemluft an die Umgebung abgeben. Während ausgeatmete Viren und virenhaltige Sekrete unmittelbar in die Luft gelangen und dort in komplexer Form mit anderen Partikeln wechselwirken können, müssen die im Kot vorhandenen Viren zunächst in die Luft transferiert werden.

Aufgrund der Konsistenz von frischem Hühnerkot kann angenommen werden, dass erst nach einer weitgehenden Abtrocknung des Kots ein größerer Anteil des Kots in partikulärer Form in die Luftphase gelangt, wenn z. B. die Hühner beim Scharren mechanisch auf den Kot einwirken.

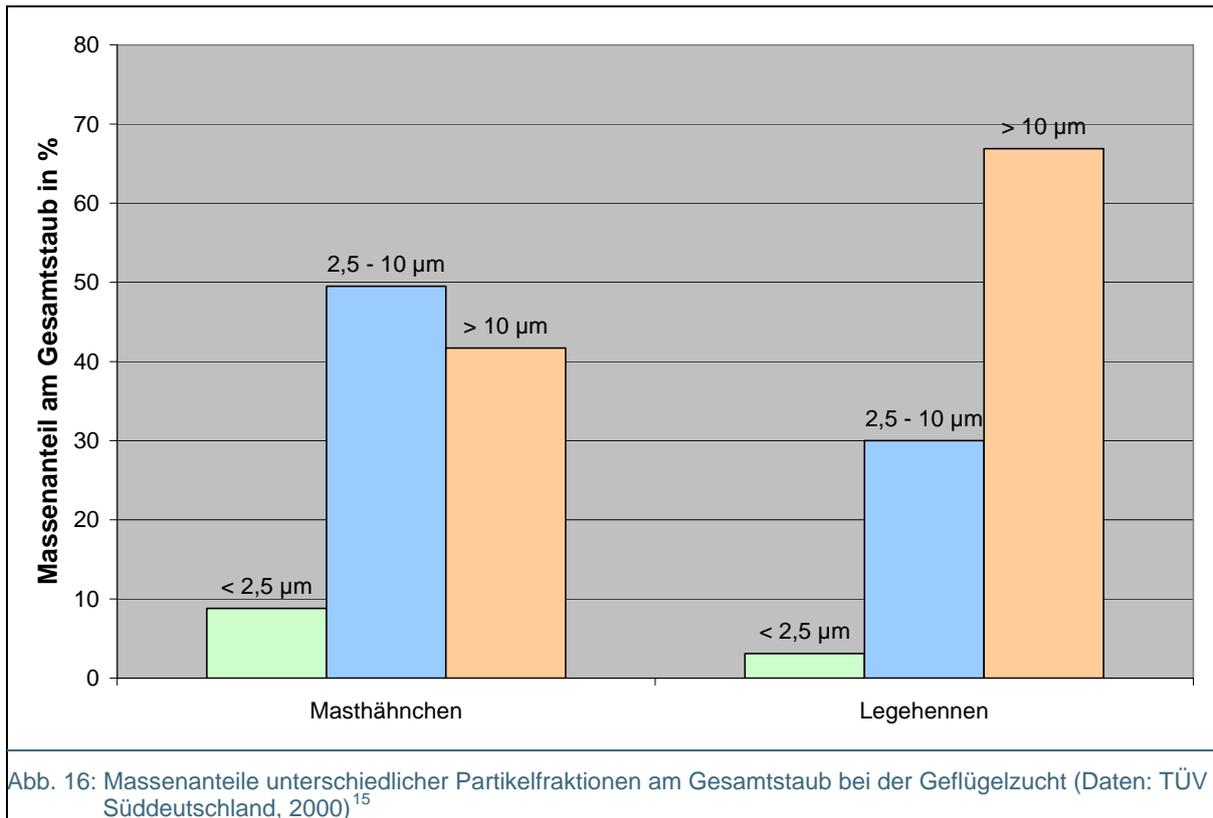
Bei dem im Rahmen des Projekts verwendeten Kot war der Hauptbestandteil Wasser (71 %); 14,8 % waren wasserlösliche, nicht bei einer Beschleunigung von 4.000 g sedimentierbare Komponenten (z. B. lösliche Salze, Zucker, Eiweiße, etc.) und 14,2 % waren nicht wasserlösliche, partikuläre Komponenten. Durch die Darmtätigkeit wird der Kot gut durchmischt, sodass abgeschilferte Darmepithelzellen und freigesetzte Viren homogen im Kot verteilt sein sollten, wenn dieser ausgeschieden wird.

Auch wenn im Kot bis zu 10^9 Viren/Gramm vorhanden sein würden, trügen diese nur zu einem Millionstel zur Masse des Kots bei, wenn für ein Influenza-Virus-Partikel die Masse von einem Femtogramm angenommen wird. Auch 10^{10} Bakterien würden nur eine Masse von rund 10 Milligramm zum Gewicht von einem Gramm Kot beitragen.

Dementsprechend ist die Annahme berechtigt, dass die Viren und Bakterien im frischen und auch getrockneten Kot weitgehend homogen verteilt sind und im Trockenkot als „Spurenbestandteil“ in einer Matrix aus ausgefällten Kotbestandteilen vorliegen.

Wenn nun mechanische Kräfte auf diesen Kot einwirken, können unterschiedlich große Partikel entstehen, die bezogen auf dieselbe Masse an Partikeln eine vergleichbar hohe Viruskonzentration haben sollten. Erst wenn die betrachteten Partikelgrößen den Bereich der Virusgröße unterschreiten, würde man Partikelfractionen erhalten, die keine Viren mehr enthalten. Die Daten aus Abb. 16 legen jedoch nahe, dass nur ein kleiner Massenanteil des Feinstaubs in der Abluft von Geflügelställen durch Partikel mit einem Durchmesser von unter $2,5 \mu\text{m}$ hervorgerufen wird.

Dieser Modellvorstellung entsprechend sollten $\text{PM}_{1,0^-}$, $\text{PM}_{2,5^-}$ und PM_{10} -Feinstäube, die aus Virus-kontaminierten Trockenkot generiert wurden, eine weitgehend vergleichbare Viruskonzentration pro Gramm Feinstaub haben.



Zum Feinstaub der Abluft von Geflügelhaltungen können jedoch noch Partikel beitragen, die nicht aus dem Kot, sondern aus Sekreten des Atemtraktes generiert wurden. Beim Durchtrocknen der Sekretropfen entstehen überwiegend feinste Partikel, sodass hierdurch Partikelfractionen mit kleinerer Partikelgröße erhöhte Virenkonzentrationen bezogen auf die gleiche Masse an Partikeln haben könnten.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden jedoch ausschließlich Partikel betrachtet, die aus Hühnerkot generiert wurden. Zur Prüfung der Virustabilität wurde zusätzlich noch eine mit Phosphat gepufferte Saline untersucht.

4.2.2 Entwicklung und Aufbau der Aerosolkammer

Das ursprüngliche Grundkonzept für die zu entwickelnde Aerosolkammer zeigt Abb. 17. Der Ansatz sah vor, dass in eine Kammer ein Viren-Kot-Aerosol eingeblasen werden sollte, das bei Bedarf mit filterter, partikelarmer Druckluft (DL) verdünnt werden könnte. Der getrocknete und gemahlene Kot (s. 4.1.1) sollte über einen Trockendispergierer zu Feinstaub verarbeitet werden. Die Viren sollten aus einer Flüssigkeit heraus in ein Aerosol überführt und über eine Trockenstrecke geleitet werden. In der Aerosolkammer sollten die Zuströme vermischt werden, sodass ein homogenes Aerosol entsteht, das dann mit dem unter 4.2.2.1 beschriebenen Feinstaubsammler beprobt werden sollte. Die überschüssige Aerosolmenge sollte über einen Sterilfilter abgeleitet und über eine weitere Stichleitung beprobt werden. Für den gesamten Aufbau war zur Vermeidung einer Kontamination eine Desinfektion mittels Desinfektionsmittel und/oder Hitze vorgesehen.

¹⁵ Gesamtstaubgehalte waren beim Masthähnchen 6,2 mg/m³ und bei Legehennen 3,1 mg/m³

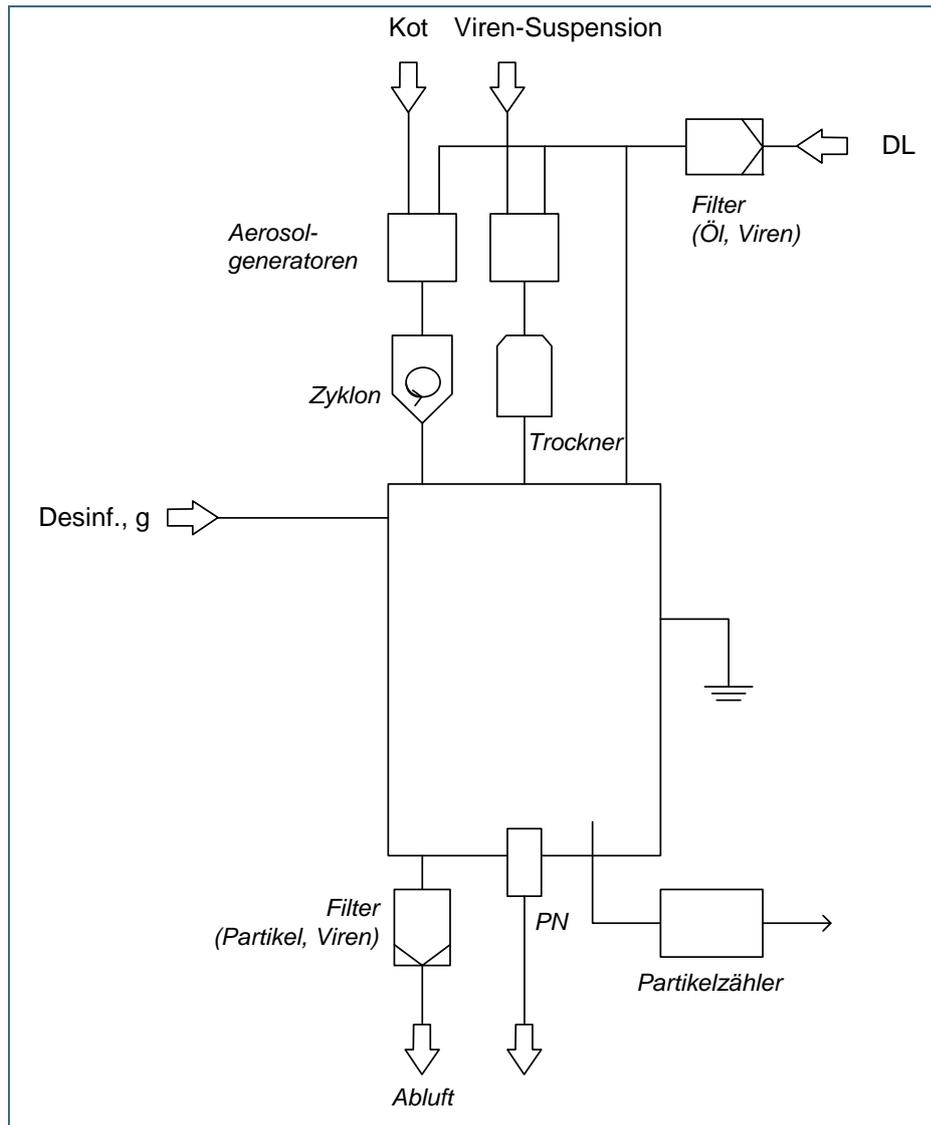


Abb. 17: Ursprüngliches Grundkonzept für die Aerosolkammer

Die Detailplanungen zeigten dann aber, dass dieses Grundkonzept nicht praktikabel und nur mit unverhältnismäßig hohem Aufwand realisierbar gewesen wäre: Die kleinsten kommerziell verfügbaren Feststoffaerosolgeneratoren produzieren viel zu hohe Feinstaubmengen und -konzentrationen (s. 4.2.2.3). Um die Feinstaubkonzentration messtechnisch erfassen zu können und um praktikable Probenahmezeiten für die Feinstaubfilterbeaufschlagung von einigen Minuten realisieren zu können, hätte der erzeugte Feinstaub mit großen Luftvolumina verdünnt werden müssen. Für die Virusdotierung dieses Staubs wären zudem sehr große Mengen an Virusmaterial notwendig geworden. Von dem dann erzeugten Aerosol wären aber nur sehr geringe Anteile für die Herstellung der Feinstaubfilter nutzbar gewesen, sodass mehr als 99 % des erzeugten Aerosolvolumens als Abgas zu entsorgen gewesen wären. Die Erfahrungen aus den nachfolgend beschriebenen Voruntersuchungen zeigten aber einen Weg auf, das Grundkonzept der Aerosolkammer bedarfsgerecht zu vereinfachen.

4.2.2.1 Feinstaubprobenahme

Ein Teilziel des Vorhabens war es, für die in der Luftgüteüberwachung üblicherweise eingesetzten Feinstaubfilter einen PCR-basierten Nachweis von Influenza-A-Viren zu realisieren (s. 4.4). Zu diesem Zweck stellte das BayLfU den in Abb. 18 dargestellten Low Volume Sampler LVS3 (Hersteller: Ingenieurbüro Norbert Derenda, Berlin) bereit.

Bei diesem Sammler können im Probenahmekopf unterschiedliche Impaktordüsen eingesetzt werden, die aus dem Luftstrom Partikel mit unerwünschter Größe abtrennen. Die dann die gewünschte Partikelfraktion ($PM_{1,0}$, $PM_{2,5}$ oder PM_{10}) enthaltende Luft wird anschließend über einen Quarzfaser-Tiefenfilter des Typs QF050-25 (Pieper Filter GmbH; Bad Zwischenahn) geführt, auf dem die Partikel abgeschieden werden.

Bei diesem Sammlertyp wird die Luft mit $2,3 \text{ m}^3/\text{h}$ angesaugt und der Filter bei einer abgeschiedenen Staubmasse von etwa $5 \text{ mg}/\text{Filter}$ maximal beladen. Unter Berücksichtigung der in Abb. 16 dargestellten Massenanteile des Gesamtstaubs der realen Abluft der Geflügelställe würde je nach Partikelfraktion erst nach einigen Stunden Betriebszeit die maximale Belegung der Filter erreicht sein.



LVS3-Sammler

Impaktordüse

Quarzfaserfilter

Abb. 18: Feinstaubsammlergerät LVS3

Die ursprüngliche Konzeption sah vor, den Probenahmekopf des Sammlers in die Aerosolkammer zu integrieren. Der untere Teil des Sammlers, in dem sich die Aufnahme für den Quarzfaserfilter befindet, sollte außerhalb der Aerosolkammer bleiben, damit ein Filterwechsel außerhalb der Aerosolkammer möglich wäre. Diese Überlegungen führten zum letztlich realisierten Ansatz: Die Impaktoren wurden in eine neu angefertigte Impaktoraufnahme eingesetzt. Diese Impaktionsstufe sollte die Partikel unerwünschter Partikelgröße aus dem Luftstrom abtrennen, sodass die Abluft der Impaktionsstufe nur noch die Partikel mit erwünschter Partikelgröße enthalten hätte. Wie im weiteren Text noch erklärt, wurde letztlich ein geänderter Versuchsaufbau verwendet. Für die Quarzfaserfilter wurden sterilisierbare Polycarbonat-Filterhalter (PALL, PN 1119) beschafft, die räumlich von der Impaktionsstufe getrennt an die Apparatur montiert werden konnten. Die Pumpeneinheit des Feinstaubsammlergerätes kam zum Einsatz, um die feinstaubhaltige Luft durch die Polycarbonat-Filterhalter zu saugen, in die die Quarzfaserfilter eingelegt wurden. Da der Filterwiderstand der zu verwendenden Quarzfaserfilter bereits bei Auflagen von wenigen Milligramm Feinstaub stark ansteigt, können nur wenige Milligramm Feinstaub auf den Filtern abgeschieden werden. Diese Randbedingung musste bei der Konzeption des Untersuchungsablaufs berücksichtigt werden, da die Virenanzahl im abgeschiedenen Feinstaub ein nachweisbares Niveau erreichen musste.

4.2.2.2 Notwendige Virenanzahl im Hühnerkot

Da für die Untersuchungen unter standardisierten Bedingungen kein Hühnerkot von Influenza-erkrankten Tieren einsetzbar war, musste Virus-freier Hühnerkot mit den zu prüfenden Viren dotiert werden. Die Höhe der Virusdotierung musste so gewählt werden, dass trotz geringer Feinstaubmengen von wenigen Milligramm pro Filter noch eine sichere Nachweisbarkeit möglich war.

Für die effiziente Virusextraktion aus den Feinstaubfiltern mussten mindestens 3 ml Extraktionsmedium eingesetzt werden. Bei dem am bifa eingesetzten System zur Extraktion der Virus-RNA kamen 400 µl Filterextrakt zum Einsatz, die abschließend zu 50 µl Virus-RNA-Extrakt führten. Von diesem Extrakt wurden 10 µl im PCR-Ansatz eingesetzt. Letztlich gelangten damit nur $(10/50) \times (400/3000) = 2,6 \%$ der auf dem Filter vorhandenen Virus-RNA in den PCR-Ansatz. Für den sicheren PCR-Nachweis der Influenza-Virus-RNA sind nach Herstellerangaben 100 Kopien der Ziel-RNA pro Testansatz ausreichend¹⁶. Dementsprechend müssten auf den zu untersuchenden Filtern mindestens 4.000 Virusgenomkopien vorliegen, damit bei dem geschilderten Untersuchungsgang ein sicherer Nachweis gelingt. Nimmt man an, dass maximal 5 mg Feinstaub auf den Filtern abgeschieden werden können, müsste der Feinstaub somit mindestens $(4.000 \text{ Virusgenome} / 5 \text{ mg Staub}) = 8 \times 10^5$ Virusgenome pro Gramm enthalten. Da bei jedem Bearbeitungsschritt mit Virusverlusten gerechnet werden muss und bei den Untersuchungen ein hinreichend großer Abstand zur Nachweisgrenze eingehalten werden sollte, wurden die in Tab. 7 aufgeführten Virusgenomanzahlen für die Untersuchungen gewählt. Diese Zahl an Virusgenomkopien lag um Faktor 39 bis 194 über der oben theoretisch abgeschätzten Nachweisgrenze.

Tab. 7: Gewählte Arbeitsbereiche für die Virusgenomanzahlen im geprüften Hühnerkot

	Einheit	Minimum	Maximum
Koteinwaage	g TS/l	50	50
Einwaage Virussuspension	ml/l	4	20
Virusgenomanzahl	1/l	$1,56 \times 10^9$	$7,8 \times 10^9$
Virusgenomanzahl pro g Kot	1/g TS	$3,1 \times 10^7$	$1,56 \times 10^8$
Virusgenomanzahl in 5 mg Kotstaub	1/(5 mg TS)	$1,56 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$

4.2.2.3 Aerosolgeneratoren

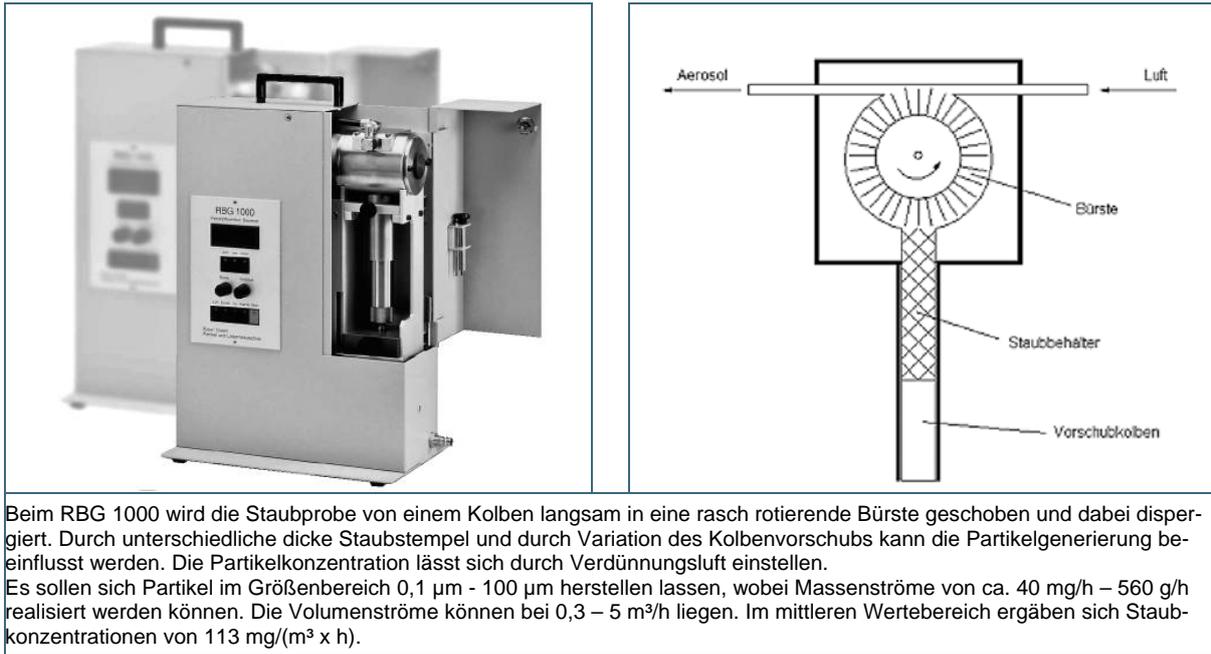
4.2.2.3.1. Erprobung des Trockendispergiereis RBG 1000

Der Trockendispergiereis RBG 1000 der Palas GmbH aus Karlsruhe ist in der Lage, Feststoffaerosole über eine weite Bandbreite von Partikelgrößen und Partikelkonzentrationen herzustellen. Da der Hersteller nicht beurteilen konnte, ob das Gerät auch Hühnerkot verarbeiten kann, erklärte sich die Palas GmbH bereit, den Dispergiereis zu erproben. Hierzu wurde eine kleine Teilprobe der Hühnerkot-Feinfraktion an die Palas GmbH weitergeleitet. Das Funktionsprinzip des RBG 1000 zeigt Abb. 19.

Der Hühnerkot wurde in den Staubbehälter mit dem Durchmesser 7 mm eingebracht und mit einem Vorschub von 5 mm/h dosiert. Bei einer angenommenen Stopfdichte¹⁷ von 1 g/cm^3 würde so ein Massenstrom von 190 mg/h dosiert werden. Bei Verwendung eines speziellen Feststoffbehälters mit dem Durchmesser von 5 mm würde sich nach Einschätzung des Herstellers auch ein Massenstrom von ca. 50 mg/h realisieren lassen. Hierbei zeigte sich, dass der Hühnerkot leicht zu handhaben war und der Dispergiereis problemlos funktionierte.

¹⁶ Angabe aus dem TaqMan® Influenza A/H5 Detection Kit Version 1.0

¹⁷ Palas nimmt an, dass der Hühnerkot eine geringere Stopfdichte hatte, konnte dies aber nicht bestimmen



Beim RBG 1000 wird die Staubprobe von einem Kolben langsam in eine rasch rotierende Bürste geschoben und dabei dispergiert. Durch unterschiedliche dicke Staubstempel und durch Variation des Kolbenvorschubs kann die Partikelgenerierung beeinflusst werden. Die Partikelkonzentration lässt sich durch Verdünnungsluft einstellen.

Es sollen sich Partikel im Größenbereich $0,1 \mu\text{m}$ - $100 \mu\text{m}$ herstellen lassen, wobei Massenströme von ca. 40 mg/h – 560 g/h realisiert werden können. Die Volumenströme können bei $0,3$ – $5 \text{ m}^3/\text{h}$ liegen. Im mittleren Wertebereich ergäben sich Staubkonzentrationen von $113 \text{ mg}/(\text{m}^3 \times \text{h})$.

Abb. 19: Trockendispergierer RBG 1000 (Palas GmbH)

Palas führte zudem noch eine Korngrößenanalyse des dispergierten Hühnerkots mit dem Spektrometer welas 1100 durch. Der dispergierte Hühnerkot wurde mit den drei Messbereichen (grün: $0,19$ - $7 \mu\text{m}$; rot: $0,25$ - $17 \mu\text{m}$; blau: $0,6$ - $45 \mu\text{m}$) vermessen. Die blaue Kurve der Partikelvolumenverteilung zeigt, dass der d_{50} -Wert der Volumenverteilung bei ca. $20 \mu\text{m}$ liegt und das dispergierte Korngrößenspektrum oberhalb von $45 \mu\text{m}$ weitergeht. Dies deckt sich mit der Siebung des Kots auf $\leq 63 \mu\text{m}$. Insgesamt hatte die Feinfraktion des Kots aber einen recht hohen PM_{10} -Anteil, sodass es auf diesem Weg realisierbar erschien, entsprechenden Feinstaub aus Hühnerkot herzustellen. Die Partikelgrößenverteilung macht deutlich, dass der gemahlene und gesiebte Hühnerkot einen hohen Feinanteil mit Partikeln kleiner $1 \mu\text{m}$ aufwies.

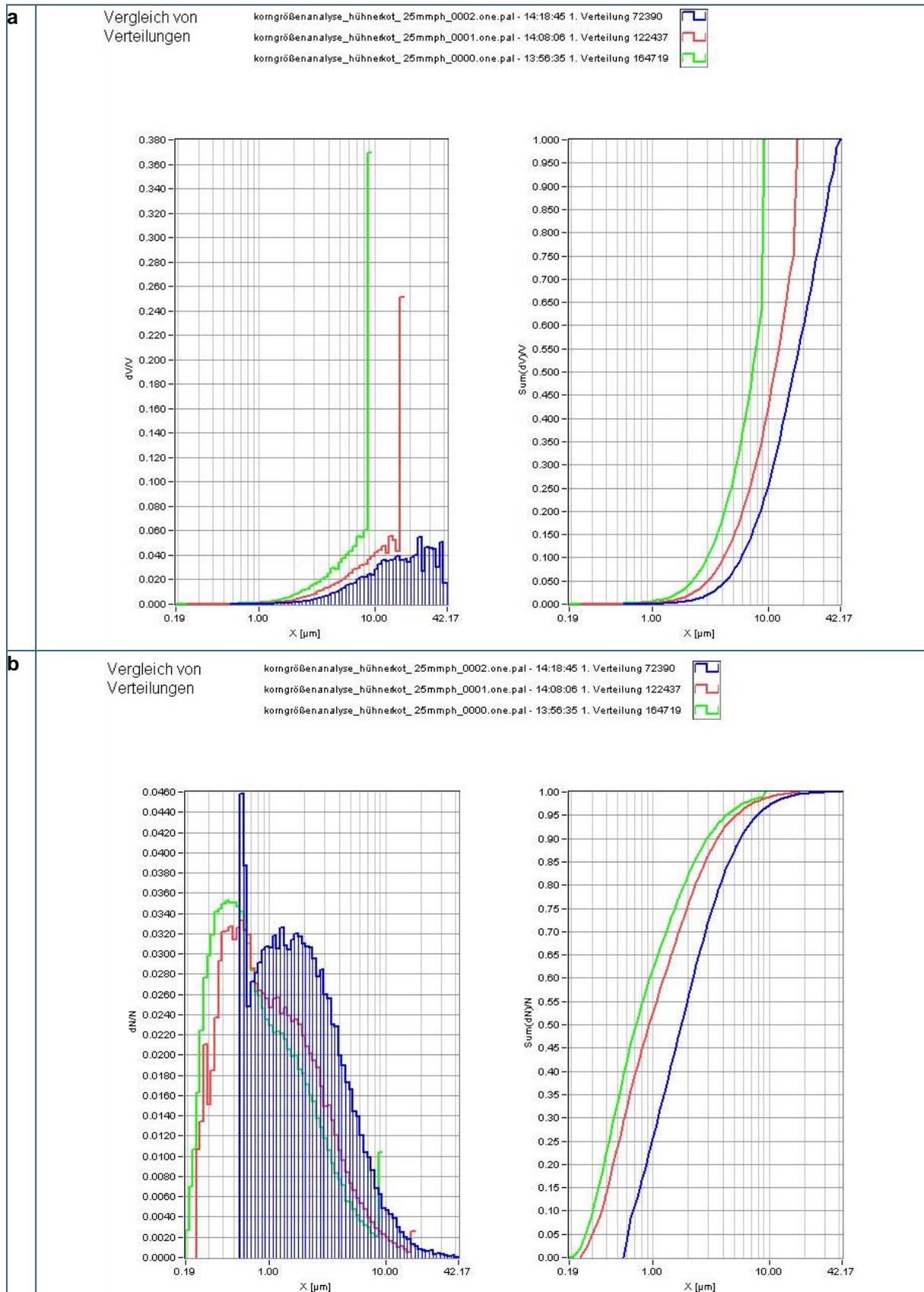


Abb. 20: Vergleich der (a) Partikelvolumen- (dV/V) und der (b) Partikelanzahlverteilungen (dN/N) nach Dispergierung der Feinfraktion des getrockneten Hühnerkots mit dem RBG 1000, Vorversuch 1
 Messbereiche: grün: 0,19 - 7 μm ; rot: 0,25 - 17 μm ; blau: 0,6 - 45 μm

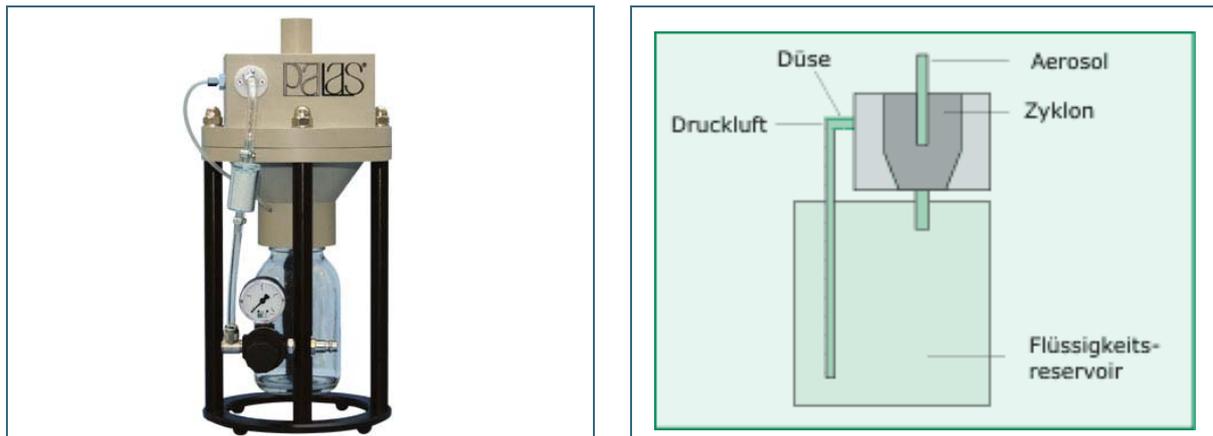
Allerdings wären mit der Verwendung des Trockendispergierers mehrere Nachteile verbunden gewesen:

- Es könnten nur relativ große Massenströme (ca. 150 – 190 mg/h) erzeugt werden.
- Der größte Teil der erzeugten Partikel war $> 10 \mu\text{m}$ und hätte vor dem Kontakt mit den Viren in Vorabscheidern abgetrennt werden müssen.
- Der entscheidende Nachteil dieses Gerätes war die Notwendigkeit, die Viren mithilfe eines zusätzlichen Aerosols dosieren zu müssen. Die beiden Aerosolströme hätten in der Aerosolkammer homogen gemischt werden müssen.
- Die Viren würden auf der Kotpartikeloberfläche anhaften. Dies wäre ein Unterschied zur natürlichen Feinstaubbildung gewesen, bei der die meisten Viren in Kotpartikeln eingeschlossen sein sollten.

Deshalb wurde der RBG 1000 nicht als Aerosolgenerator ausgewählt.

4.2.2.3.2. Erprobung des Aerosolgenerators AGK 2000

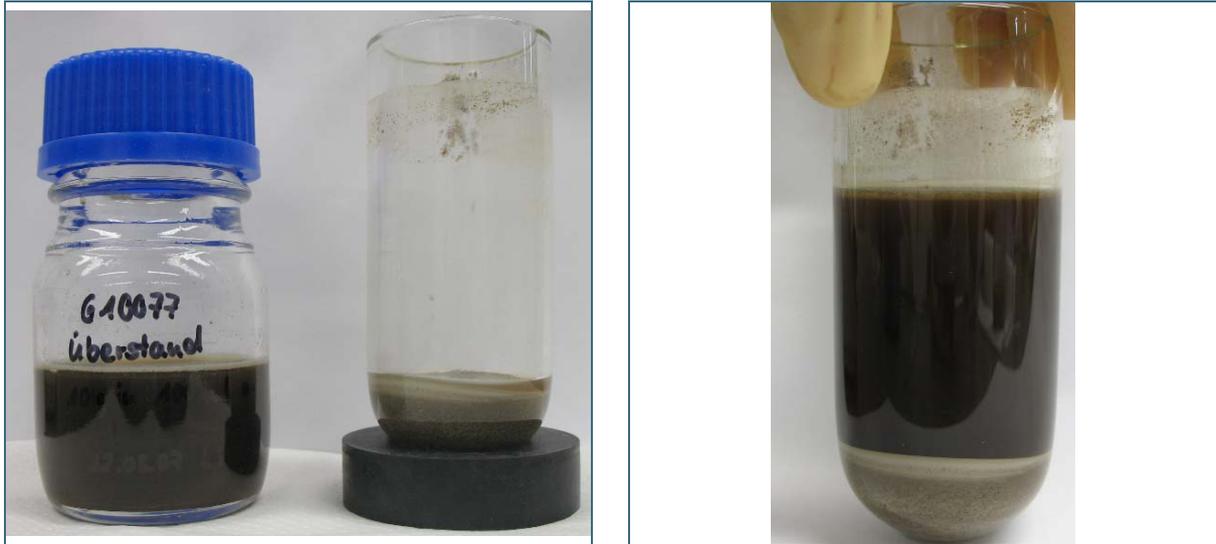
Der Aerosolgenerator AGK 2000 der Palas GmbH aus Karlsruhe ist in der Lage auch aus feststoffhaltigen Suspensionen ein Aerosol zu erzeugen, wobei ein Zyklon dafür sorgt, dass große Partikel ($> 15 \mu\text{m}$) im Vorratsgefäß zurückgehalten werden.



Der Aerosolgenerator erzeugt das Aerosol mit einer vom Hersteller speziell entwickelten Zweistoffdüse, die auch bei der Vernebelung von z. B. Salzlösungen nicht verstopft. Das erzeugte Aerosol wird zur Abscheidung der großen Tröpfchen direkt in einen Zyklon geleitet. Das Partikelgrößenspektrum soll bis zu $15 \mu\text{m}$ große Partikel ermöglichen, wobei Partikelanzahlen von bis zu $10^7/\text{cm}^3$ erzeugt werden können. Der Luftvolumenstrom liegt bei 0,18 bis $0,6 \text{ m}^3/\text{h}$.

Abb. 21: Aerosolgenerator AGK 2000 (Palas GmbH)

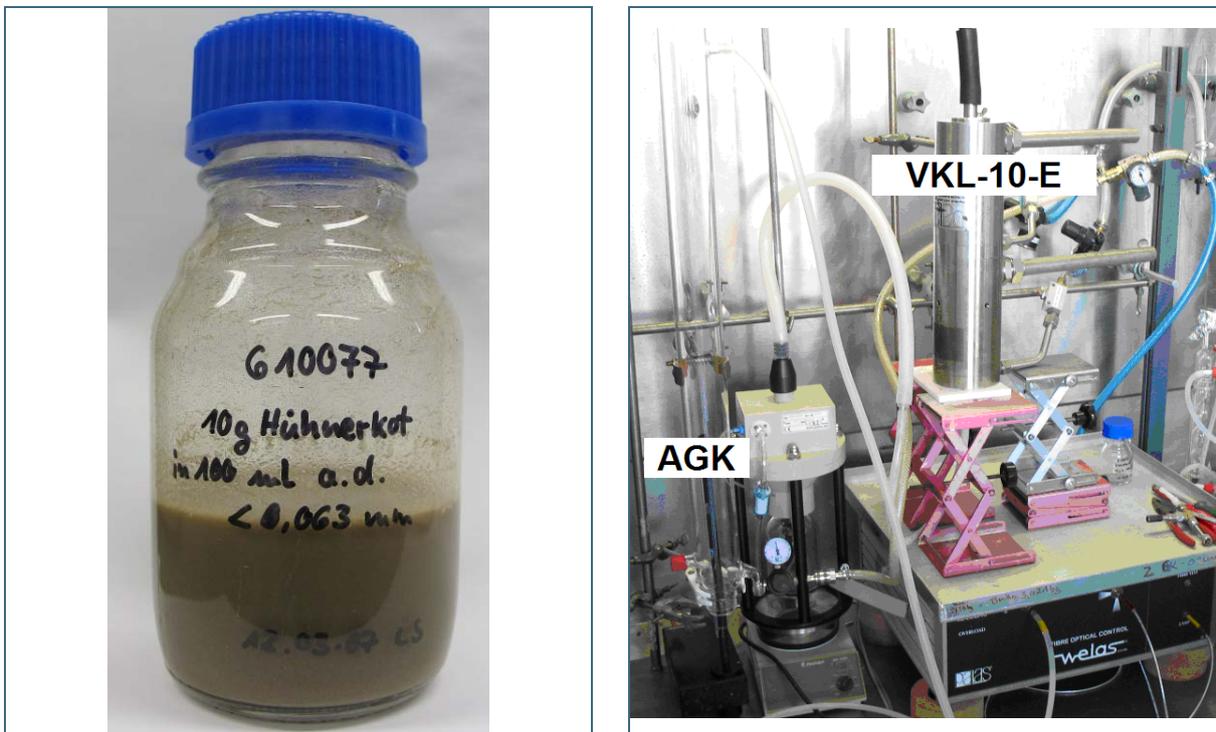
Ursprünglich war beabsichtigt, mit diesem Gerät aus der Virenlösung ein Aerosol zu erzeugen. Dazu wurde zunächst geprüft, ob sich mit dem Gerät aus dem wasserlöslichen Anteil des Hühnerkots ein Aerosol erzeugen lässt. Hierzu wurden unterschiedliche Einwaagen des getrockneten Kots in dest. Wasser suspendiert und durch Zentrifugation bei $4.000 \times g$ für 15 min. die ungelöste Partikelfraktion abgetrennt.



Einwaage von 100 g/l Grobfraction des Hühnerkots und Zentrifugation bei 4.000 x g für 15 Minuten. Nutzung des Überstands im Aerosolgenerator AGK 2000

Abb. 22: Zentrifugierte, partikelarme Kotsuspension für den Vorversuch 2

Bei den Versuchen zeigte sich, dass der Aerosolgenerator auch mit Resten an ungelösten Partikeln gut funktionierte, sodass versucht wurde, mit dem Gerät auch direkt aus der partikelhaltigen Kotsuspension ein Aerosol zu erzeugen.



Einwaage von 100 g/l Feinfraktion des Hühnerkots und unmittelbare Nutzung der Suspension im Aerosolgenerator AGK 2000

Abb. 23: Kotsuspension für den Vorversuch 3 sowie Foto des Versuchsaufbaus (VKL-10-E: Ejektorverdünner)

Die Aerosole wurden mithilfe des Flüssigerstäubers AGK 2000 erzeugt. Der Betrieb erfolgte mit Druckluft (Entnahmedruck: 4,5 bar). Der Vordruck der Druckluft am Aerosolgenerator wurde bei den Vorversuchen auf 2,0 bar eingestellt, wodurch ein Volumenstrom von etwa 6 l/min erzielt wird.

In Abb. 24 ist eine typische Partikelvolumenverteilung für die beschriebenen Versuchsbedingungen dargestellt, wobei zunächst eine KCl-Lösung zum Einsatz kam. Das erzeugte Aerosol enthielt sehr hohe Partikelanzahlen, sodass für die Partikelzahlanalyse eine Verdünnung des Aerosols notwendig war. Dazu kamen zwei Ejektorverdünner VKL-10-E der Firma Palas im Kaskadenbetrieb zum Einsatz. Dadurch wurde ein Verdünnungsfaktor von 100 erreicht. Das so verdünnte Aerosol (Volumenstrom: 3 l/min) wurde in ein Glasrohr (Durchmesser ca. 6,5 cm, Länge 150 cm) geleitet, wo es nochmals mit Verdünnungsluft (Volumenstrom: 12 l/min) gemischt wurde, wodurch letztendlich ein Verdünnungsfaktor von 500 resultierte. Zur Partikeldetektion kam ein Aerosolspektrometer welas 2200 (Sensortyp: 2200 – maximale Partikelkonzentration: $10^4/\text{cm}^3$) der Firma Palas GmbH zum Einsatz. Die Entnahme des Aerosols erfolgte im Inneren des Glasrohres annähernd isokinetisch, 30 cm vor dem offenen Ende des Mischungsrohres. Es wurden Intervallmessungen durchgeführt mit einer Messdauer pro Intervall von 30 Sekunden über einen Zeitraum von mindestens 1 Stunde.

In 3 Versuchen wurden die Einsatzmöglichkeiten des AGK-2000 eruiert. Im 1. Versuch wurde ein Betrieb ausschließlich mit Druckluft durchgeführt, um den Partikelgehalt der eingesetzten Druckluft zu untersuchen. Im 2. Versuch wurde der Aerosolgenerator 3 Stunden mit dem Überstand der abzentrifugierten Suspension von Hühnerkot in Wasser (vergl. Abb. 22) betrieben. Im 3. Versuch wurde der Generator direkt mit dem suspendierten Hühnerkot (vergl. Abb. 23) betrieben.

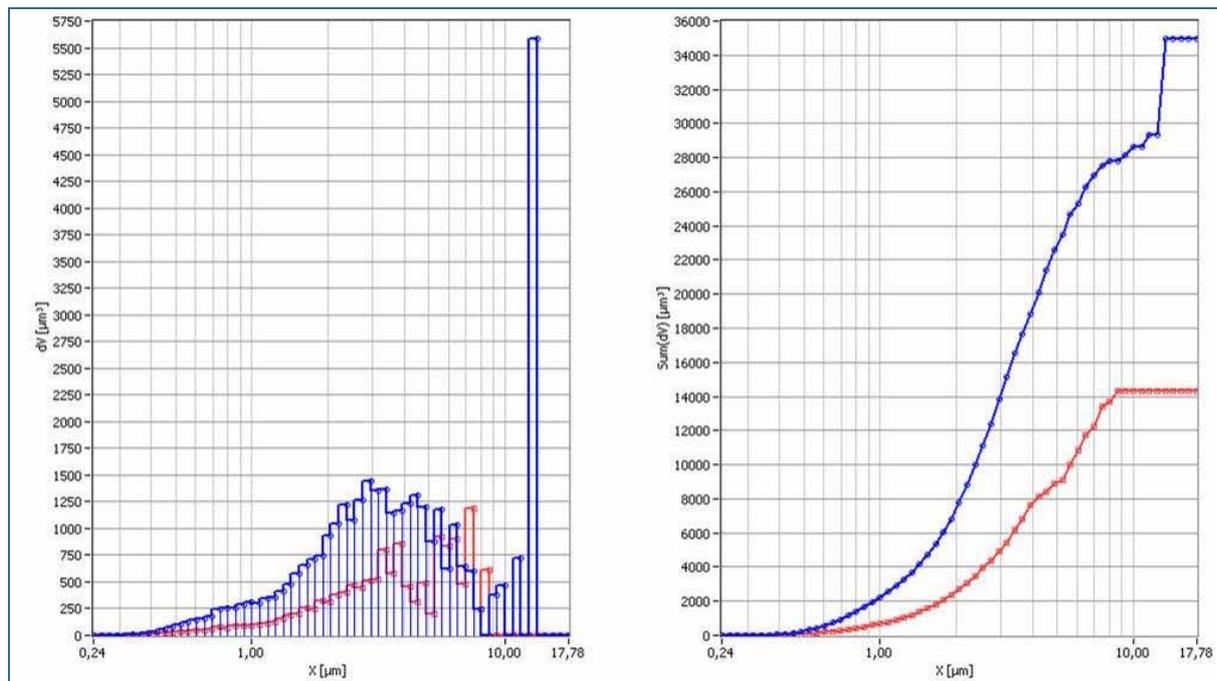


Abb. 24: Typische Partikelvolumenverteilung (dV) bei Einsatz einer KCl-Lösung und bei unterschiedlichen Betriebsbedingungen

Die Häufigkeitsverteilung der Partikelvolumina wies im Größenbereich von 3-4 μm ein Maximum auf und reichte vom unteren Messbereich bis über 10 μm hinaus.

Der Versuch 1 zeigte, dass die eingesetzte Druckluft als partikelfrei angesehen werden kann.

Beim Versuch 2 (Aerosolerzeugung aus dem Überstand der abzentrifugierten Suspension von gemahlenem Hühnerkot in Wasser) wurde ein Aerosol mit den in Abb. 25 dargestellten Partikelverteilungen erhalten. Die Partikelgrößenverteilung konnte über eine Betriebszeit von mindestens einer Stunde als konstant angesehen werden. Es war nur eine leichte Abnahme des Gesamtaufkommens der Partikel zu erkennen, ohne dass es zu einer relevanten Veränderung der Partikelverteilungen kam (Abb. 25 b). Bei den orientierenden Messungen war die Messgenauigkeit der größeren Partikel eingeschränkt, da deren Anzahl im betrachteten Messintervall recht gering war.

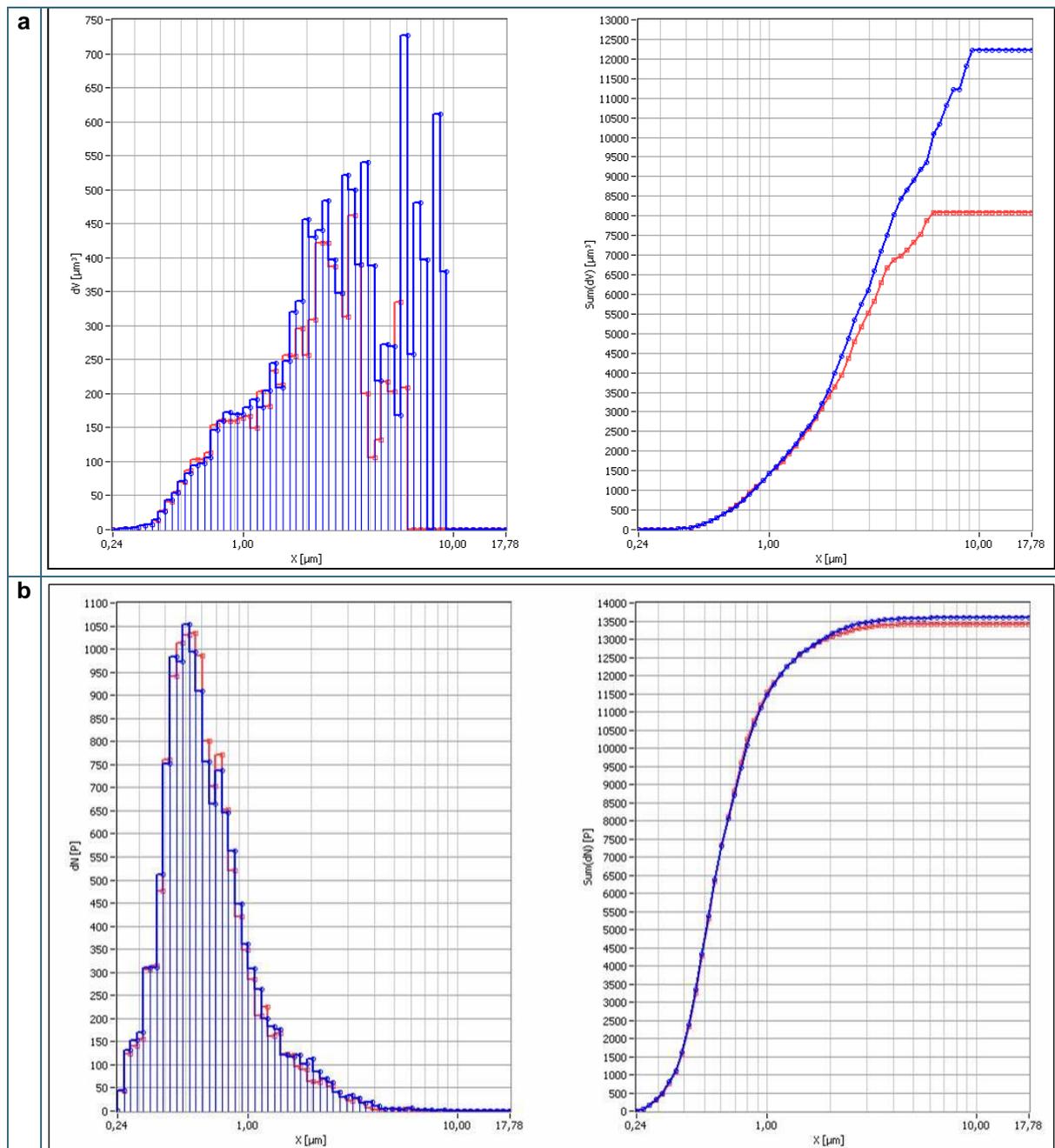


Abb. 25: a) Vergleich der Partikelvolumenverteilungen dV zu Versuchsbeginn (blau) und nach etwa 1 Stunde (rot); (b) Vergleich Partikelanzahlverteilung dN zu Versuchsbeginn (blau) und nach etwa 1 Stunde (rot) für Versuch 2

Beim Versuch 3 wurde das Aerosol aus einer Suspension des gemahlene und auf eine Korngröße von $\leq 63 \mu\text{m}$ gesiebtem Hühnerkot in Wasser erzeugt. Zur homogenen Durchmischung wurde die Suspension im Vorlagengefäß des Generators ständig gerührt.

Das Ergebnis ist in Abb. 26 zusammengefasst. Die Partikelverteilung blieb über eine Betriebszeit von mindestens einer Stunde weitgehend unverändert. Es war aber eine deutliche Abnahme des Gesamtpartikelauftommens erkennbar.

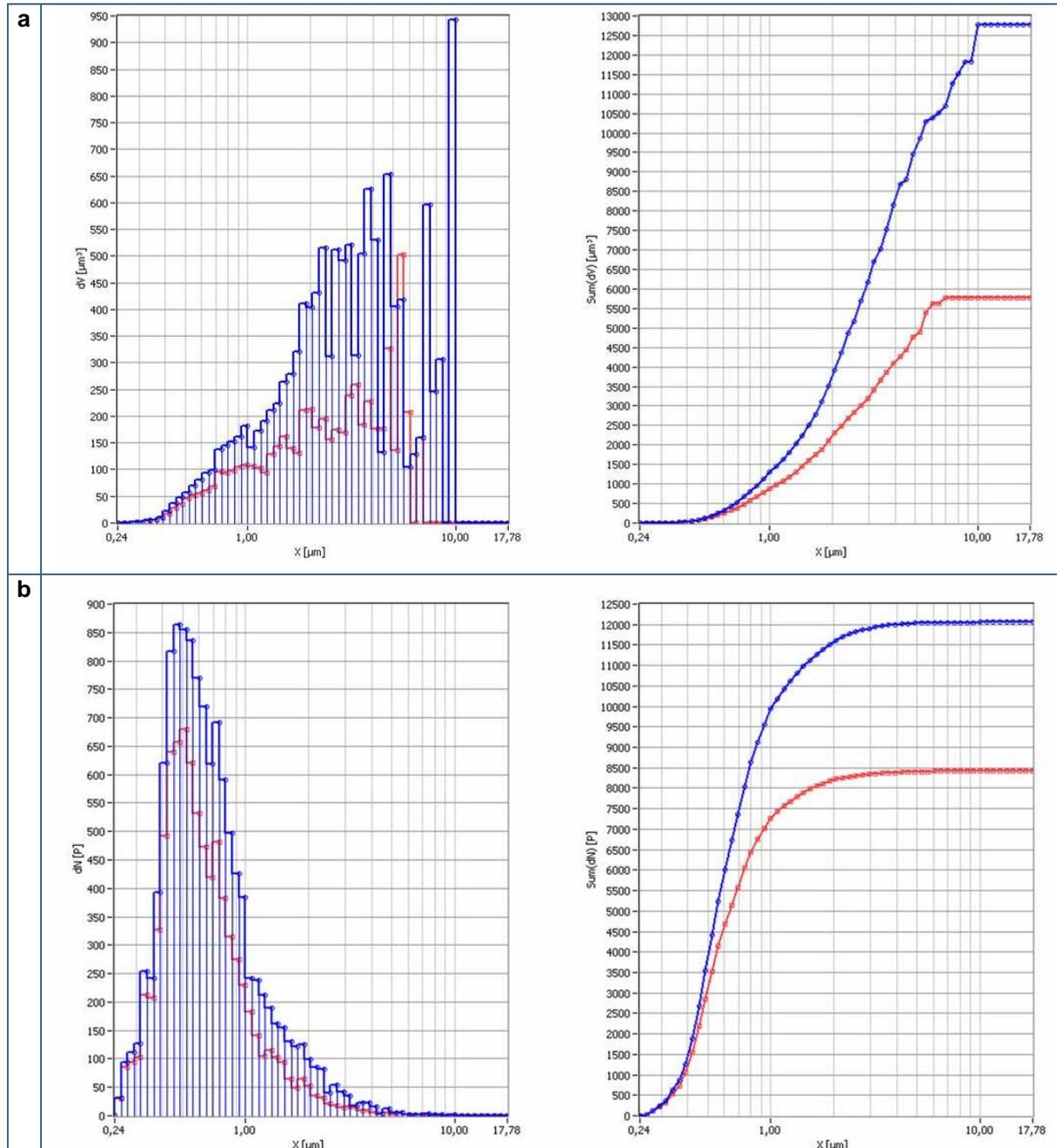


Abb. 26: (a) Vergleich der Partikelvolumenverteilungen dV zu Versuchsbeginn (blau) und nach etwa 1 Stunde (rot); (b) Vergleich Partikelanzahlverteilung dN zu Versuchsbeginn (blau) und nach etwa 1 Stunde (rot) für Versuch 3

Die erfolgreiche Erprobung des Aerosolgenerators AGK-2000 bot die Möglichkeit, die Viren- und die Kotsuspension mit einem einzigen Aerosolgenerator herzustellen und dabei die natürliche Generierung von Feinstaub aus Kot weitgehend zu simulieren: Aus der mit Viren dotierten Kotsuspension würden Flüssigkeitstropfen generiert, die neben dem wasserunlöslichen Kotanteil die im wasserlöslichen Kotanteil vorhandenen Viren enthalten. Bei der Trocknung der Flüssigkeitstropfen würden die Viren – wie bei der natürlichen Entstehung von Kotpartikeln – im getrockneten Kotpartikel eingeschlossen. Beim Trockendisp. RBG 1000 wären die Viren dagegen auf den Partikeloberflächen adsorbiert.

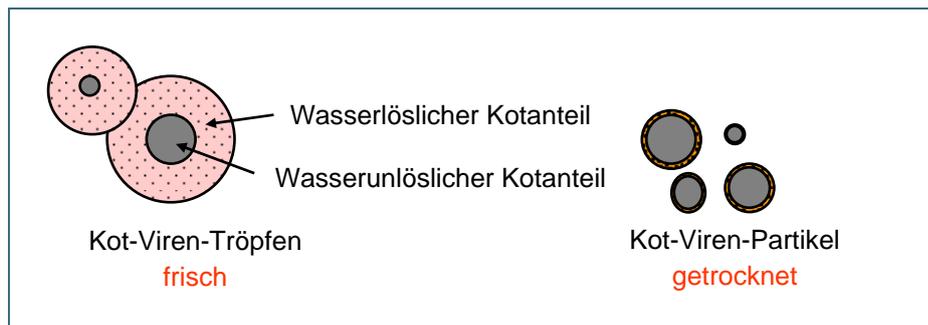


Abb. 27: Schematische Darstellung der Genese von Kotpartikeln aus den mit dem AGK 2000 erzeugten Aerosolen aus Virus-Kot-Suspension

4.2.3 Realisierte Apparatur zur Erzeugung Virus-dotierter Feinstaubfilter

Auf Grundlage der Voruntersuchungen wurde das abschließende Konzept für die Apparatur zur Erzeugung der Virus-dotierten Feinstaubfilter festgelegt. Abb. 28 verdeutlicht deren schematischen Aufbau sowie die angestrebten Volumenströme.

Das im AGK 2000 aus Viren-dotierter Kotsuspension hergestellte Aerosol sollte mit Druckluft verdünnt werden und dann durch die Impaktorstufe zur Partikelgrößenauswahl geleitet werden. Hierzu wurde eine Neukonstruktion angefertigt, die 3 Aufgaben übernehmen sollte:

- im oberen Teil: Verdünnung und Trocknung des Aerosols aus dem AGK 2000 mit Druckluft
- im mittleren Teil: Einsatz für die Impaktordüsen
- im unteren Teil: Strömungsteiler, der den Gesamtvolumenstrom auf die Teilströme für die Partikelmessung mit dem welas Partikelspektrometer (ca. 5 Vol.-%), die Partikelabscheidung auf den Partikelfilter (ca. 95 %) und die Ableitung von Überschussluft aufteilt.

Der zum welas Partikelspektrometer abgeleitete Teilstrom musste zunächst vorverdünnt werden, um den oberen Messbereich des Analysators zu unterschreiten. Sämtliche Abluftströme sollten gefasst und durch eine thermische Dekontaminationsstufe geführt werden, bevor die Abluft über einen mit Hochleistungsschwebstaubfiltern ausgerüsteten Abzug abgeleitet wurde.

Dieser Lösungsansatz ermöglichte es, bis zu 95 % der erzeugten Partikel auf den Partikelfiltern abzuscheiden (bei der ursprünglichen Konzeption wären es weniger als 1 % gewesen).

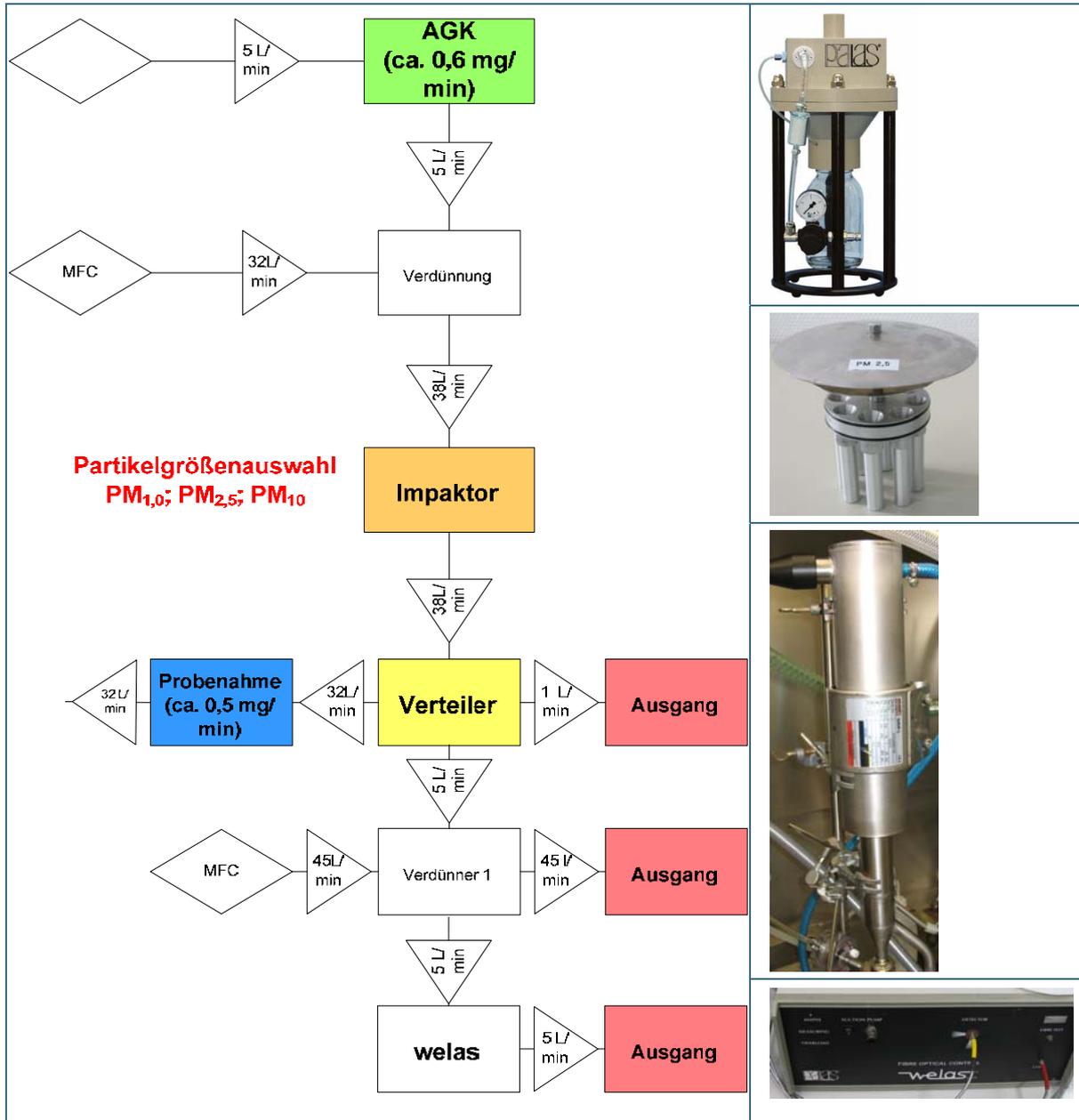


Abb. 28: Konkretisiertes Konzept der Apparatur zur Erzeugung Virus-dotierter Feinstaubfilter (Erläuterungen im Text)

Die neu konstruierte, mehrteilige Misch- und Verteilerkammer wurde vom bifa konzipiert und von der Firma Feichtenschlager, Neusäß, aus Edelstahl gefertigt. In der Verteilerebene wurden die Volumenströme auf den Volumenstromverdünner und den Probenahmekopf aufgeteilt. Überschüssiges Aerosol wurde direkt über das Druckausgleichsrohr dem beheizten Abluftschlauch zugeführt.

Um dafür zu sorgen, dass die Partikelzusammensetzungen des beprobten Volumenstroms und des mit dem welas gemessenen Volumenstroms vergleichbar waren, mussten an der Verteilungsebene isokinetische Bedingungen und eine laminare Strömungsführung vorherrschen. Bei turbulenten Strömungen und nicht isokinetischer Strömungsführung bestand die Gefahr einer Entmischung unterschiedlich schwerer Partikel. Wäre dies der Fall gewesen, so wären die Daten des welas 2000 nicht auf die Daten der Filterbelegung übertragbar gewesen.

Deshalb wurden, ausgehend vom Durchmesser des Hauptrohrs, die Rohrquerschnitte für das Druckausgleichsrohr und das welas-Absaugrohr für eine laminare und isokinetische Volumenstromführung errechnet. Als Maß für eine hinreichend laminare Strömung in einem Rohr gilt allg. eine Reynoldssche Zahl von kleiner als 2.300:

Verteilerebene / Rohrabschnitt	Reynoldssche Zahl
Hauptrohr	1579
Druckausgleichsrohr	249
welas-Absaugstutzen	582
Restfläche (zur Filterbelegung)	1473

Die Berechnung erfolgte mit folgender Gleichung:

$$Re = \frac{d_{Rohr} * v}{\nu}$$

Re = Reynoldsche Zahl

d_{Rohr} = Innendurchmesser des Rohrs in mm

v = mittlere Strömungsgeschwindigkeit des Mediums (Luft) in mm/s

ν = kinematische Viskosität von Luft (13,3 für 0 °C) in mm²/s

Für die Ausführung der Misch- und Verteilerkammer wurden aus Kostengründen Normteile gewählt. Deshalb wichen die tatsächlich eingesetzten Rohrdurchmesser von den errechneten Durchmessern etwas ab. Die Anforderungen an eine hinreichende Isokinetik, wie auch turbulenzfreier Strömungsführung an der Verteilerebene, waren trotzdem gegeben.

Die Eckdaten der konstruierten Verteilungsebene sind in der Tab. 8 angegeben; der Aufbau des Absaugstutzens als Ganzes ist in Abb. 29 im Detail ersichtlich. Zudem ist der gesamte Aufbau der Anlage in Abb. 31 dargestellt.

Tab. 8: Daten zur Auslegung des Strömungsteilers

Rohrabschnitt	Ø Außen in mm	Ø Innen in mm	Verbaute Querschnittsfläche in mm ²	Fläche des Strömungsquerschnitts in mm ²	Volumenfluss in l/min	Strömungsgeschwindigkeit in mm/s
Hauptrohr	42,0	38,4	227	1158	38	547
Druckausgleichsrohr	8,0	6,4	22	28	1	518
welas-Absaugrohr	16,0	13,7	47	154	5	565
Filterabsaugstutzen: Restfläche	--	--	--	907	32	588

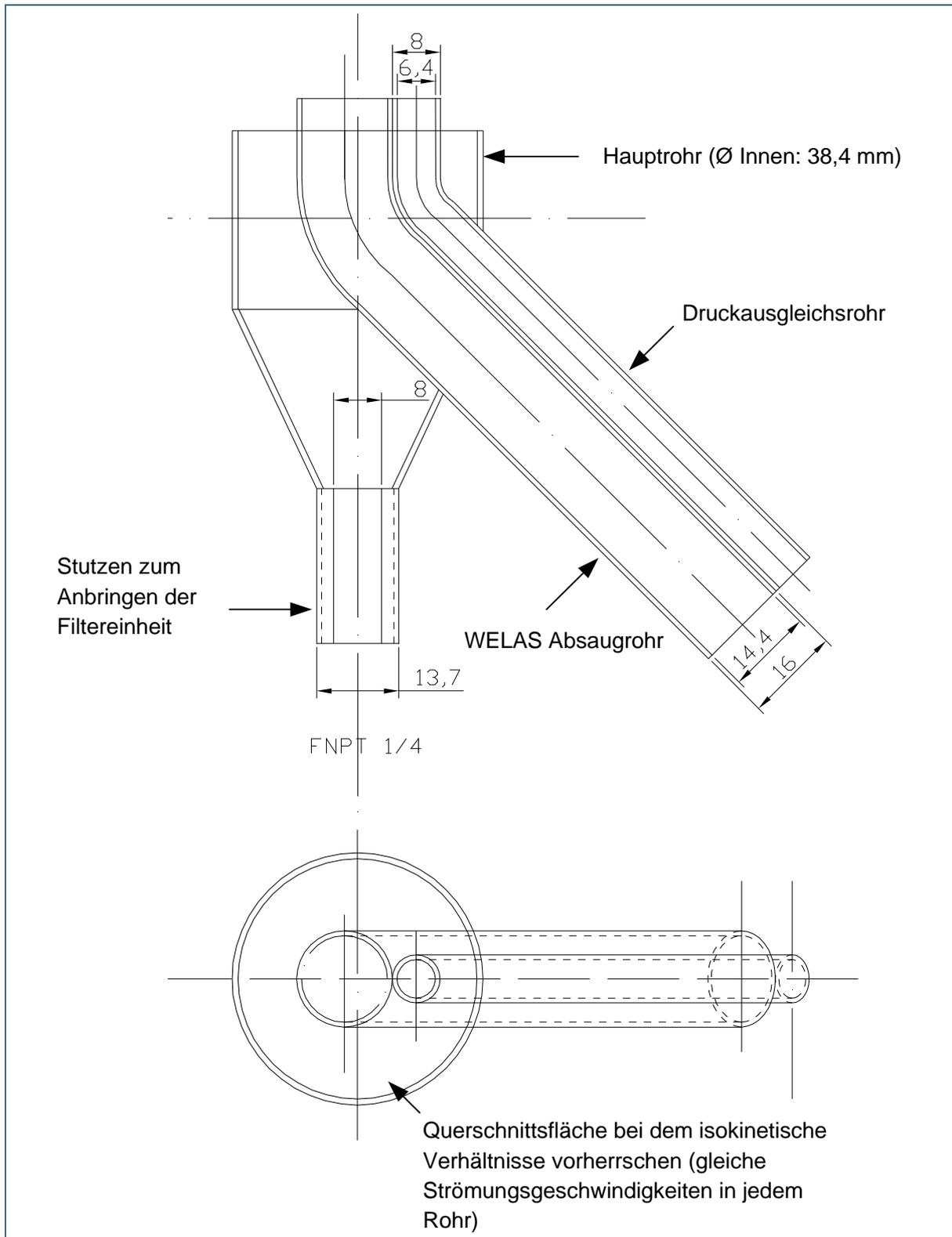


Abb. 29: Aufbau des Strömungsteilers (Maßstab 1:1; Ausführung in V2A-Edelstahl)

Nach Fertigstellung aller Bauteile wurden folgende Betriebsbedingungen für den Gesamtaufbau eingestellt: Für den Aerosolgenerator AGK 2000 wurde ein Vordruck von 2,6 bar angelegt (1,6 bar Überdruck am Manometer); dies entsprach lt. Hersteller einem Volumenstrom von ca. 5 l/min.

Für die Zuluft zur Verdünnungsstufe (Ejektorverdünner VKL-10-E, Palas GmbH) wurde ein Überdruck von 2,5 bar (3,5 bar am Manometer) und für die Zuluft zur Mischkammer ebenfalls ca. 1,6 bar Überdruck eingestellt (siehe auch Abb. 30).

Der angelegte Überdruck vor der Mischkammer entsprach bei der gewählten Anlagenkonfiguration einem Volumenstrom von ca. 33 l Druckluft pro Minute bei Raumtemperatur. Auf den Einsatz von Impaktoren wurde später verzichtet, da diese für den gewählten Versuchsansatz nicht leistungsfähig genug waren (siehe Abschnitt 4.2.4.1). Der Überdruck von 2,5 bar vor der Verdünnungsstufe entsprach dem vom Hersteller empfohlenen Vordruck, um bei einer definierten Zuluftmenge von 5 l/min eine Verdünnung von 1 zu 10 zu erzeugen. Dabei wurden 45 l/min in die Verdünnungsstufe zu 5 l/min Aerosol/Luftgemisch hinzugegeben und homogen vermengt. Aus dieser 1 zu 10 verdünnten aerosolhaltigen Luft wurde ein Volumenstrom von 5 l/min über den Detektor des Welas Aerosolspektrometers geleitet und vermessen. Die überschüssigen 45 l/min wurden über den beheizten Abluftschlauch abgeleitet.

Insgesamt wurden während des Betriebs der Anlage alle mit Hühnerkot und Viren beladenen Abgase zur Sterilisation über einen beheizten 10 m langen Edelstahlschlauch geleitet. Das Abgas hatte in dieser Abluftstrecke eine Mindestaufenthaltszeit von 10 s. Dieser Schlauch hatte auf den ersten 2 m eine Manteltemperatur von 250 °C. Das abgeleitete Abgas hatte am Austritt noch eine Temperatur von ca. 70 °C. Das thermisch behandelte Abgas wurde über einen Abzug mit Hochleistungsschwebstaubfiltern abgeleitet.

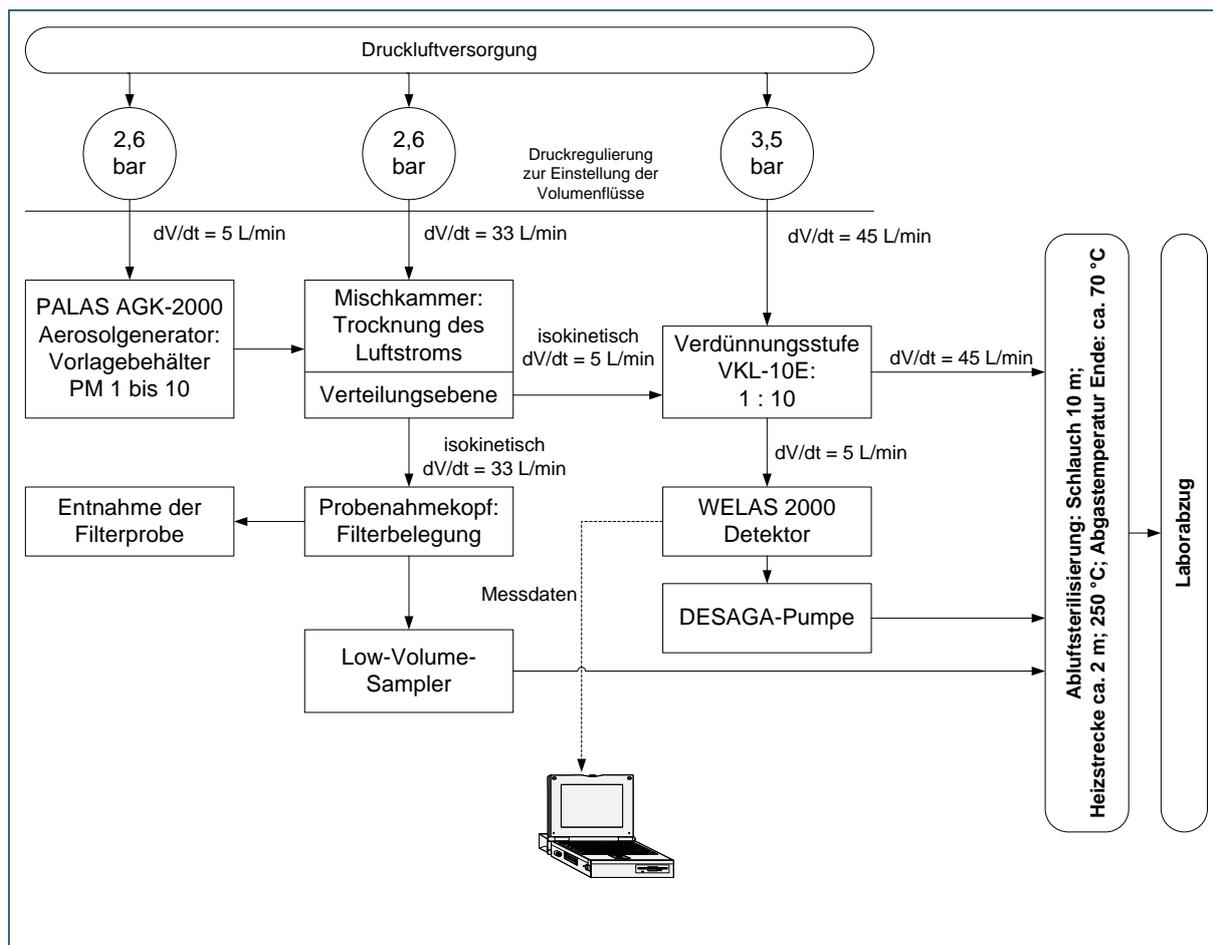


Abb. 30: Funktionsschema der für die Filterbelegungen genutzten Apparatur

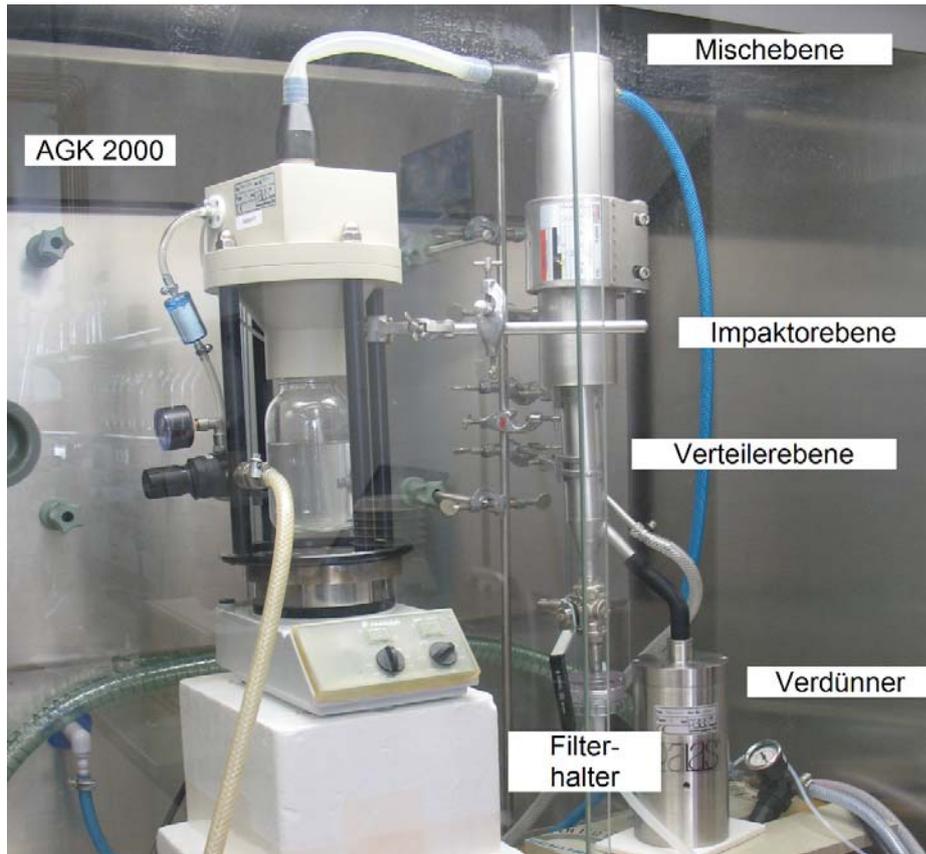


Abb. 31: Für die Filterbelegungen genutzte Apparatur

Nach der Nutzung der Apparatur zur Erzeugung von Virus-dotierten Feinstäuben wurde der Aerosolgenerator AGK 2000 mit einem viruzid wirkenden Desinfektionsmittel (Bacillocid Spezial) gefüllt und mit diesem Desinfektionsmittel für mindestens 10 Minuten betrieben. Anschließend wurde die Apparatur zerlegt und die Bauteile wurden über Nacht bei 70 °C im Trockenschrank gelagert. Nach den Maßnahmen zur Virusinaktivierung wurden die Bauteile gereinigt und für den erneuten Einsatz zusammengebaut.

4.2.4 Einflussfaktoren auf die Aerosolerzeugung

Im Rahmen des Vorhabens sollten Filter hergestellt werden, die mit Influenza-Viren dotiertem Feinstaub aus Hühnerkot beaufschlagt waren. Diese Filter sollten anschließend bei verschiedenen Umwelteinflüssen gelagert werden. Nach definierten Zeitpunkten sollte die Virusstabilität im Feinstaub überprüft werden. Vorzugsweise sollte zudem versucht werden, staubbeladene Filter zu erzeugen, die Feinstaub mit Partikelgrößen $< 1 \mu\text{m}$, $< 2,5 \mu\text{m}$ und $< 10 \mu\text{m}$ enthielten, damit geprüft werden konnte, ob die Viren vor allem in einer bestimmten Partikelgrößenklasse vorkamen. Dabei war zu berücksichtigen, dass die $\text{PM}_{2,5}$ -Partikelgrößenklasse die Partikel der $\text{PM}_{1,0}$ -Partikelgrößenklasse einschließt und die PM_{10} -Partikelgrößenklasse die Partikel der Klassen $\text{PM}_{2,5}$ und $\text{PM}_{1,0}$ (s. Abb. 32).

Zur Separierung bestimmter Partikelgrößenklassen sollten die zur Verfügung gestellten Impaktoren verwendet werden. Mit der fertigen Feinstaubapparatur wurde deshalb zunächst geprüft, durch welche Maßnahmen das Partikelgrößenspektrum der erzeugten Feinstäube verändert werden konnte.

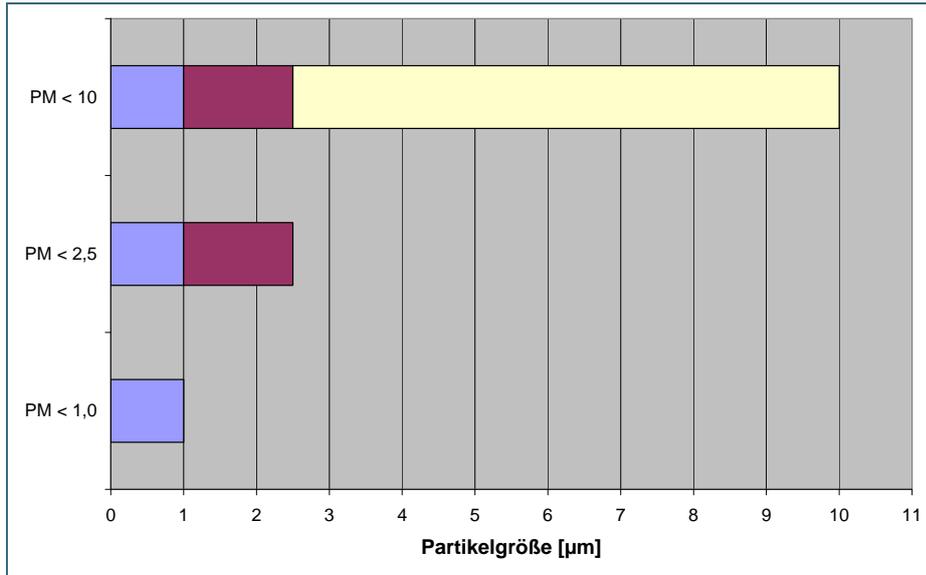


Abb. 32: Schematische Darstellung der Partikelgrößenklassen

Im Aerosolgenerator wurden aus einer Feststoffsuspension unter Druck in einem Zyklon Partikel beschleunigt, wobei nur Partikel bestimmter Massen weiter in die Mischkammer getragen wurden. Aufgrund der Trägheit schieden sich schwerere Partikel ab und flossen zurück in das Vorratsgefäß. Die erzeugten Partikel waren demnach stark abhängig von der Dichte der in der Suspension enthaltenen Feststoffpartikel. Die Anzahl der erzeugten Partikel pro Zeiteinheit war demnach von der Konzentration der eingesetzten Suspension abhängig. Zudem war zu klären, ob die Konzentration auch einen Einfluss auf das Partikelgrößenverteilungsmuster hatte.

Ziel war es deshalb zu prüfen, in wieweit bei der Aerosolerzeugung mit dem AGK-2000

1. die Verwendung des Impaktors
2. die Konzentration suspendierten Proben = Suspension
3. die Art der suspendierten Proben
4. die Aufbereitung der Proben (gewählter Siebschnitt, Abzentrifugation löslicher Stoffe, ...)

Einfluss auf die erzeugten Partikelgrößenverteilungsmuster hatten.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Daten aus mehreren Messungen mit unterschiedlicher Partikelkonzentration wurden die Darstellungen auf die jeweilige Gesamtpartikelzahl (dN/N) normiert. Dabei wurde die Anzahl der Partikel je Größenklasse dividiert durch die Anzahl der gesamt gemessenen Partikel und in Prozentpunkten angegeben. Zusätzlich wurden teilweise zur näheren Erläuterung die erzeugten „Partikeldichten“ (gemessene Partikelzahl je Volumeneinheit; dC in 1/cm³) dargestellt.

Bei der Betrachtung der Verteilungskurven ist zu beachten, dass der detektierte Volumenstrom nur etwa 1,3 % des gesamten erzeugten Volumenstroms betrug. Die Partikelkonzentration des vermessenen Volumenstroms betrug 10 % vom ursprünglichen.¹⁸

¹⁸ Von den 38 l Aerosol, die insgesamt erzeugt wurden, gelangten 5 l (Partikelkonzentration 100 %; Partikelzahl 13 % der ursprünglichen Anzahl) in den Verdünnungskanal. Im Verdünnungskanal wurden diese 5 l Aerosol mit 45 l Luft homogen vermischt (Partikelkonzentration 10 %; Partikelzahl 13 % der ursprünglichen Anzahl). Aus den entstandenen 50 l verdünnten Aerosols wurden 5 l (Partikelkonzentration 10 %; Partikelzahl 1,3 % der ursprünglichen Anzahl) über den Detektor geleitet und vermessen.

4.2.4.1 Einfluss von Impaktoren auf das Partikelverteilungsmuster

Zunächst wurde angenommen, dass vom Aerosolgenerator vor allem Partikel mit einem wirksamen Durchmesser von mehr als 10 µm erzeugt würden. Deshalb war geplant, Impaktoren zur Separation der Partikel einzusetzen. Die erzeugten Partikelgrößenverteilungsmuster von Vorversuchen zeigten jedoch, dass die mit Hühnerkot zu erwartenden Partikelgrößen mit relevanten Mengen max. 5 µm betragen würden. Deshalb wurden Impaktorversuche mit einem PM_{2,5} durchgeführt, um zu klären, ob aus dem Aerosol Teilfraktionen mit Partikelgrößen von < 2,5 µm separierbar waren. Der Impaktor war der Mischkammer nachgeschaltet und vor der Verteilungsebene angebracht. Um die Wirksamkeit des Impaktors zu testen, wurden Versuche mit und ohne dessen Einsatz gefahren. Einen Ergebnisüberblick geben Tab. 9 und die Abb. 33 bis Abb. 35.

Tab. 9: Daten zu den Impaktorversuchen

Probe / Suspension	Kot-Konzentration der Suspension in g/l	Ausführung	Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung
Hühnerkot ≤ 63µm	50	Mit Impaktor und ohne Impaktor PM _{2,5}	Vernachlässigbar
	5,0		
	0,5		

Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass der Einsatz eines Impaktors keine Verschiebung der Partikelgrößenverteilung in Richtung kleinerer Partikel bewirkt hat, die normierte Zahl der Partikel mit einem wirksamen Durchmesser von mehr als 2,5 µm war bei allen Aerosolen nahezu identisch. Zu erwarten wäre gewesen, dass Partikel mit einem wirksamen Strömungsdurchmesser von > 2,5 µm „ausgeblendet“ würden. Dies war nicht der Fall.

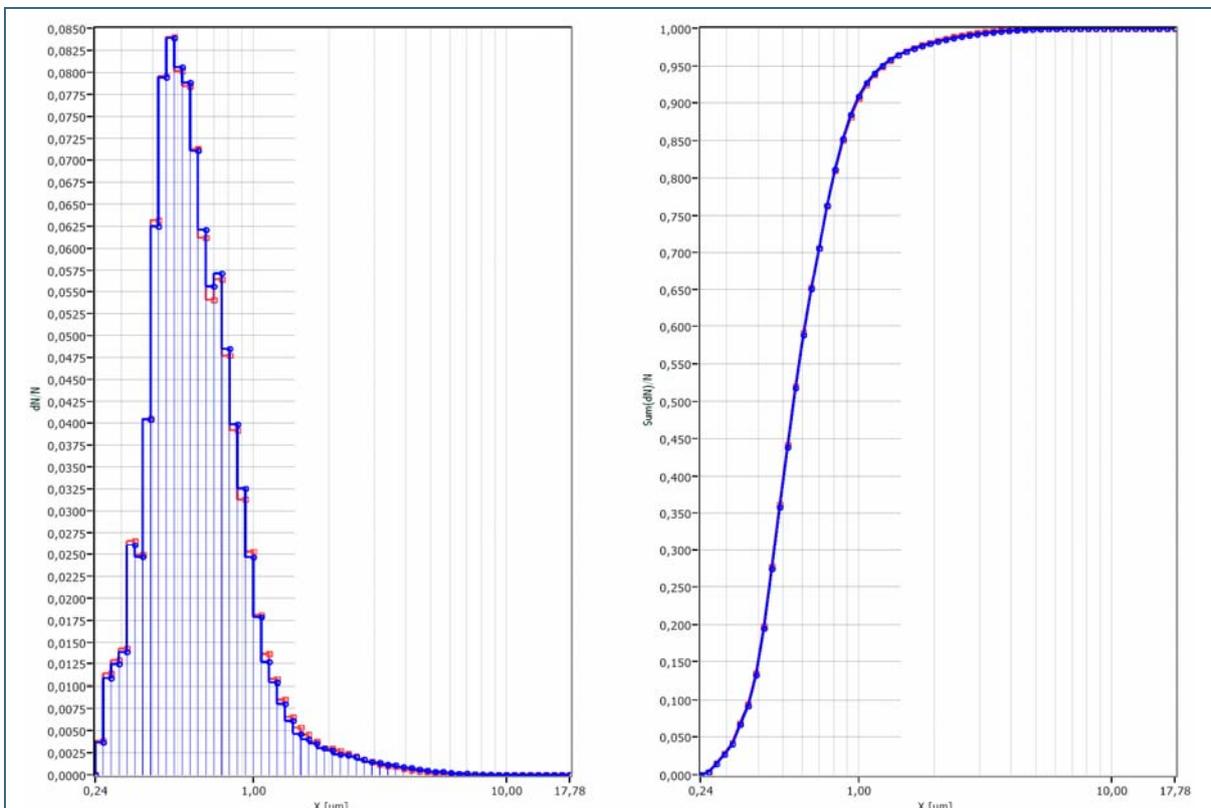


Abb. 33: Vergleich der Partikelgrößenverteilung mit (blau) und ohne (rot) Impaktoreinsatz PM_{2,5}; Konzentration der Kotsuspension: 50 g/l

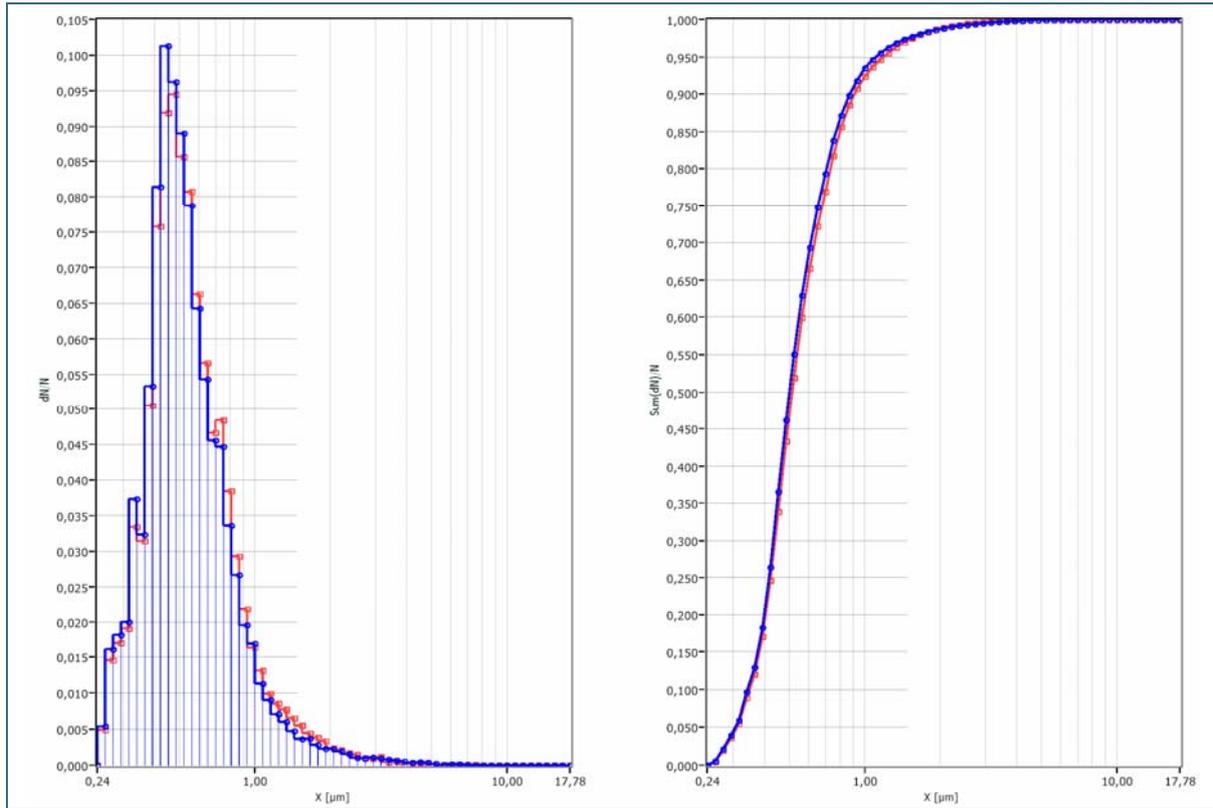


Abb. 34: Vergleich der Partikelgrößenverteilung mit (blau) und ohne (rot) Impaktoreinsatz $PM_{2,5}$; Konzentration der Kotsuspension: 5,0 g/l

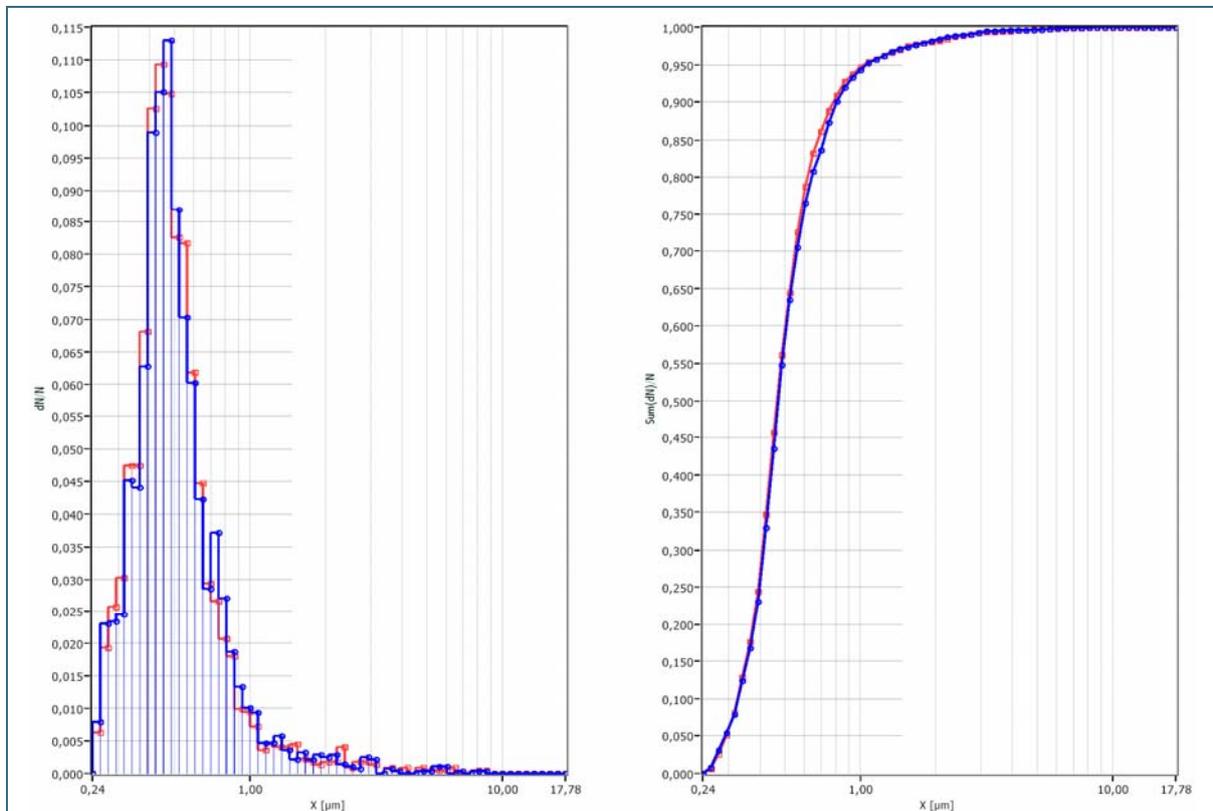


Abb. 35: Vergleich der Partikelgrößenverteilung mit (blau) und ohne (rot) Impaktoreinsatz $PM_{2,5}$; Konzentration der Kotsuspension: 0,5 g/l

4.2.4.2 Einfluss der Konzentration der Suspension auf das Partikelverteilungsmuster

Nach Angaben von Palas sollte durch die Variation der Konzentration der zur Aerosolzeugung verwendeten Suspension, je nach Substanz, Einfluss auf das Partikelgrößenverteilungsmuster genommen werden. Diese Angaben bezogen sich jedoch nur auf eine Salzlösung, hergestellt aus Kaliumchlorid (KCl-Lösung).

Ob diese für KCl-Lösungen gültigen Aussagen auch auf Hühnerkotlösungen zutrafen, wurde mit Versuchen mit verschiedenen Hühnerkotkonzentrationen geprüft (Tab. 10).

Tab. 10: Versuche mit verschiedenen konzentrierten Hühnerkotsuspensionen mit der AGK 2000

Lfd. Nr.	Eingesetzte Probe	Konzentration	Einheit	Aufbereitung
1	Hühnerkot	0,5	g/l	Siebschnitt \leq 63 μ m
2	Hühnerkot	5	g/l	Siebschnitt \leq 63 μ m
3	Hühnerkot	50	g/l	Siebschnitt \leq 63 μ m
4	Hühnerkot	200	g/l	Siebschnitt \leq 63 μ m
5	Hühnerkot	0,5	g/l	Siebschnitt $>$ 63 μ m
6	Hühnerkot	5	g/l	Siebschnitt $>$ 63 μ m
7	Hühnerkot	200	g/l	Siebschnitt $>$ 63 μ m

Die Versuche 4 und 7 mit einer eingestellten Hühnerkotkonzentration von 200 g/l führten innerhalb kurzer Zeit zur Verstopfung der Düsen des AGK 2000. Eine getestete 1:1-Verdünnung der Suspension aus Versuch 4 ergab keine maßgebliche Verlängerung der Düsenstandzeit.

Für alle weiteren Versuche wurde deshalb auf Konzentrationen oberhalb von 50 g Hühnerkot je l verzichtet.

Beim Vergleich der restlichen Versuche (1, 2, 3, 5 und 6) wurde eine leichte Verschiebung des gemessenen Verteilungsmusters der Partikel im Aerosol mit zunehmender Konzentration der Hühnerkotsuspension in Richtung größerer Partikel sichtbar. Dies hätte, ähnlich wie bei der KCl-Lösung, an der Ausbildung von größeren Salzkristallen liegen können. Jedoch war die eingetretene Verschiebung zu gering, um wesentlich größere Anteile von Partikeln mit einem wirksamen Durchmesser von 1 μ m bzw. 10 μ m zu erzeugen (siehe Abb. 36 und Abb. 37).

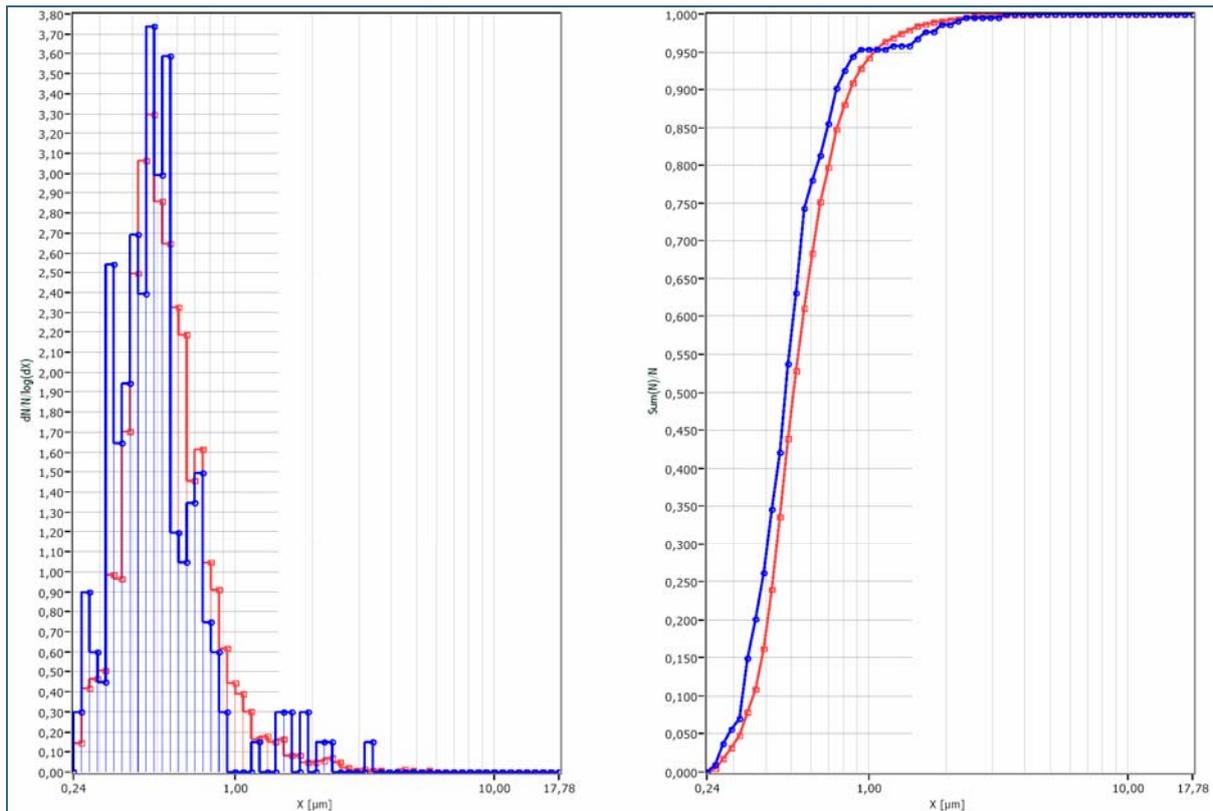


Abb. 36: Vergleich der Partikelverteilungen der erzeugten Aerosole mit einer Ausgangskonzentration von 5 g/l (rot) und 0,5 g/l (blau) aus dem Siebschnitt mit einer Korngröße von $> 63 \mu\text{m}$

Die Anzahl der erzeugten Partikel im Aerosol ging jedoch wie erwartet mit abnehmender Konzentration stark zurück (vgl. Abb. 38). Für die Durchführung der Messreihen mit Virendotierung wurden deshalb Konzentrationen des Hühnerkots von 50 g/l für die Aerosolerzeugung eingestellt. Diese Konzentration stellte sicher, dass die Probenahmezeit für die Belegung eines Filters mit hinreichend Hühnerkotstaub in vertretbarer Zeit durchgeführt werden konnte.

Die Belegungszeit wurde für die Versuchsreihen mit Virus-dotiertem Kot (s. Abschnitt 4.3) 1, 2, 3 und 4 auf 5 Minuten, für die Versuchsreihen 5 - 10 auf 3 Minuten je Filter festgelegt.

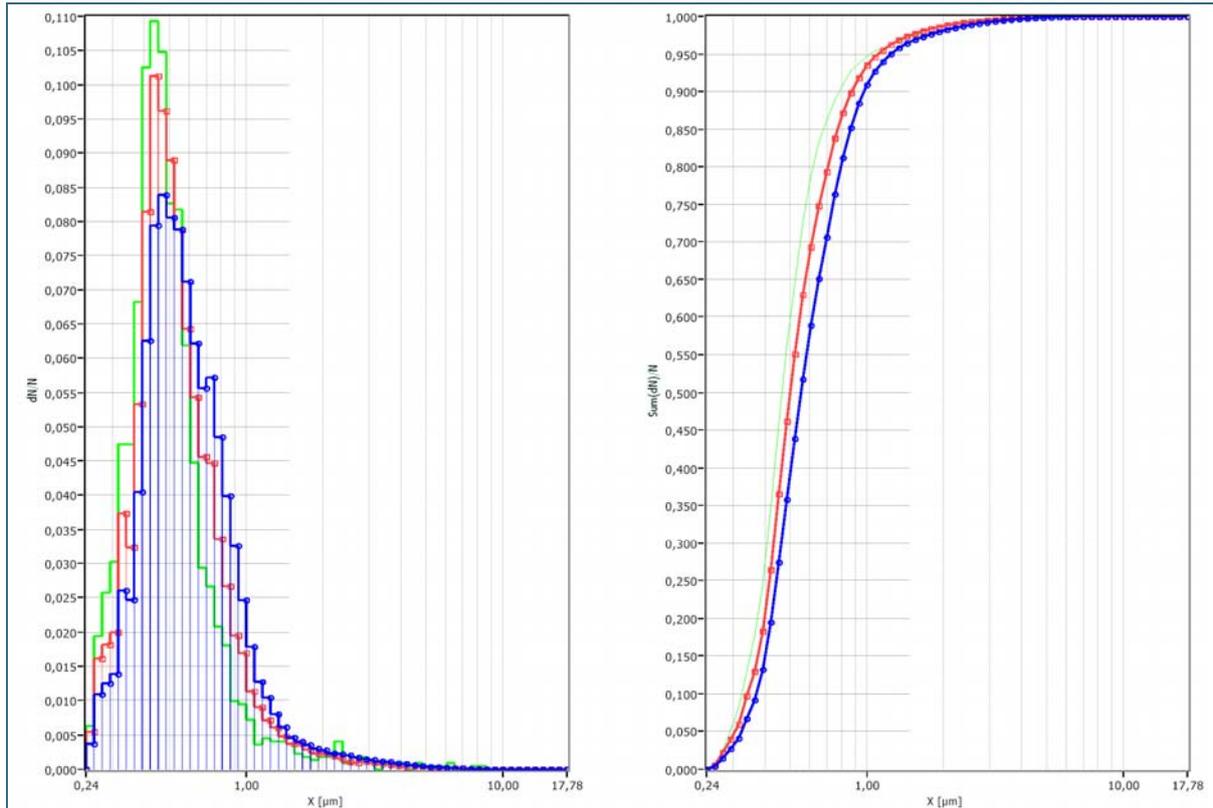


Abb. 37: Vergleich der Partikelverteilungen der erzeugten Aerosole mit einer Ausgangskonzentration von 50 g/l (blau), 5,0 g/l (rot) und 0,5 g/l (grün) aus dem Siebschnitt mit einer Korngröße von $\leq 63 \mu\text{m}$

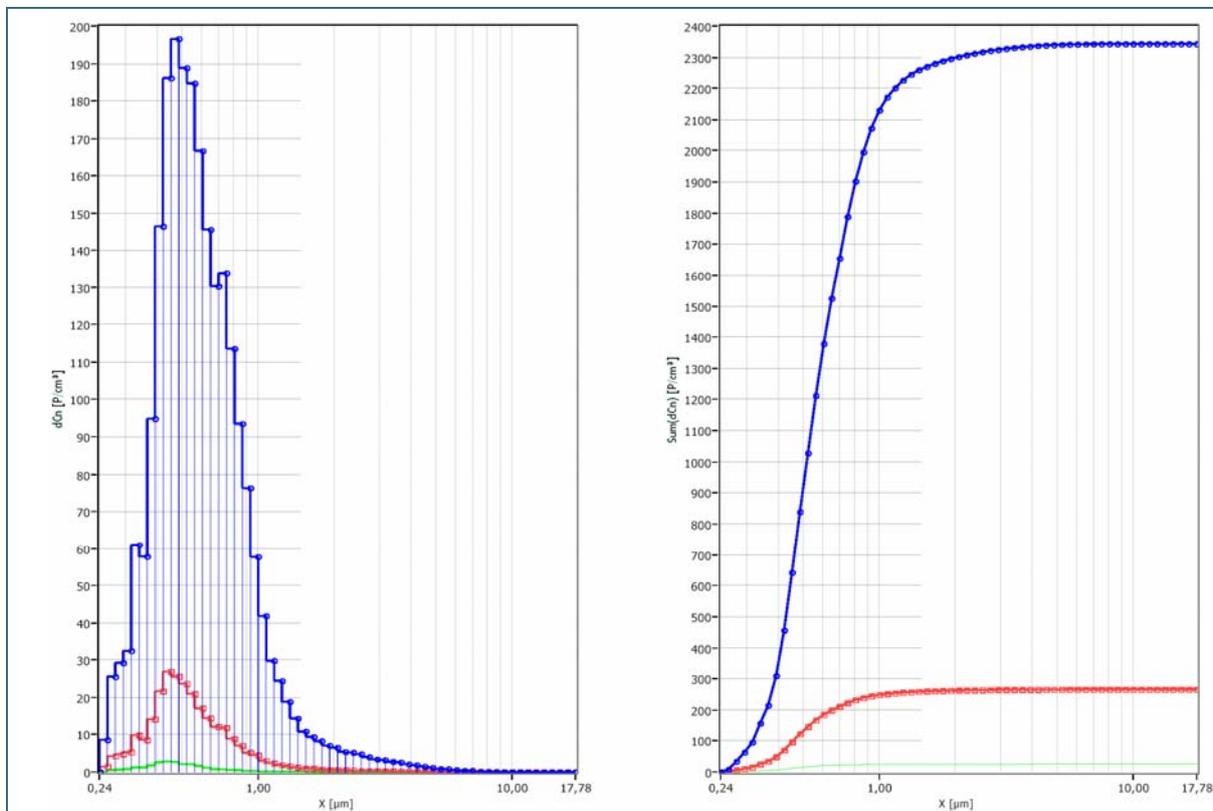


Abb. 38: Vergleich der Partikelkonzentrationen der erzeugten Aerosole mit einer Ausgangskonzentration von 50 g/l (blau), 5,0 g/l (rot) und 0,5 g/l (grün) aus dem Siebschnitt mit einer Korngröße von $\leq 63 \mu\text{m}$

Zudem wurde gezeigt, dass der für die Versuche eingesetzte Siebschnitt (\leq oder $>$ $63 \mu\text{m}$) keinen Einfluss auf die Partikelgrößenverteilung im erzeugten Aerosol hatte (siehe Abb. 39 und Abb. 40). Aus beiden Abbildungen geht zudem hervor, dass die Verteilungen bei beiden zur Aerosolerzeugung eingesetzten Konzentrationen und Siebschnitte nahezu deckungsgleich verliefen.

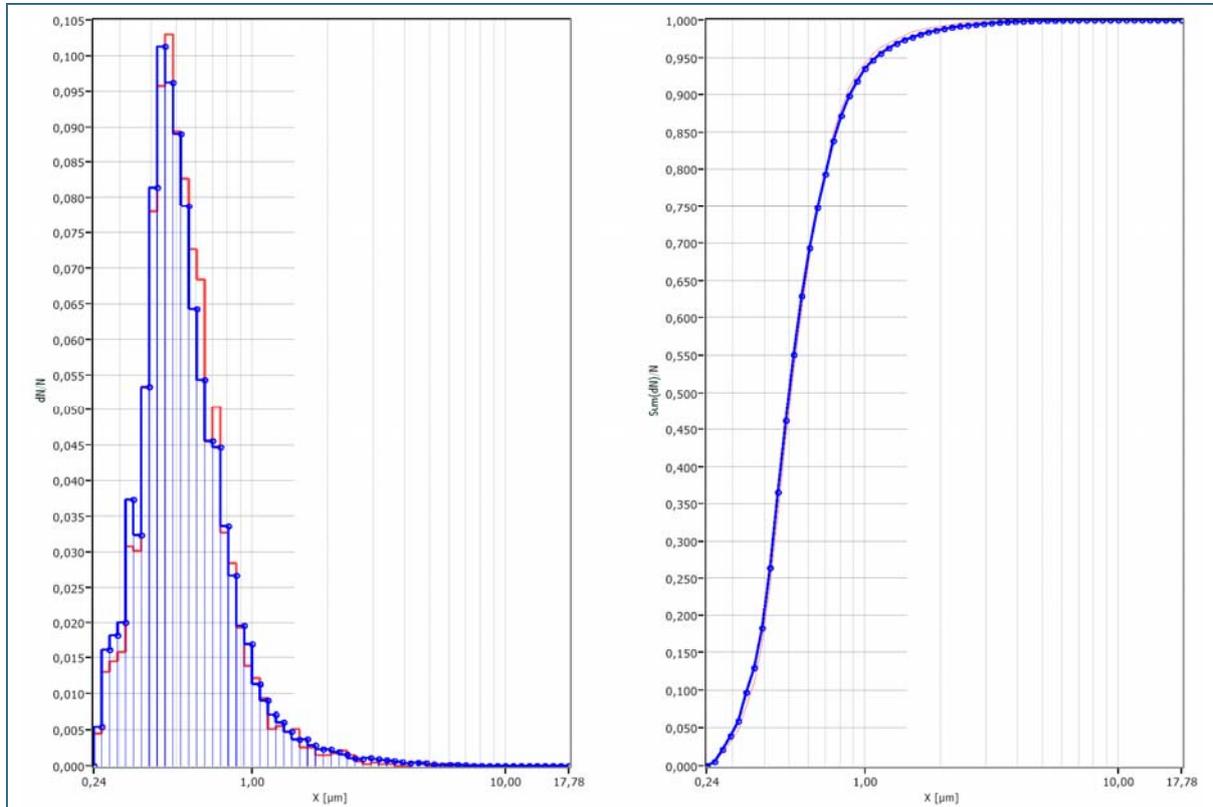


Abb. 39: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen der erzeugten Aerosole mit einer Ausgangskonzentration der Hühnerkotlösung von $5,0 \text{ g/l}$; Korngröße von $\leq 63 \mu\text{m}$ (blau; am welas gemessene Gesamtpartikelzahl: $5.800/\text{min}$) und $> 63 \mu\text{m}$ (rot; am welas gemessene Gesamtpartikelzahl: $7.450/\text{min}$)

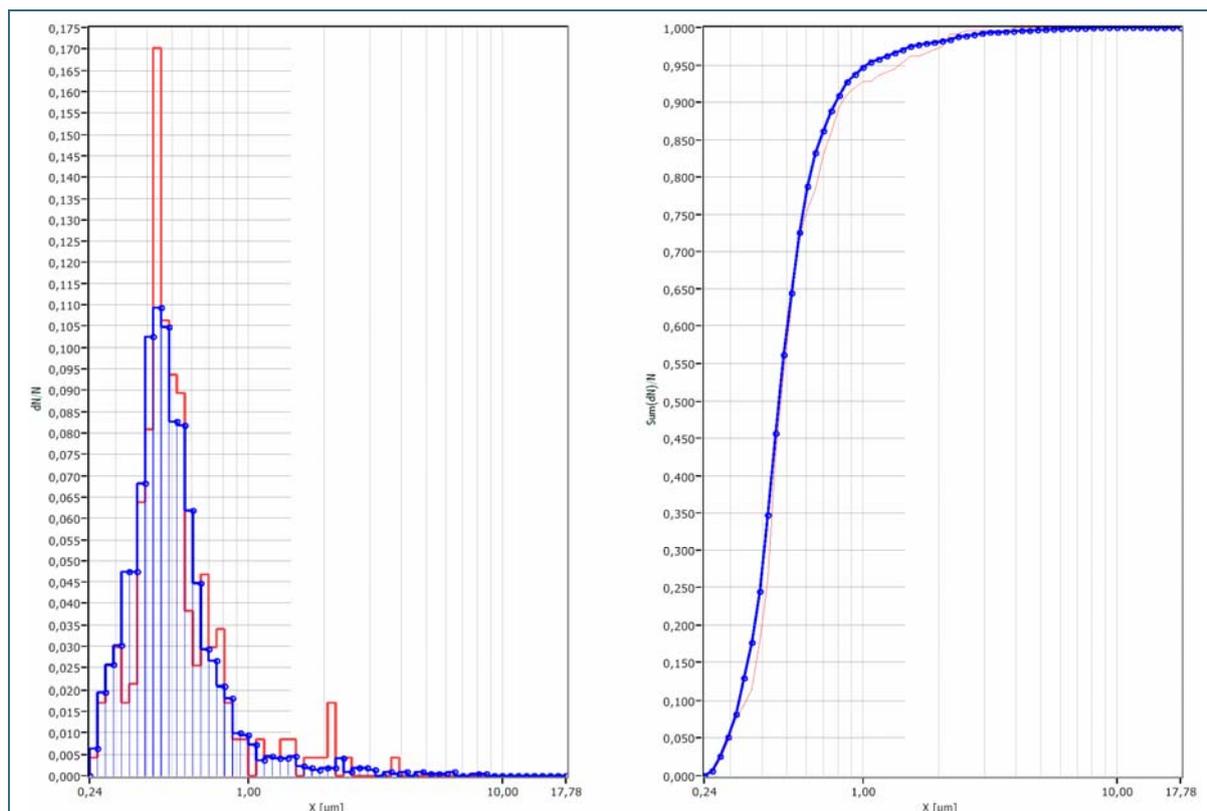


Abb. 40: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen der erzeugten Aerosole mit einer Ausgangskonzentration der Hühnerkotlösung von 0,5 g/l; Korngröße von $\leq 63 \mu\text{m}$ (blau; am welas gemessene Gesamtpartikelzahl: 595/min) und $> 63 \mu\text{m}$ (rot; am welas gemessene Gesamtpartikelzahl: 365/min)

Selbst die Anzahl der erzeugten Partikel in den Aerosolen war im Wesentlichen nur von der eingesetzten Konzentration abhängig. Die am welas gemessenen Gesamtpartikelzahlen im Aerosol lagen für die Suspension $\leq 63 \mu\text{m}$ und $> 63 \mu\text{m}$ bei gleicher Konzentration in derselben Größenordnung (vgl. Tab. 11).

Tab. 11: Versuche mit verschiedenen Siebschnitten als Suspensionsgrundlage zur Aerosolerzeugung

Lfd. Nr.	Eingesetzte Probe	Konzentration	Einheit	Gemessene Partikelanzahl pro min	Siebschnitt
1	Hühnerkot	0,5	g/l	595	Siebschnitt $\leq 63 \mu\text{m}$
2	Hühnerkot	5	g/l	5.800	Siebschnitt $\leq 63 \mu\text{m}$
5	Hühnerkot	0,5	g/l	365	Siebschnitt $> 63 \mu\text{m}$
6	Hühnerkot	5	g/l	7.450	Siebschnitt $> 63 \mu\text{m}$

Für die weiteren Versuche wurde auf den Einsatz des Siebschnitts $> 63 \mu\text{m}$ verzichtet, da dies im Vergleich zum Siebschnitt $\leq 63 \mu\text{m}$ nur geringen Einfluss sowohl auf die Partikelgrößenverteilung als auch Partikelanzahl im erzeugten Aerosol hatte.

4.2.4.3 Einfluss der suspendierten Probe auf die Partikelgrößenverteilung

Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Einfluss verschiedener Stoffe, die suspendiert wurden, auf die vom AGK 2000 erzeugte Partikelgrößenverteilung zu prüfen.

Abb. 41 zeigt die relative Partikelgrößenverteilung des mit LUFA Standardboden 2.3 (normierter Bodentyp), Hühnerkot (Siebschnitt $\leq 63 \mu\text{m}$) und CASO-AGAR (wasserlösliches, mikrobiologisches Nährmedium) erzeugten Aerosols (Konzentration der Suspensionen: 5 g/l).

Die erzeugten und mit dem *welas* gemessenen Partikelgrößen der verschiedenen Einsatzstoffe wiesen in ihrer Verteilung Unterschiede auf. Den, gemessen am Gesamtpartikelauflommen, geringsten Anteil an Feinpartikeln mit einem wirksamen Durchmesser von $< 1 \mu\text{m}$ besaß das Aerosol des LUFA Standardbodens 2.3 und des Hühnerkots (ca. 80 % bzw. 85 %; Abb. 44). Das Aerosol des sich vollkommen in Lösung befindlichen CASO-AGAR hatte einen höheren Anteil an Partikeln mit einem Durchmesser von $< 1 \mu\text{m}$ (ca. 95 %).

Der Einsatz unterschiedlicher Materialien zur Herstellung der Ausgangslösung für die Aerosolerzeugung führte aber zu keiner wesentlichen Verschiebung der Partikelgrößenverteilung in Richtung von Partikeln $> 10 \mu\text{m}$.

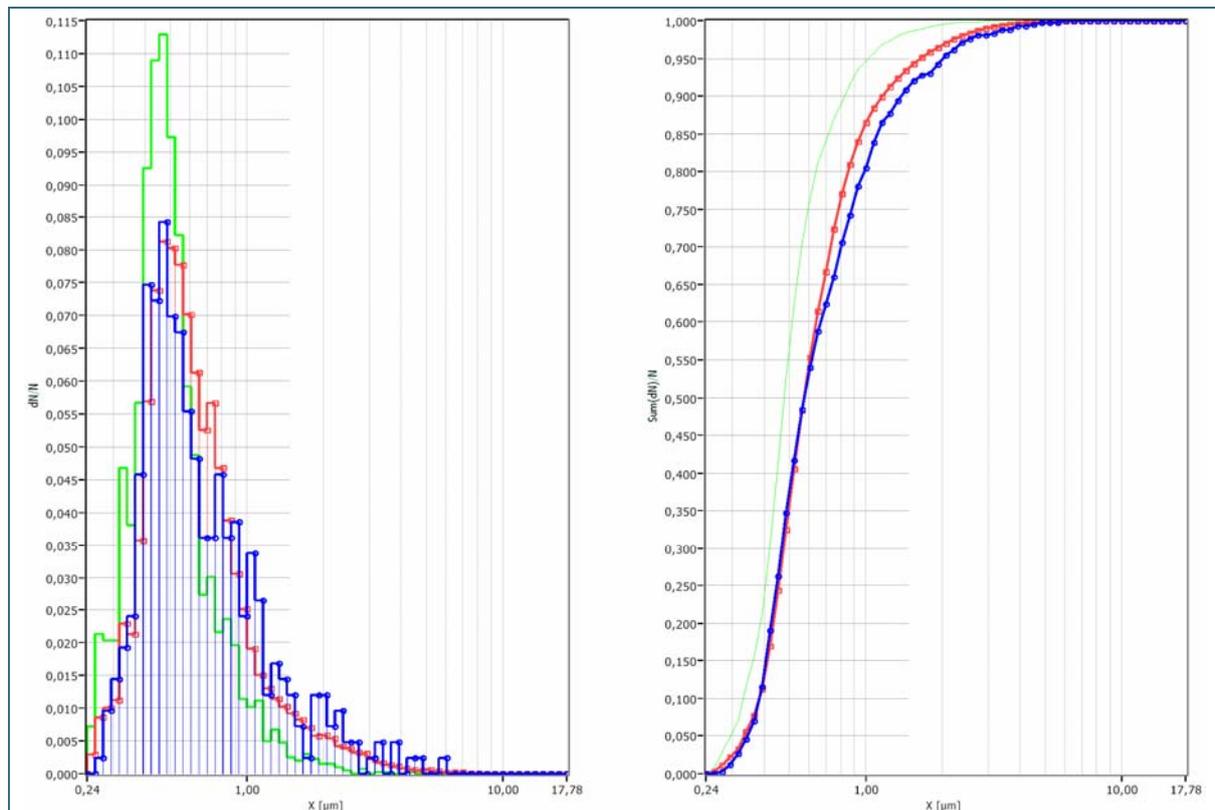


Abb. 41: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen der mit verschiedenen Proben erzeugten Aerosole. Probenkonzentration betrug jeweils 5,0 g/l. LUFA Standardboden 2.3 (blau), Hühnerkot mit einer Korngröße $\leq 63 \mu\text{m}$ (rot) und gelöster CASO-AGAR (grün)

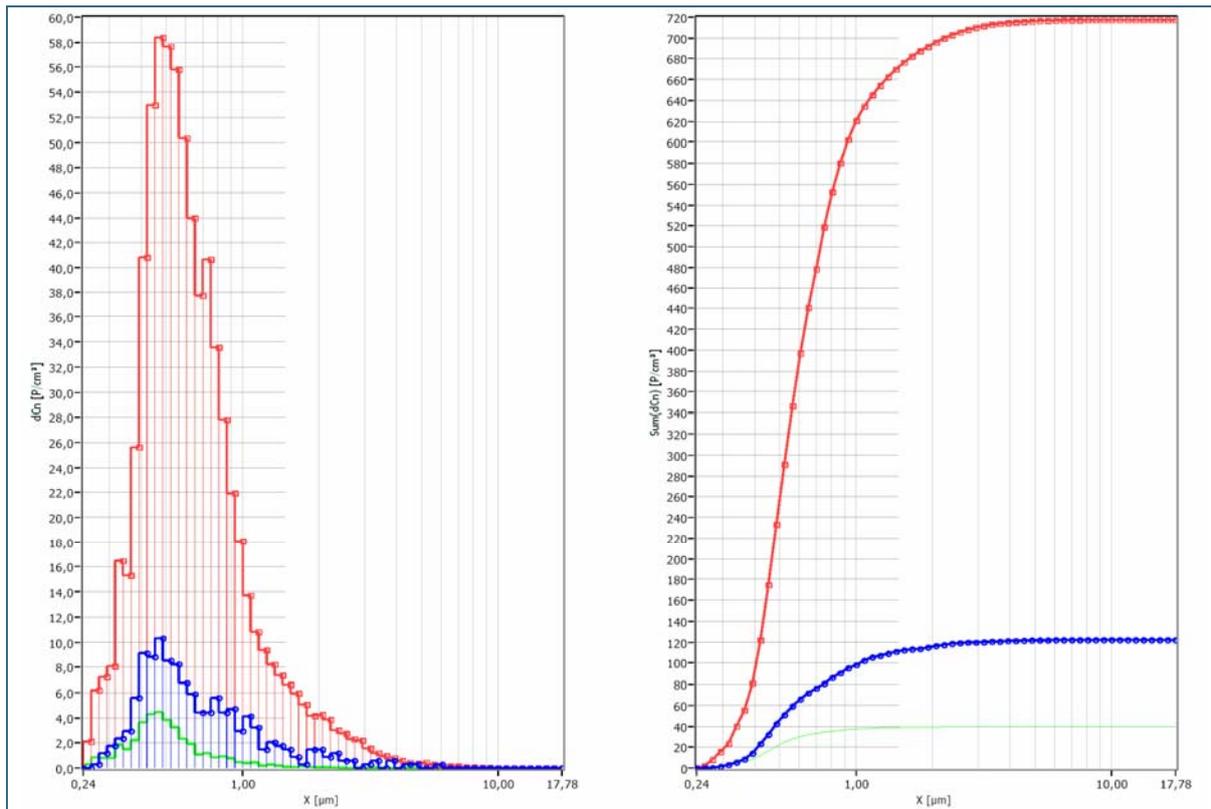


Abb. 42: Vergleich der Partikelkonzentrationen der mit verschiedenen Proben erzeugten Aerosole. Probenkonzentration betrug jeweils 5 g/l. LUFA Standardboden 2.3 (blau), Hühnerkot mit einer Korngröße $\leq 63 \mu m$ (rot) und gelöster CASO-AGAR (grün)

4.2.4.4 Einfluss der Aufbereitung auf die Partikelgrößenverteilung

Mit dem im Folgenden beschriebenen Versuch wurde geprüft, ob sich durch Zentrifugieren und wieder Aufschlänmen des Hühnerkots die Partikelgrößenverteilung hin zu größeren Partikeln verschob. Ziel war es den Anteil an Partikeln $< 1 \mu m$ an der Gesamtpartikelzahl zu verringern.

Zu diesem Zweck wurde eine Hühnerkotsuspension mit einer Ausgangskonzentration von 50 g/l bei einer Drehzahl von 12.000 min^{-1} und einer relativen zentrifugalen Beschleunigung (RZB-Wert: g-Zahl) von ca. 26.000 insgesamt 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Rückstand mit der gleichen Menge an Reinstwasser wieder aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, damit lösliche Salze und Feinstpartikel mit dem verworfenen Überstand weitestgehend entfernt wurden. In dieser von Feinstpartikeln und Salzen befreiten Ausgangslösung sollte der Anteil an größeren Partikeln an der Gesamtpartikelzahl zumindest relativ erhöht sein. Im Versuch wurde die zentrifugierte und wieder aufgeschlänmte Suspension im Vergleich zu einer unbehandelten Suspension gleicher Ausgangskonzentration (50 g Hühnerkot pro Liter) gemessen.

Das Ergebnis aus diesen Versuchen zeigte keine wesentliche Verschiebung der Verteilung der Hühnerkotpartikel hin zu größeren Partikeln (siehe Abb. 43). Die beiden Häufigkeitsverteilungen (rot = 50 g/l zentrifugiert; blau = 50 g/l nicht zentrifugiert) waren im Bereich bis ca. $1 \mu m$ nahezu deckungsgleich. Im weiteren Verlauf war eine leichte Zunahme des Anteils größerer Partikel bei der zentrifugierten Ausgangslösung zwar erkennbar, jedoch war diese Verschiebung gering. Der Aerosolgenerator war auch bei der zentrifugierten Ausgangslösung nicht in der Lage, die Verteilung der erzeugten Hühnerkotpartikel wesentlich in Richtung von Partikelgrößen von $10 \mu m$ zu verändern. Zudem wurden trotz hoher Hühnerkotkonzentration in der Suspension nur relativ kleine Mengen an Partikeln erzeugt (Abb. 44), die eine wesentlich längere Beprobungszeit als Konsequenz gehabt hätten.

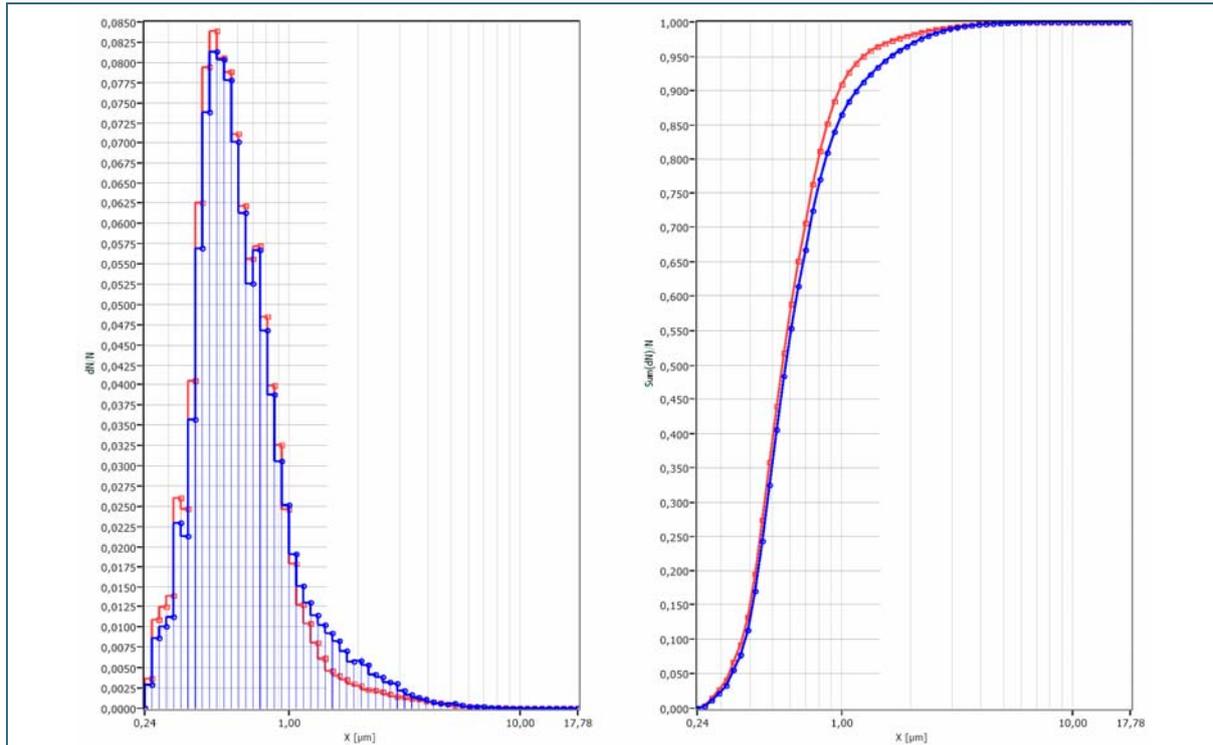


Abb. 43: Vergleich der Partikelgrößenverteilungen der erzeugten Aerosole mit einer Ausgangskonzentration von 50 g/l; hergestellt aus abzentrifugiertem und mit Reinstwasser wieder aufgeschlammten Hühnerkot (blau) und unbehandelter Hühnerkotsuspension mit einer Konzentration von 50 g/l (rot) (Ausgangsmaterial für beide Suspensionen: Siebschnitt des gemahlene Hühnerkots mit einer Korngröße von $\leq 63 \mu\text{m}$)

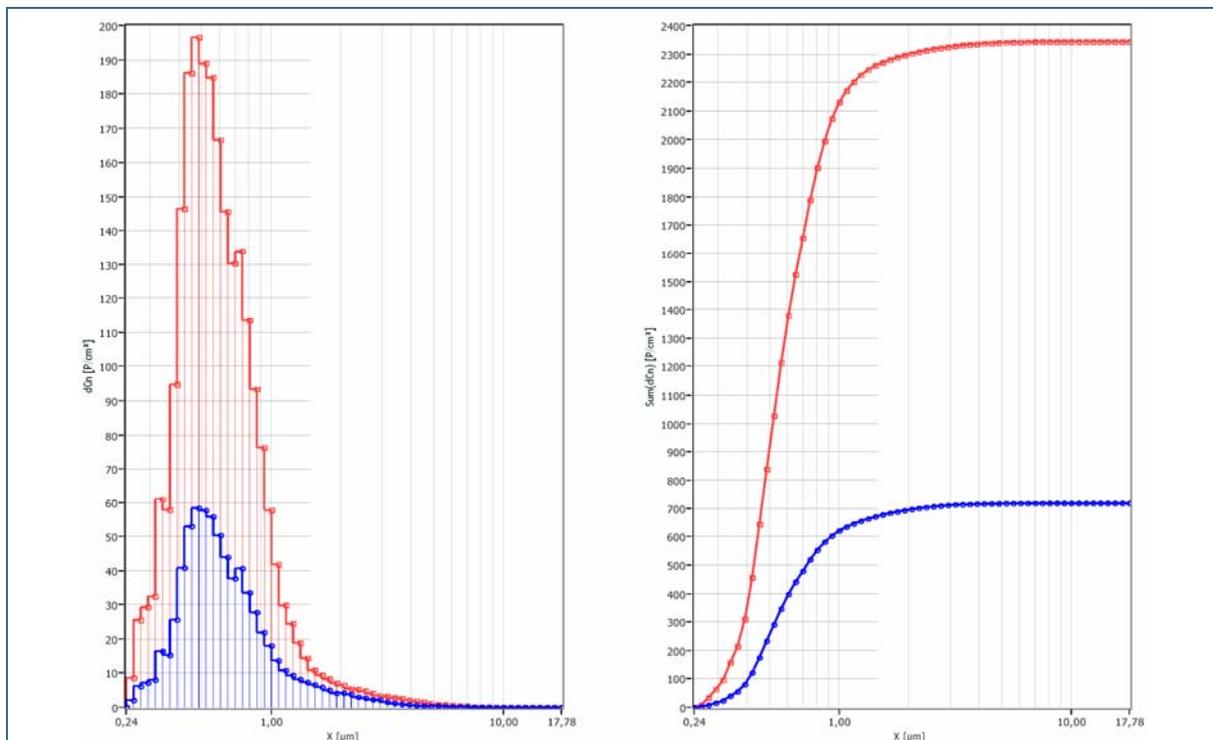


Abb. 44: Vergleich der Partikelkonzentrationen der erzeugten Aerosole mit einer Ausgangskonzentration von 50 g/l; hergestellt aus abzentrifugiertem und mit Reinstwasser wieder aufgeschlammten Hühnerkot (blau) und unbehandelter Hühnerkotsuspension mit einer Konzentration von 50 g/l (rot) (Ausgangsmaterial für beide Suspensionen: Siebschnitt des gemahlene Hühnerkots mit einer Korngröße von $\leq 63 \mu\text{m}$)

4.2.5 Fazit

Die mit dem AGK 2000 und den nachgeschalteten Impaktorstufen erzielten Partikelgrößenverteilungen waren trotz diverser Variationen der Randbedingungen insgesamt nahezu gleichbleibend. Das primäre Ziel des Vorhabens – die Erzeugung von Feinstaub aus Hühnerkot – konnte realisiert werden, doch war es nicht möglich, unterschiedliche Feinstaubfraktionen (PM_{1,0}, PM_{2,5}, PM₁₀) zu separieren.

Die Begründung hierfür wurde gefunden, als die Leistungsgrenzen der Impaktoren hinsichtlich der Partikelabscheidung betrachtet wurden. Grundsätzlich wurden im Impaktor durchaus größere von kleineren Partikeln separiert: Die größeren Partikel wurden aufgrund ihrer Trägheit in einer Fettschicht unter dem Impaktor abgelagert und die kleineren Partikel folgten dem vor der Fettschicht abgelenkten Luftstrom. Die Impaktoren wiesen jeweils 8 Düsen auf. Beim PM₁₀-Impaktor hatten die Düsen einen Durchmesser von 6,4 mm, beim PM_{2,5}-Impaktor waren es 2,5 mm und beim PM_{1,0}-Impaktor nur noch 1,0 mm. Da die abzutrennenden Partikel ausschließlich unterhalb der Düsenöffnungen des Impaktors abgelagert wurden, ergaben sich bei den unterschiedlichen Impaktoren sehr unterschiedliche Impaktionsflächen: Die Gesamtimpaktionsfläche war bei PM₁₀-Impaktor circa um Faktor 40 größer als beim PM_{1,0}-Impaktor; damit konnte der PM₁₀-Impaktor etwa eine 40fach größere Menge an unerwünschten Partikeln aus dem Aerosol abtrennen als der PM_{1,0}-Impaktor.

Impaktor	Düsendurchmesser	Gesamtöffnungsfläche
PM _{1,0}	1,0 mm	0,79 mm ²
PM _{2,5}	2,5 mm	4,91 mm ²
PM ₁₀	6,4 mm	32,17 mm ²

Tab. 12: Kenndaten der eingesetzten Impaktoren

Die vom AGK 2000 erzeugten Aerosole wiesen jedoch eine Partikelverteilung auf, die den Abscheidemöglichkeiten der Impaktoren entgegengesetzt war (vergl. Abb. 45): Der Massenanteil der Partikel mit einer Partikelgröße von < 1,0 µm lag lediglich bei 1,3 %. Der PM_{1,0}-Impaktor hätte somit 98,7 Massen-% der im Aerosol vorhandenen Partikel abscheiden müssen. Der PM₁₀-Impaktor hätte dagegen nur 17 Massen-% der im Aerosol vorhandenen Partikel abscheiden müssen.

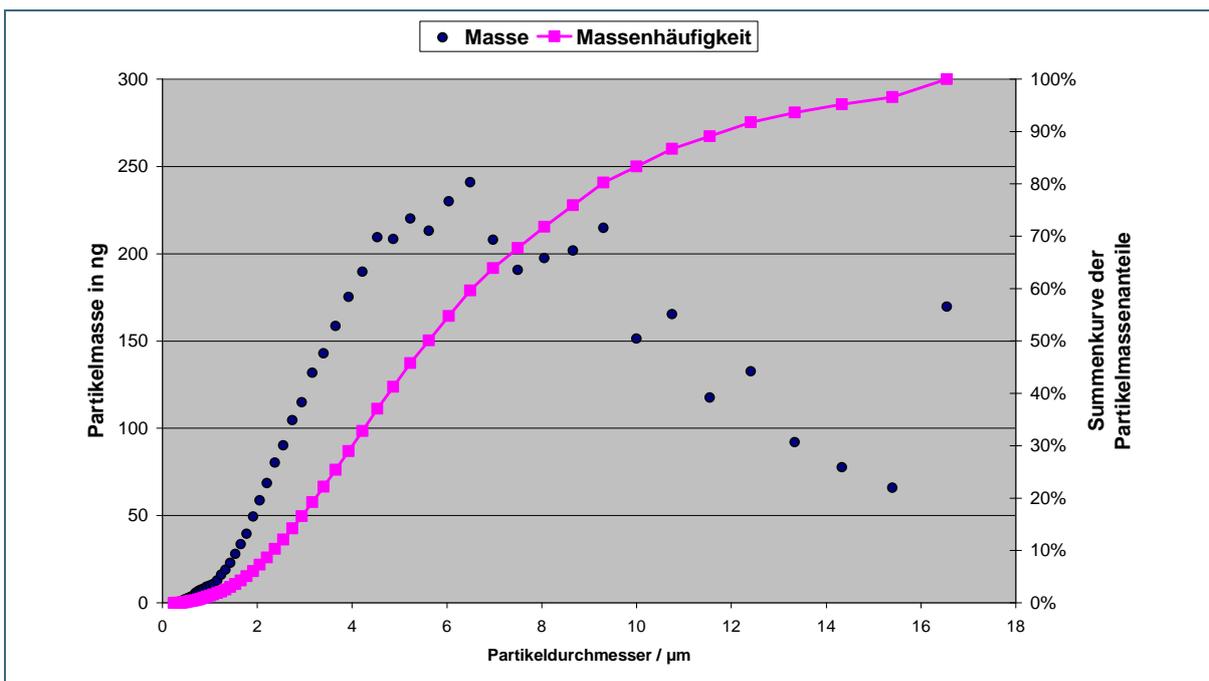


Abb. 45: Partikelmassenverteilung bei Verwendung einer Quarzmehlsuspension (50 g/l)

Tab. 13: Massenanteile von Partikeln bestimmter Größenklassen im erzeugten Quarzmehlaerosol

Partikel	Häufigkeit (Anzahl)	Massenanteil	Abzutrennende Massenanteile	Vom Impaktor abzutrennende Masse für Filter mit 5 mg Auflage
$\leq 1,0 \mu\text{m}$	64 %	1,3 %	98,7 %	> 380 mg
$\leq 2,5 \mu\text{m}$	90 %	12 %	88 %	> 37 mg
$\leq 10 \mu\text{m}$	99,9 %	83 %	17 %	1 mg

Die Daten in der rechten Spalte von Tab. 13 verdeutlichen das Missverhältnis der Partikelabscheidekapazitäten der eingesetzten Impaktoren und der für die Erzeugung von Feinstaubfiltern mit einer Beladung von 5 mg Feinstaub der jeweiligen Größenklasse notwendigen Abscheidekapazität: Um einen Filter mit einer Beladung von 5 mg Feinstaub mit Partikeln einer Größe von $< 1,0 \mu\text{m}$ herzustellen, hätten die Impaktoren $> 380 \text{ mg}$ Feinstaub aus dem Aerosol abtrennen müssen. Dieser Wert lag um mehrere Größenordnungen über der Abscheidekapazität des $\text{PM}_{1,0}$ -Impaktors. Aber auch dann, wenn durch die Vorschaltung eines zusätzlichen Zyklons eine hinreichende Abscheidekapazität des $\text{PM}_{1,0}$ -Impaktors erreicht worden wäre, wäre eine Gewinnung von Filtern mit Partikeln einer Größe unter $1,0 \mu\text{m}$ und einer Filterbeladung von 5 mg nicht realisierbar gewesen, da dann trotz der hohen Feinstaubkonzentrationen im Aerosol von $> 25 \text{ mg/m}^3$ ein Volumen von $> 15 \text{ m}^3$ Aerosol für einen Filter erforderlich gewesen wäre. Hierzu wäre allein für die Beaufschlagung von einem Filter mit 5 mg $\text{PM}_{1,0}$ -Staub eine Probenahmedauer von knapp 7 Stunden notwendig gewesen.

Der Aerosolgenerator AGK 2000 erzeugte aus der Kotsuspension Flüssigkeitströpfchen mit einem Durchmesser von $< 15 \mu\text{m}$. Durch Trocknung der Flüssigkeitströpfchen wurden daraus Partikel mit Partikelgrößen gebildet, die überwiegend im alveolengängigen Größenbereich lagen, der aber für die Fragestellung des Vorhabens von besonderem Interesse war. Prinzipbedingt konnten mit dem Aerosolgenerator AGK 2000 aus Kotsuspensionen nur wenige Partikel mit Partikelgrößen von $> 10 \mu\text{m}$ produziert werden. Nachdem dieser Sachverhalt geklärt war, wurde auf den Einsatz der Impaktoren in der Apparatur zur Feinstaubherzeugung gänzlich verzichtet und die Arbeiten konzentrierten sich darauf, aus Hühnerkot ein Aerosol zu erzeugen, dessen Partikelgrößenverteilung über den Probenahmetag hinweg nahezu konstant blieb. Diese Anforderung wurde von der Apparatur zur Feinstaubherstellung sehr gut erfüllt: Typische Verteilungen der Partikelanzahlen, der Partikelvolumina und Partikeloberflächen zeigen Abb. 46 bis Abb. 48.

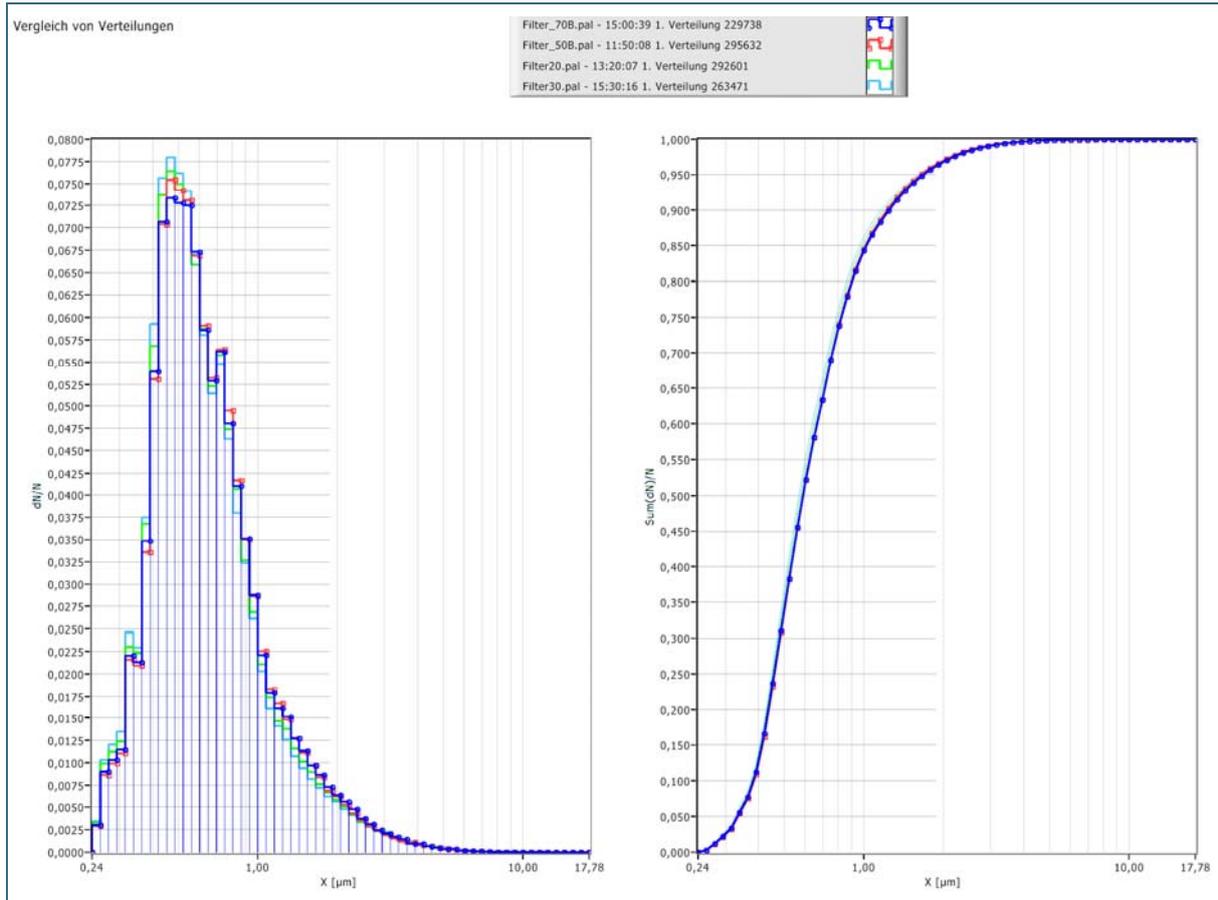


Abb. 46: Vergleich der Partikel-Anzahlverteilungen von Filtern der Reihen mit virus dotiertem Kot V1 (Filter 20; hellgrün) / V2 (Filter 30; hellblau) und V3 (Filter 50; rot) / V4 (Filter 70; blau) (s. Abschnitt 4.3)
 Erkennbar ist eine gute Konstanz der Partikelverteilung innerhalb jeder Messreihe und der beiden Reihen untereinander. Partikel mit Durchmessern von $< 0,6 \mu\text{m}$ trugen 50 % zur Gesamtpartikelanzahl bei; 90 % der Partikel hatten einen Partikeldurchmesser von unter $1,5 \mu\text{m}$

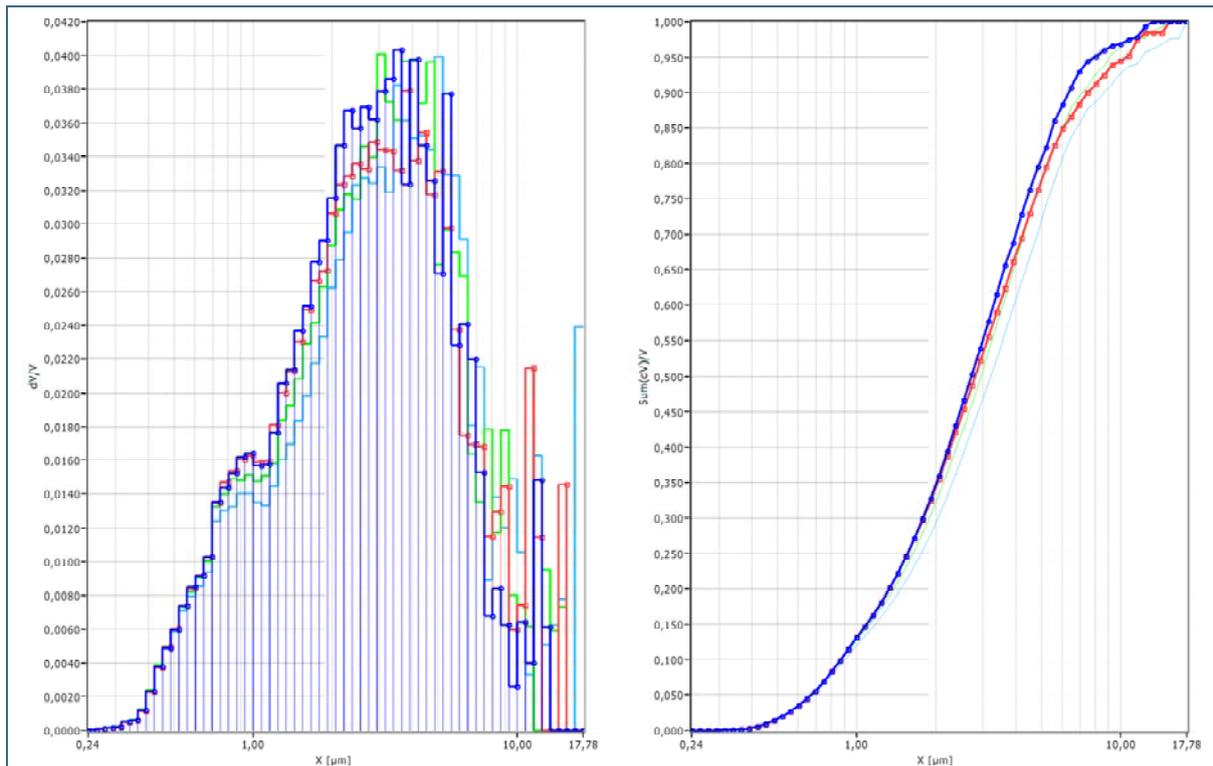


Abb. 47: Vergleich der Partikel-Volumenverteilungen von Filtern der Reihen mit Virus-dotiertem Kot V1 (Filter 20; hellgrün) / V2 (Filter 30; hellblau) und V3 (Filter 50; rot) / V4 (Filter 70; blau) (s. Abschnitt 4.3)
Schwankungen ergaben sich durch wenige große Partikel. Partikel mit Durchmessern von $< 3 \mu m$ trugen 50 % zum Gesamtpartikelvolumen bei.

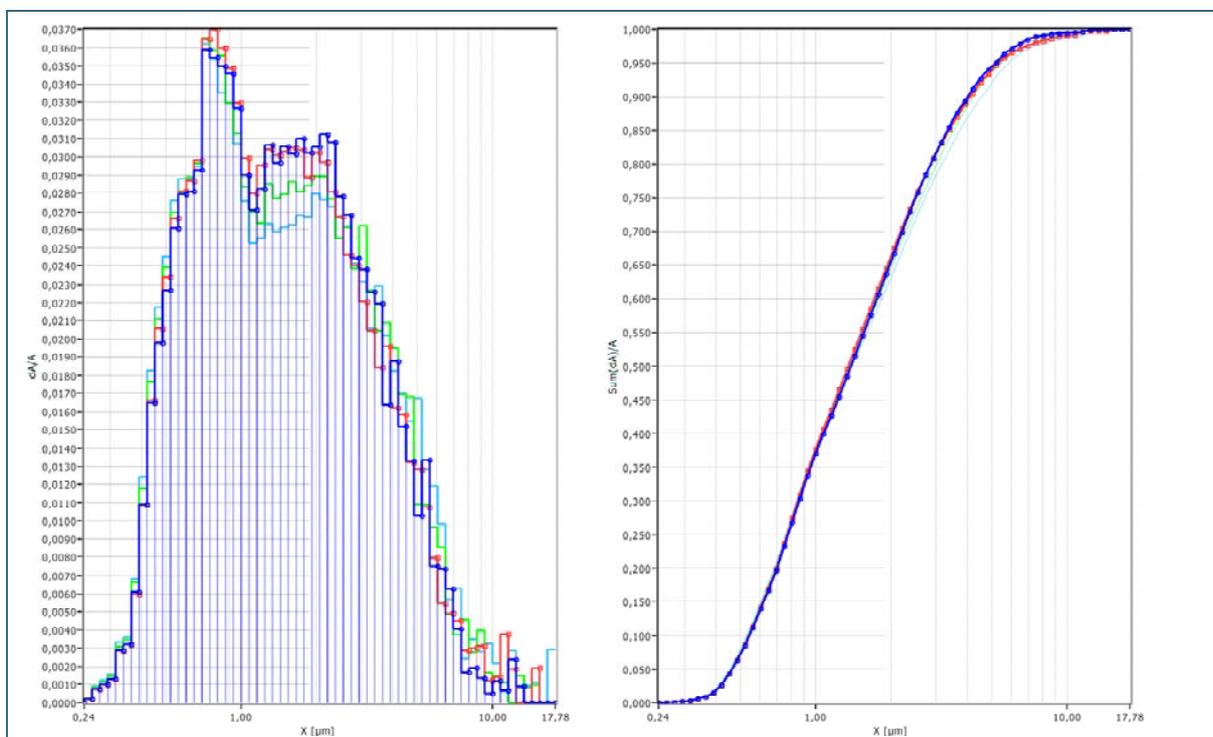


Abb. 48: Vergleich der Partikel-Flächenverteilungen von Filtern der Reihen mit Virus-dotiertem Kot V1 (Filter 20; hellgrün) / V2 (Filter 30; hellblau) und V3 (Filter 50; rot) / V4 (Filter 70; blau) (s. Abschnitt 4.3)
Partikel mit Durchmessern von $< 1,5 \mu m$ trugen 50 % zur Gesamtpartikelfläche bei; Partikel mit Durchmessern von $< 5 \mu m$ trugen 90 % zur Gesamtpartikelfläche bei.

4.3 Erzeugung und Lagerung von mit Viren dotierten Feinstaubfiltern

Die Erzeugung der mit Viren dotierten Feinstaubfilter fand mit der in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Konfiguration der Feinstaubapparatur ohne Impaktor statt (vgl. Abb. 30). Insgesamt wurden in der Aerosolapparatur an 7 Probenahmeterminen mit 11 angesetzten Suspensionen 391 Filter mit Viren beaufschlagt.

Alle Filter, die mit einem Aerosol derselben Suspension beaufschlagt wurden, wurden zu einer Versuchsreihe zusammengefasst. Einen Überblick über die durchgeführten Versuchsreihen zeigt die Tab. 14.

Tab. 14: Überblick der Probenahmedaten bei den Versuchsreihen zur Filterbeladung

Versuchsreihe	Datum	Konzentration Virenausgangslösung	Hühnerkotkonzentration	PBS-Lsg.	Filteranzahl	Probenahmedauer je Filter	pH-Wert
lfd. Nr.	TT:MM:JJJJ	µl/l	g/l	--	--	min	--
V1*	09.10.2007	10.000	50	--	21	5	7
V2*	09.10.2007	10.000	50	--	21	5	7
V3*	12.11.2007	20.000	50	--	12	5	6
V4*	12.11.2007	10.000	50	--	30	5	6
V5	21.01.2008	5.000	50	--	72	3	7
V6	29.01.2008	5.000	50	--	48	3	7
V7	03.03.2008	5.000	--	X	38	3	7
V8	03.03.2008	4.000	50	--	38	3	7
V9	08.04.2008	5.000	--	X	6	3	7
V10	08.04.2008	5.000	50	--	65	3	7
V11	30.05.2008	5.000	50	--	40	3	7

*: Lagerung der Filter in Kunststofftüten; alle anderen wurden in Falconröhrchen gelagert. PBS: Phosphate buffered saline

Die Probenahmezeit für die Versuchsreihen 1 bis 4 betrug je Filter 5 min, für die Versuchsreihen 5 bis 11 je Filter 3 min. Die Verkürzung der Probenahmezeit und die Verringerung der Virenkonzentration in den Versuchsreihen 5 bis 11 erfolgten aufgrund der Erfahrungen aus den Versuchsreihen 1 bis 4 (vgl. Ergebnisse im Abschnitt 4.5). Abb. 49 fasst die Beladungen der erzeugten Filter mit Feinstaub zusammen. Bei einer 5-minütigen Feinstaubprobenahme wurden erwartungsgemäß größere Staubmassen auf den Filtern abgeschieden (Mediane: V1: 4,8 mg; V2: 5,3 mg; V3: 5,2 mg; V4: 4,8 mg) als bei einer 3-minütigen Probenahme (Mediane: V5: 2,7 mg; V6: 1,8 mg; V8: 1,6 mg; V10: 2,5 mg; V11: 2,1 mg). Die niedrigsten Filterbeladungen wurden bei Einsatz einer Virus-dotierten PBS-Lösung anstelle einer Kotlösung erzielt (V7, V9). Bei einer 3-minütigen Probenahme lagen die Mediane der Filterbeladungen bei 0,7 mg pro Filter.

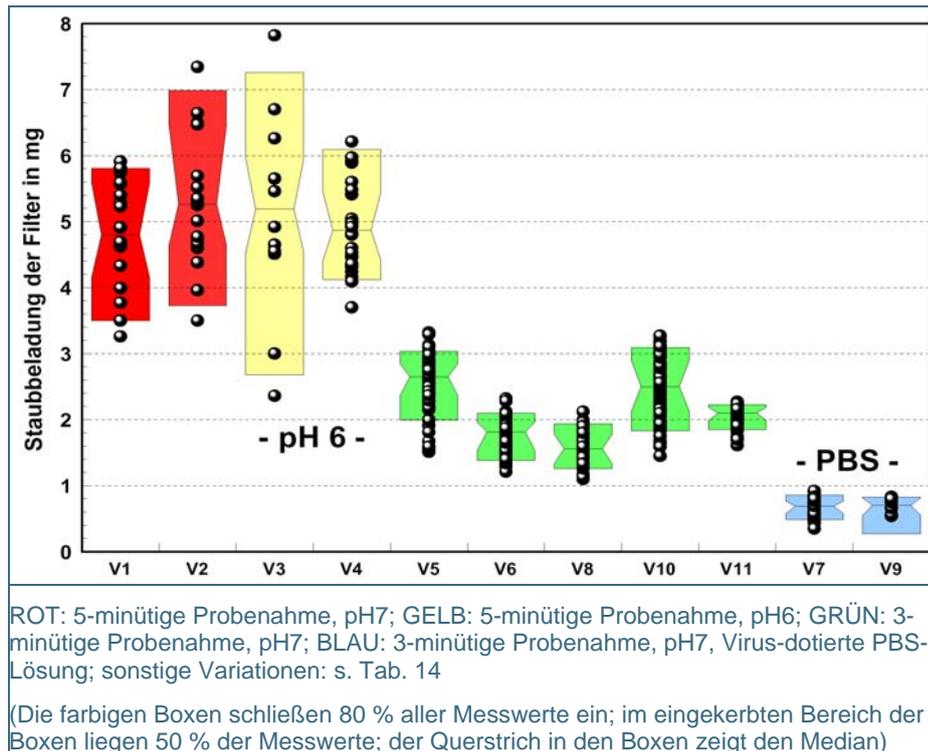
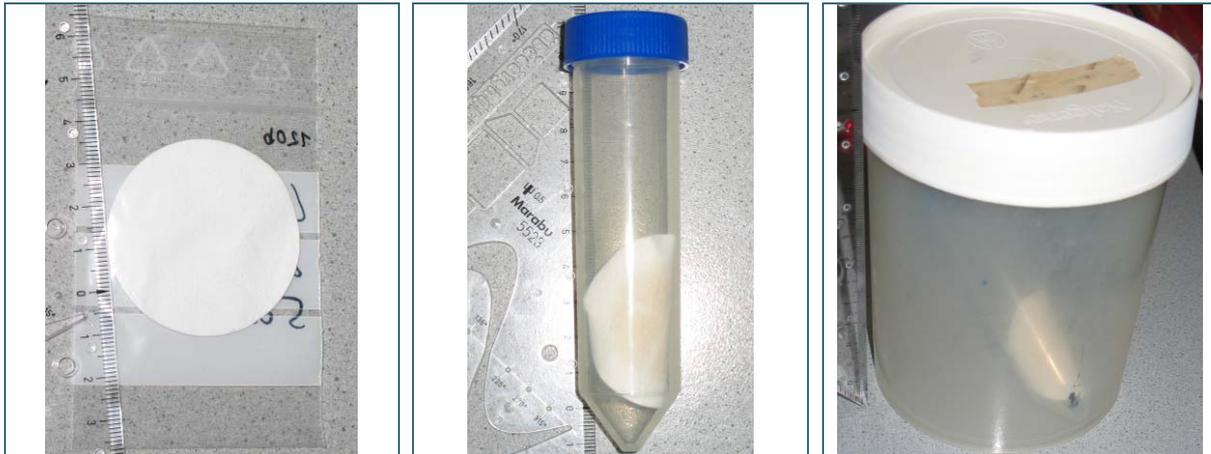


Abb. 49: Vergleich der Staubbelastung der erzeugten Filter

Zur Prüfung verschiedener Einflussfaktoren auf die Infektiosität der Viren im Feinstaub wurden insgesamt 10 Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurden die Filter nach deren Beaufschlagung mit virenbeladenem Feinstaub auf den Einfluss der Temperatur bei unterschiedlichen Lagerungszeiten und bei unterschiedlichem relativen Feuchtegehalt der Umgebungsluft untersucht. Zudem wurde die Stabilität der Viren bei unterschiedlichen pH-Werten in den Viren-Hühnerkotsuspensionen untersucht (V3 und V4). Die Filter wurden nach der Beaufschlagung den entsprechenden Lagerungsbedingungen ausgesetzt. Nach der vorgewählten Lagerungsdauer wurden die Filter zur Konservierung bei -70 °C eingefroren.

Eine **staubfeuchte Lagerung**, d. h. mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte, wurde zunächst erreicht, indem die Filter bei den Versuchsreihen 1 bis 4 in für Lebensmittel geeignete, verschließbare Kunststofftüten verpackt wurden. Bei der Bearbeitung zeigte sich jedoch, dass das Tütenmaterial mit dem Feinstaub verklebte und eine Entnahme des Feinstaubes erschwerte. Deshalb wurden die Filter bei den Reihen 5-10 in sterile Probengefäße, sogenannte Falconröhrchen („blue caps“), gelegt (vgl. Abb. 50).



In einem Kunststofftütchen
gelagerter Filter

Filter in einem Probengefäß
(Falconröhrchen)

Schraubdeckeldose mit Probenge-
fäß, das einen Filter enthält

Abb. 50: Varianten der Feinstaubfilterlagerung

Zur Realisierung einer **trockenen Lagerung** der Feinstaubfilter wurden die Probengefäße (Falconröhrchen) mit geöffnetem Deckel in Schraubdeckeldosen gestellt, die zusätzlich Silikagel enthielten. Das Silikagel nahm die Restfeuchte aus der Luft auf, sodass sich in der geschlossenen Schraubdeckeldose eine geringe Luftfeuchte einstellte.

Eine **feuchte Lagerung** der Feinstaubfilter in offenen Probengefäßen (Falconröhrchen) wurde folgendermaßen erreicht: Der Boden der Schraubdeckeldosen wurde mit einer ca. 1 cm hohen Wasserschicht bedeckt, sodass sich in der geschlossenen Dose eine wasserdampfgesättigte Atmosphäre einstellen konnte.

Die mit Virus-dotiertem Feinstaub beaufschlagten Filter wurden unmittelbar nach ihrer Herstellung in das jeweilige Probengefäß (Kunststofftüte oder Falconröhrchen) eingelegt und über die vorgewählte Dauer (0 bis 96 h) bei der gewählten Temperatur und Feuchte gelagert. Sofort danach wurden die Filter bei -70 °C eingefroren und erst für die jeweilige Untersuchung (Nachweis der Virus-RNA mittels PCR und/oder Prüfung der Virusinfektiosität im Brutei durch das LGL) wieder aufgetaut.

Die pH-Werte der für die Feinstaubherstellung genutzten Kot-Suspensionen wurden mit 0,10 molarer Salzsäure (HCl) auf pH 7,0 bzw. 6,0 eingestellt. Die Kot-Einwaage war bei allen Versuchsreihen zur Feinstaubherstellung aus Hühnerkot 50 g Trockensubstanz (TS) pro Liter, wobei die auf $\leq 63\text{ }\mu\text{m}$ abgeseibte Kotfraktion (s. 4.1.1) zum Einsatz kam. Daneben wurden auch Viren-haltige Aerosole hergestellt, mit denen geprüft werden sollte, ob die Virusstabilität im kotfreien Aerosol verändert ist. Bei diesen Versuchsreihen (V7 u. V9) wurden die Viren anstatt in einer Hühnerkotsuspension in einer mit Phosphat gepufferten Saline (PBS-Lösung¹⁹) dotiert.

Die für die Versuchsreihen hergestellten Volumina der im AGK 2000 eingesetzten Suspensionen lagen zwischen 25 und 125 ml. Das eingestellte Mengenverhältnis der Virenausgangslösung (Virusisolat des LGL) in der jeweiligen Kotsuspension ist in den Tabellen mit angegeben. Das Virusmaterial (s. 4.1.2) wurde bis unmittelbar vor der Herstellung der Virus-dotierten Suspensionen bei -70 °C gelagert.

¹⁹ PBS-Lösung: 8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na_2HPO_4 ; 0,24 g/l KH_2PO_4 ; pH 7.4

Die folgenden Tabellen enthalten nähere Angaben zu den einzelnen Versuchsreihen.

Tab. 15: Daten der Versuchsreihe 1 (V1) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, Lagerung am 09.10.2007

Lagerungstemperatur in °C	Lagerungs- dauer in h	Filterbezeichnung
-70	0	1, 2, 3
37	15	4, 5, 7
37	48	8, 9, 10
37	96	11, 12, 13
20	15	14, 15, 16
20	48	17, 18, 19
20	96	20, 21, 22
		Einheit
Anzahl der belegten Filter	21	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension	50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension	10.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter	5	min
Gesamte Probenahmedauer	02:40	hh:mm
pH-Wert	7	--

Tab. 16: Daten der Versuchsreihe 2 (V2) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, Lagerung am 09.10.2007

Lagerungstemperatur in °C	Lagerungs- dauer in h	Filterbezeichnung
-70	0	23, 24, 25
4	15	26, 27, 28
4	48	29, 30, 31
4	96	32, 33
-20	15	34, 35, 36
-20	48	37, 38, 39
-20	96	40, 41, 42, 43
		Einheit
Anzahl der belegten Filter	21	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension	50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension	10.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter	5	min
Gesamte Probenahmedauer	02:23	hh:mm
pH-Wert	7	--

Tab. 17: Daten der Versuchsreihe 3 (V3) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, Lagerung am 12.11.2007

Lagerungstemperatur in °C	Lagerungs- dauer in h	Filterbezeichnung
-70	0	44, 45, 46
-20	15	48, 49, 50
-20	48	51, 52, 53
-20	96	54, 55, 56
		Einheit
Anzahl der belegten Filter	12	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension	50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension	20.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter	5	min
Gesamte Probenahmedauer	01:17	hh:mm
pH-Wert	6	--

Tab. 18: Daten der Versuchsreihe 4 (V4) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, Lagerung am 12.11.2007

Lagerungstemperatur in °C	Lagerungs- dauer in h	Filterbezeichnung
-70	0	57, 58, 59
4	15	60, 61, 62
4	48	63, 64, 65
4	96	66, 67, 68
20	15	69, 70, 71
20	48	72, 73, 74
20	96	75, 76, 77
37	15	78, 79, 80
37	48	81, 82, 83
37	96	84, 85, 86
		Einheit
Anzahl der belegten Filter	30	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension	50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension	10.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter	5	min
Gesamte Probenahmedauer	03:06	hh:mm
pH-Wert	6	--

Tab. 19: Daten der Versuchsreihe 5 (V5) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, trockener und feuchter Lagerung am 21.01.2008

Temperatur in °C	Lagerungs-dauer in h	Staubfeuchte Lagerung (Filterbezeichnung)	Trockene Lagerung (Filterbezeichnung)	Feuchte Lagerung (Filterbezeichnung)
-70	0	1, 2, 3		
-20	15	4, 5, 6		
-20	48	7, 8, 9		
-20	96	10, 11, 12		
4	15	13, 14, 15		
4	48	16, 17, 18	22, 23, 24	28, 29, 30
4	96	19, 20, 21	25, 26, 27, 73	31, 33
20	15	34, 35, 36		
20	48	37, 38, 39		
20	96	40, 41, 42		
37	15	43, 44, 45		
37	48	46, 47, 48	52, 53, 54	58, 59, 60
37	96	49, 50, 51	55, 56, 57	61, 62, 63
50	15	64, 65, 66		
50	48	67, 68, 69		
50	96	70, 71, 72		
				Einheit
Anzahl der belegten Filter			72	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension			50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension			5.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter			3	min
Gesamte Probenahmedauer			05:40	hh:mm
pH-Wert			7	--

Tab. 20: Daten der Versuchsreihe 6 (V6) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, Lagerung am 29.01.2008

Lagerungstemperatur in °C	Lagerungs- dauer in h	Filterbezeichnung
-70	0	75, 76, 77
-20	15	78, 79, 80
-20	48	81, 82, 83
-20	96	84, 85, 86
4	15	87, 88, 89
4	48	90, 91, 92
4	96	93, 94, 95
20	15	96, 97, 98
20	48	99, 100, 101
20	96	102, 103, 104
37	15	105, 106, 107
37	48	108, 109, 110
37	96	111, 112, 113
50	15	114, 115, 116
50	48	117, 118, 119
50	96	120, 121, 122
		Einheit
Anzahl der belegten Filter	48	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension	50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension	5.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter	3	min
Gesamte Probenahmedauer	03:56	hh:mm
pH-Wert	7	--

Tab. 21: Daten der Versuchsreihe 7 (V7) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer mit Phosphat gepufferten Saline (PBS) nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, trockener und feuchter Lagerung am 03.03.2008

Temperatur in °C	Lagerungs- dauer in h	Staubfeuchte Lagerung (Filterbezeichnung)	Trockene Lagerung (Filterbezeichnung)	Feuchte Lagerung (Filterbezeichnung)
-70	0	1, 2		
4	48	3, 4	7, 8	11, 12
4	96	5, 6	9, 10	13, 14
20	48	15, 16	19, 20	23, 24
20	96	17, 18	21, 22	25, 26
37	48	27, 28	31, 32	35, 36
37	96	29, 30	33, 34	37, 38
				Einheit
Anzahl der belegten Filter			38	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension			50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension			5.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter			3	min
Gesamte Probenahmedauer			02:32	hh:mm
pH-Wert			7	--

Tab. 22: Daten der Versuchsreihe 8 (V8) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, trockener und feuchter Lagerung am 03.03.2008

Temperatur in °C	Lagerungs-dauer in h	Staubfeuchte Lagerung (Filterbezeichnung)	Trockene Lagerung (Filterbezeichnung)	Feuchte Lagerung (Filterbezeichnung)
-70	0	39, 40		
4	48	41, 42	45, 46	49, 50
4	96	43, 44	47, 48	51, 52
20	48	53, 54	57, 58	61, 62
20	96	55, 56	59, 60	63, 64
37	48	65, 66	69, 70	73, 74
37	96	67, 68	71, 72	75, 76
				Einheit
Anzahl der belegten Filter			38	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension			--	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension			4.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter			3	min
Gesamte Probenahmedauer			02:28	hh:mm
pH-Wert			7	--

Tab. 23: Daten der Versuchsreihe 9 (V9) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer mit Phosphat gepufferten Saline (PBS) ohne weitere Lagerung der Filter am 08.04.2008

Lagerungstemperatur in °C	Lagerungs-dauer in h	Filterbezeichnung
-70	0	1, 2, 3, 4, 5, 6
		Einheit
Anzahl der belegten Filter		6
Konzentration der Hühnerkotsuspension		--
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension		5.000
Belegungsdauer je Filter		3
Gesamte Probenahmedauer		00:20
pH-Wert		7

Tab. 24: Daten der Versuchsreihe 10 (V10) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, trockener und feuchter Lagerung am 08.04.2008

Temperatur in °C	Lagerungsdauer in h	Staubfeuchte Lagerung (Filterbezeichnung)	Trockene Lagerung (Filterbezeichnung)	Feuchte Lagerung (Filterbezeichnung)
-70	0	7, 8, 9, 10, 11		
4	48	12, 13, 14, 15, 16	17, 18, 19, 20, 21	22, 23, 24, 25, 26
4	96	27, 28, 29, 30, 31	32, 33, 34, 35, 36	37, 38, 39, 40, 41
20	48	42, 43, 44, 45, 46	47, 48, 49, 50, 51	52, 53, 54, 55, 56
20	96	57, 58, 59, 60, 61	62, 63, 64, 65, 66	67, 68, 69, 70, 71
				Einheit
Anzahl der belegten Filter			65	--
Konzentration der Hühnerkotsuspension			50	g/l
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension			5.000	µl/l
Belegungsdauer je Filter			3	min
Gesamte Probenahmedauer			05:00	hh:mm
pH-Wert			7	--

Tab. 25: Daten der Versuchsreihe 11 (V11) zur Ermittlung der Infektiosität der Viren in einer Hühnerkotsuspension nach staubfeuchter, d. h. mit Aerosolkammer-bedingter Restfeuchte, Lagerung am 30.05.2008

Temperatur in °C	Lagerungsdauer in h	Staubfeuchte Lagerung (Filterbezeichnung)
-70	0	1, 6, 11, 16, 21, 26, 31, 36
4	48	2, 7, 12, 17, 22, 27, 32, 37
4	96	3, 8, 13, 18, 23, 28, 33, 38
20	48	4, 9, 14, 19, 24, 29, 34, 39
20	96	5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40
		Einheit
Anzahl der belegten Filter		40
Konzentration der Hühnerkotsuspension		50
Konzentration der Virenausgangslösung in der Suspension		5.000
Belegungsdauer je Filter		3
Gesamte Probenahmedauer		03:00
pH-Wert		7

4.4 PCR-Analytik zum Nachweis von Influenza-Viren im Feinstaub

Im Rahmen des Vorhabens sollte ein PCR-basierter Nachweis für Influenza-Viren etabliert werden, mit dem sich die Viren im Feinstaub nachweisen lassen, der auf Quarzfaserfiltern unterschiedlichen Umweltbedingungen ausgesetzt war.

Wie unter 4.2.2.1 bereits ausgeführt, konnten mit der gewählten Versuchsanordnung maximal 5 mg Feinstaub auf den verwendeten Quarzfaserfiltern abgeschieden werden. Folglich stand für den Influenza-Nachweis nur eine geringe Feinstaubmasse zur Verfügung. Unbekannt war zudem, inwieweit die einzusetzenden Feinstaubfilter aus Quarzfasern Viren- und virale RNA adsorbieren und damit die Nachweiseffizienz senken. Unklar war auch, ob die kommerziell verfügbaren Extraktionskits für virale RNA durch Hühnerkotbestandteile und/oder Filterfasern beeinträchtigt werden. Dementsprechend sah die Etablierung des Influenza-Virus-Nachweis-Verfahrens für die Untersuchung von Hühnerkot-Feinstaub einige Voruntersuchungen vor, deren Ergebnisse in den Abschnitten 4.4.1 und 4.4.2.1 bis 4.4.2.5 zusammengefasst sind. Im Anschluss daran ist der etablierte Arbeitsgang für die Untersuchung der Feinstaubfilter auf Influenza-A-Viren sowie die dabei erzielten Ergebnisse zusammengefasst (4.4.2.7).

4.4.1 Überprüfung der RNA-Adsorption an Quarzfaserfiltern

Zur Klärung der Fragestellung wurden Fasern der Filter in Kontakt mit verschiedenen RNA-Standardlösungen gebracht. Nach kurzer Inkubation und anschließender Abtrennung der Quarzfasern wurde die verbliebene RNA-Konzentration in den Testansätzen mittels eines Fluoreszenzfotometers bestimmt und mit Kontrollansätzen ohne Quarzfaserzusatz verglichen. Wäre es zu einer Adsorption von RNA an den Quarzfasern gekommen, so hätten sich Minderbefunde bei den Ansätzen mit Quarzfasern im Vergleich zu den Kontrollen ergeben müssen.

Versuchsdurchführung

4 Reaktionsgefäße mit 2 ml Nennvolumen wurden mit je 1/8 Quarzfaserfilter befüllt. Die Einwaagen zeigt Tab. 26. Weitere 4 Reaktionsgefäße wurden als Kontrollen ohne Quarzfasern mitgeführt.

In die Reaktionsgefäße mit Quarzfasern wurden anschließend TE-Puffer und eine RNA-Standardlösung (ribosomale RNA aus *E. coli*) pipettiert²⁰. Die eingesetzten Volumina zeigt Tab. 26. In gleicher Weise wurden die Kontrollen mit TE-Puffer und RNA-Standardlösung versehen. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Quarzfasern mithilfe einer Minispinn-Zentrifuge über 10 Minuten bei 13.400 U/min abzentrifugiert. Je 100 µl des Überstands bzw. der Kontrolllösungen wurden pro well auf eine fluoreszenzgeeignete Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (wells) (BMG Labtech) in 3 Wiederholungen pipettiert. Je well wurden dann 100 µl Ribogreen-Fluoreszenzfarbstofflösung zugegeben. Nach Durchmischung der wells und 3 Minuten Inkubation im Dunkeln wurden die Fluoreszenzsignale mithilfe eines Fluorimeters (FLUOstar Galaxy von BMG Labtech) aufgenommen.

Die spezifischen Einwaagen lagen im Bereich von 0,11 bis 4,7 ng rRNA / mg Quarzfasern (Tab. 26). In diesem Konzentrationsbereich war keine Adsorption von rRNA an den für die Probenahme vorgesehenen Quarzfaserfiltern zu beobachten, wie die nahezu identischen Fluoreszenzsignale für die Quarzfaser-enthaltenden und die Kontrollansätze belegen (Abb. 51). Die unteren überprüften RNA-Konzentrationen lagen dabei in einem Bereich, wie er auch bei der Extraktion von Virus-dotierten Feinstaubfiltern erreicht wurde.

²⁰ beides Bestandteil des RiboGreen RNA Quantitation Kit (R-11490) von Molecular Probes

Tab. 26: Kenndaten des Vorversuchs zur RNA-Adsorption an Quarzfasern

Reaktionsgefäß	TE-Puffer Volumen (µl)	Standard-Lsg. Volumen (µl)	RNA-Konz. ng/ml	Masse Filterfasern in mg	Spez. Einwaage ng RNA/mg Faser
Blindwert	1000	0	0	0	0
S1	980	20	2	18,9	0,11
S2	900	100	10	16,8	0,59
S3	500	500	50	19,8	2,5
S4	0	1000	100	21,4	4,7

TE = Tris-EDTA

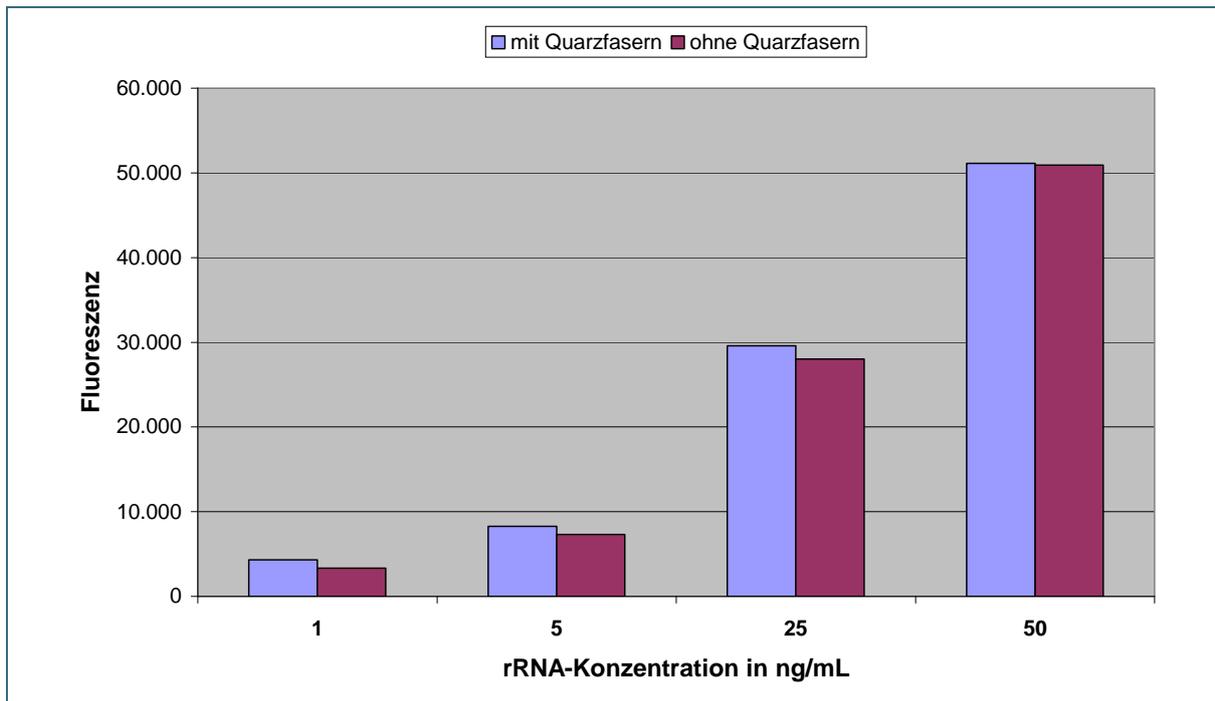


Abb. 51: Vergleich der Fluoreszenzsignale der Ansätze ohne bzw. mit Quarzfaserzusatz
 Beachte: Durch die Zugabe des Ribogreen-Farbstoffes wurden die geprüften RNA-Konzentrationen 1:2 verdünnt.

Ein weiterer Vorversuch mit wesentlich höheren RNA-Konzentrationen (20 bis 1000 ng/ml) lieferte ebenfalls keine Hinweise, dass RNA von den Filtern adsorbiert wird, sodass die Auswahl der Quarzfilter für die Feinstaubabtrennung aus der Luft beibehalten wurde.

4.4.2 Nachweis von Influenza-Virus-RNA

Für den PCR-Nachweis der Influenza-Viren in Feinstaub aus Hühnerkot wurde der von Applied Biosystems entwickelte TaqMan® Influenza A/H5/H7/N1 Detection Kit 2.0 ausgewählt; die Produktvariante PN 4384261 eignet sich zur Erfassung aller Influenza-A-Varianten, während andere Produktvarianten zusätzlich die H5/H7/N1-Varianten der Influenza-A-Viren unterscheiden können. Voraussetzung für die Anwendbarkeit des Testkits ist jedoch die Verfügbarkeit von viraler RNA in einer für die PCR tauglichen Qualität und Konzentration. Für die Extraktion der viralen RNA aus den Hühnerkot-Feinstäuben wurde der MagMAX™ AI/ND Viral RNA Isolation Kit ausgewählt, der ebenfalls von Applied Biosystems vertrieben wird. Es wurde nach den Angaben der Herstellerfirma für den Virusgenomnachweis im Feinstaub von Hühnerkot vorgegangen.

Das bifa betreibt ein ABI Prism 7000 Real-Time-PCR-Gerät von Applied Biosystems. Für die Untersuchungen wurden die Bestandteile des Kits und jeweils 10 µl pro Reaktion der mit den unter 4.4.2.1 beschriebenen Methodik erhaltenen RNA-Extrakte eingesetzt. Ansonsten wurden die vom Hersteller empfohlenen Geräteeinstellungen genutzt (Applied Biosystems, 2007).

Die Reagenzien des Kits enthielten zudem eine **interne Positivkontrolle**, die bei der PCR ebenfalls vervielfältigt wurde. Da hierbei ein anderer Fluoreszenzfarbstoff gebildet wurde, konnte die Vervielfältigung der beiden Moleküle gleichzeitig gemessen werden. Die interne Positivkontrolle dient dazu, falsch-negative Befunde des Influenza-A-Nachweises zu vermeiden: Wurde in einem Reaktionsgefäß keine Vermehrung der internen Positivkontrolle beobachtet und kein Hinweis für Influenza-A-Erbgut erhalten, lag eine Störung des Reaktionsansatzes vor und das Ergebnis war zu verwerfen. Wenn keine Störung des Reaktionsansatzes vorlag, sollten die Ct-Werte (Ct: cycle-time) der internen Positivkontrolle im Bereich 30-36 liegen.

Bei jedem PCR-Lauf wurden zudem **Negativkontrollen** mitgeführt: Bei diesen wurde anstelle eines RNA-Extraktes eine RNA-freie Wasserprobe dosiert. Ergaben sich bei der PCR bei diesen Reaktionsansätzen trotzdem Anhaltspunkte für eine Influenza-spezifische Amplifikation (Ct < 36), lag eine Kontamination der Reagenzien vor und das Ergebnis war zu verwerfen. Im Normalfall wurden Ct-Werte von 36 und größer beobachtet.

Zusätzlich wurden routinemäßig **externe Positivkontrollen** mitgeführt. Hierbei handelte es sich um Reaktionsansätze, in die 10 µl eines Influenza-A-Standards mit 1.000 Kopien/µl dosiert wurden. Wenn die PCR und die Reagenzien den Vorgaben des Herstellers entsprechend abliefen, wurden für die externen Positivkontrollansätze Ct-Werte von Ct = 30-32 erreicht.

PCR-Läufe wurden nur dann als gültig gewertet, wenn interne und externe Positivkontrollen und die Negativkontrollen plausible PCR-Ergebnisse lieferten.

Für die quantitative Auswertung der Ct-Befunde der Untersuchungsansätze wurde zunächst eine Kalibrierung des PCR-Nachweises mithilfe der von Applied Biosystems im Kit mit gelieferten Positivstandards durchgeführt. Das Ergebnis zeigt Abb. 52.

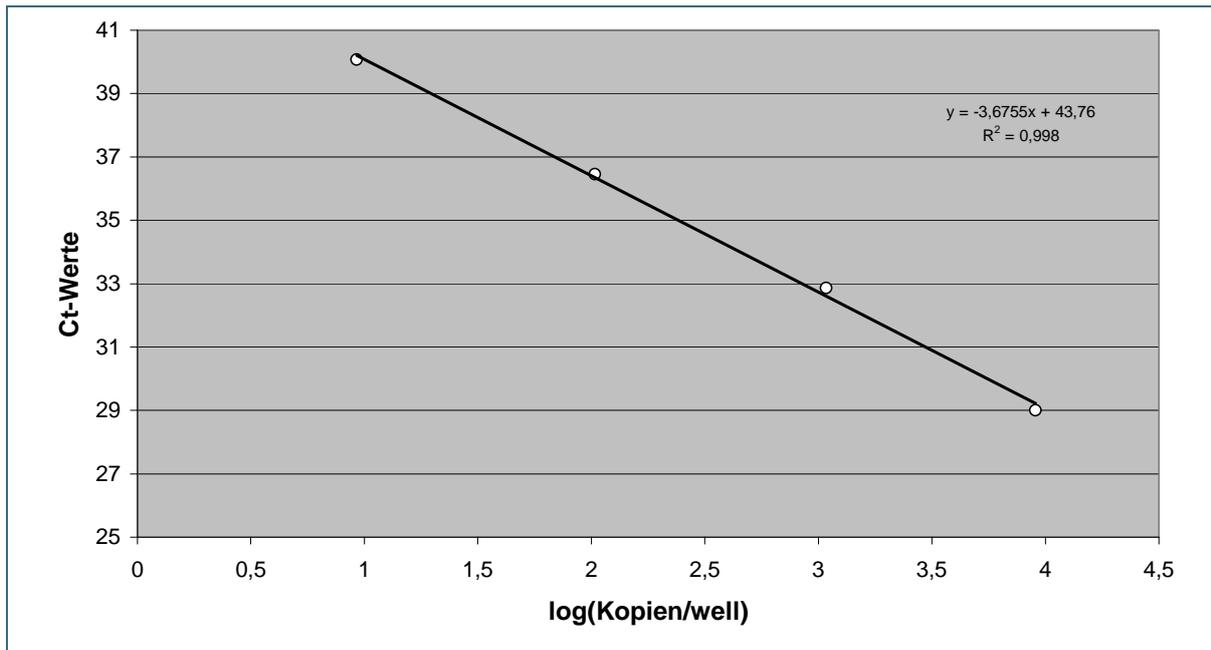


Abb. 52: Resultate der PCR mit verdünnten Ansätzen des Positivkontroll-Standards von Applied Biosystems. Der Positivkontrollstandard wurde 1:1 bis 1:1.000 verdünnt, sodass im PCR-Ansatz 10 bis 10.000 Kopien der Positivkontrolle vorlagen.

Laut Herstellerangaben sollten sich mindestens 100 Genomkopien der Influenza-RNA mit dem eingesetzten Testkit nachweisen lassen. Die Grafik deutet jedoch an, dass auch noch bis zu 10 Kopien der Positivkontroll-Nukleinsäure nachweisbar waren.

Mithilfe dieser Daten war es auch möglich, die Anzahl der Virusgenomkopien in der verwendeten H10N7-Influenza-Viruslösung abzuschätzen. Erst eine 10.000fach verdünnte Viruslösung ergab Ct-Werte, die von der in Abb. 52 dargestellten Standardkurve erfasst waren. Als Resultat wurden für die 10.000fach verdünnte Viruslösung eine Virusgenomkopienanzahl von 3.100 pro 10 µl Extrakt ermittelt. Im Gesamt-Extrakt von 400 µl unverdünnter Viruslösung waren demnach $1,6 \times 10^8$ Virusgenomkopien und in einem Milliliter der Virussuspension 4×10^8 Virusgenomkopien vorhanden.

Mithilfe dieser Daten wurde eine Kalibrierfunktion mit der Viruslösung erstellt, wobei eine dekadische Verdünnungsreihe bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} verarbeitet wurde. Das Ergebnis zeigt Abb. 53.

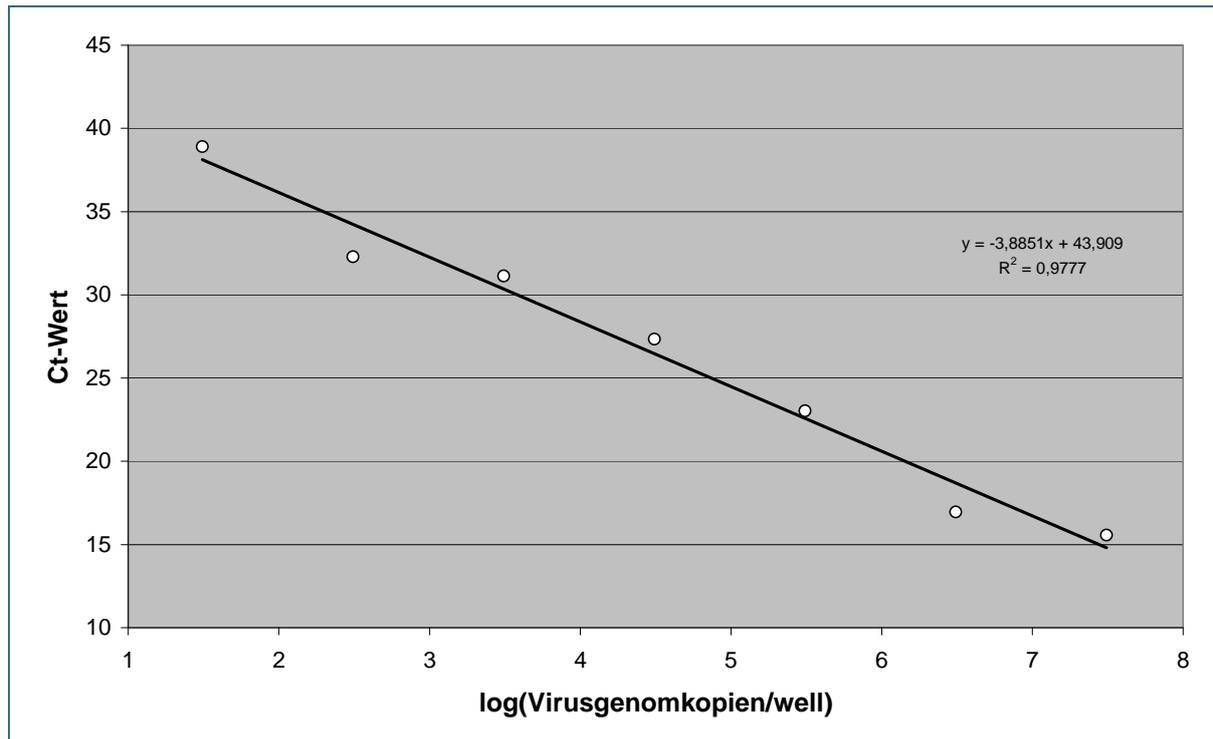


Abb. 53: Mit Verdünnungen der Viruslösung erstellte Kalibrierfunktion
Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Parallelansätzen sowie die resultierende Regressionsgerade

Über einen Bereich von $3,7 \times 10^1$ bis $3,7 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro well bzw. pro $10 \mu\text{l}$ Extrakt wurden auswertbare Ct-Werte erhalten. Mit diesen Ergebnissen war sichergestellt, dass sich mit der Nachweismethodik $1,4 \times 10^3$ bis $1,2 \times 10^9$ Virusgenomkopien pro Feinstaubfilter erfassen ließen. Erwartet wurden aufgrund der Vorabschätzungen Virusgenomkopienanzahlen von $1,6 \times 10^5$ bis $7,8 \times 10^5$ pro Feinstaubfilter, sodass die zu bestimmenden Werte im mittleren Arbeitsbereich der Nachweismethodik angeordnet waren.

Da die zu untersuchenden Feinstaubfilter Unikate waren, musste sichergestellt sein, dass der Virusgenomnachweis weder durch die Anwesenheit der Kotstaubpartikel noch durch das Quarzfasermaterial beeinträchtigt wurde. Deshalb wurden vor der Untersuchung der mit Feinstaub beaufschlagten Filter mögliche Störeinflüsse überprüft (s. 4.4.2.1 u. 4.4.2.2). Basierend auf den Ergebnissen dieser Voruntersuchungen wurde die Untersuchungsmethodik für die Feinstaubfilter abschließend festgelegt und mit ihr wurden sämtliche Feinstaubfilterproben bearbeitet (s. 4.4.2.7).

4.4.2.1 Nachweis von Influenza-Viren in Kotsuspensionen

Um den Einfluss von Hühnerkotbestandteilen auf die Viruswiederfindung zu prüfen, wurden 1:100 bis 1:10.000 verdünnte H10N7-Influenza-Virus suspensionen im Verhältnis 1:2 mit einer Kotsuspension mit 2 g TS/l gemischt. Die Virenkonzentration in diesen Lösungen lag dann ca. bei $1,9 \times 10^4$ bis $1,9 \times 10^6$ pro ml bzw. $1,9 \times 10^4$ bis $1,9 \times 10^6$ pro mg Kottrockensubstanz. Zusätzlich wurde ein Satz ohne Viruszusatz mitgeführt, mit dem überprüft wurde, ob das Nachweissystem falsch-positive Befunde für die Kotsuspension liefern würde.

Anschließend wurde aus den Suspensionen die Virus-RNA extrahiert und in der PCR eingesetzt. Das erhaltene Resultat zeigt Abb. 54.

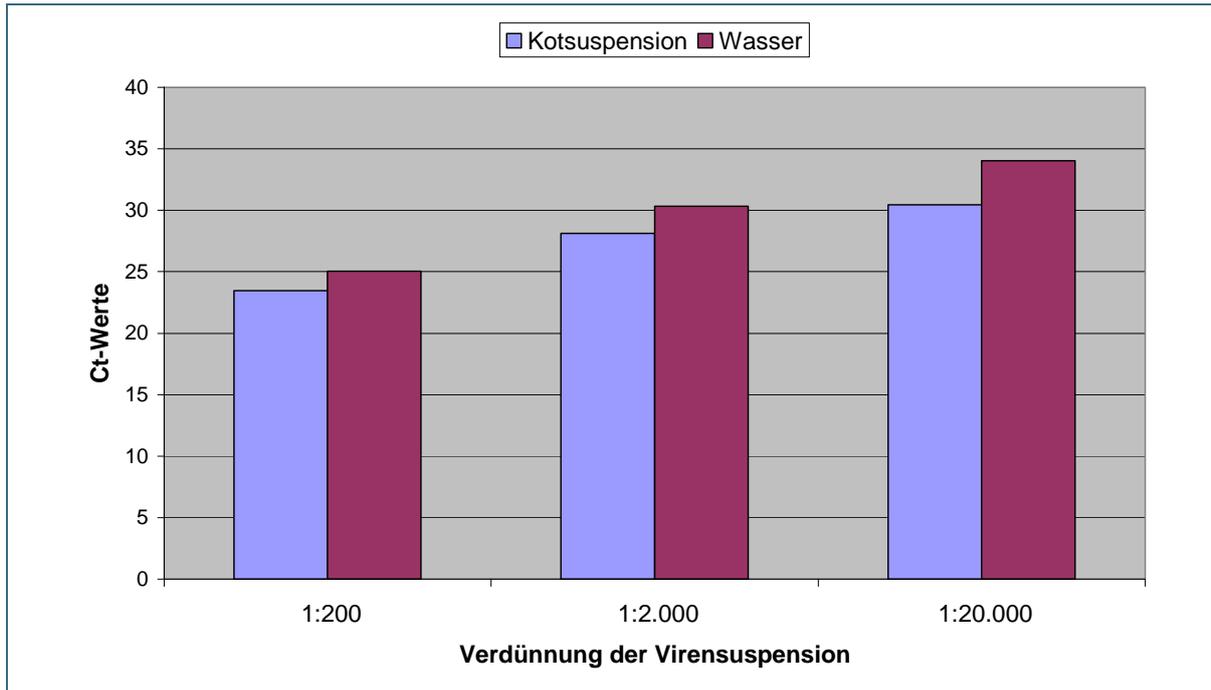


Abb. 54: Einfluss der Kotsuspension auf die in der PCR ermittelten Ct-Werte

Es wurde kein Verlust an Virus-RNA bei den Proben mit Kotsuspension festgestellt. Im Gegenteil: Es wurden sogar geringere Ct-Werte bei den Vogelkotproben und folglich höhere Mengen an Virus-RNA ermittelt als bei den in Reinstwasser verdünnten Virussuspensionen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Verdünnung der Virussuspension mit Reinstwasser bereits vor der RNA-Extraktion zur vorzeitigen Zerstörung von Viren und dem Zerfall der RNA geführt hatte, sodass sich in der Folge Minderbefunde für die in Reinstwasser verdünnten Proben ergaben. Diese These wird dadurch gestützt, dass die Minderbefunde bei höher verdünnten und damit salzärmeren Proben größer waren.

Die zusätzlich überprüfte Kotsuspension ohne Virusdotierung ergab einen Ct-Wert von 38,3 und lag damit jenseits der Werte, die typischerweise für Negativkontrollen erhalten wurden. Damit konnte für die untersuchte Kotprobe ausgeschlossen werden, dass falsch-positive Befunde erhalten wurden. Dies hatten bereits Untersuchungen des LGL gezeigt (s. 4.1.2).

4.4.2.2 Einfluss der Quarzfasern auf die Virusnachweisbarkeit

Obwohl unsere Untersuchungen mit freier RNA bereits gezeigt hatten, dass diese an den verwendeten Quarzfaserfiltern nicht signifikant adsorbiert wurde (s. 4.4.1), sollte eine weitere Untersuchungsreihe klären, ob dies auch auf Influenza-Viren zutrifft. Hierzu wurden Kotsuspension (1 g TS/l) mit Viren dotiert. Die Endkonzentrationen lagen bei $3,9 \times 10^2$ - $3,9 \times 10^4$ Virengenomkopien pro ml Kotsuspension. Aliquote der virushaltigen Kotsuspensionen wurden mit 30 mg Quarzfasern zerkleinerter Filter pro ml versetzt. Nach 15 min wurden die Quarzfasern abzentrifugiert und der Überstand zum Nachweis von suspendierten Influenza-Viren eingesetzt. Parallel dazu wurden virushaltige Kotsuspensionen aufgearbeitet, die nicht mit Quarzfasern versetzt waren. Die Ergebnisse der PCR sind in Abb. 55 zusammengefasst.

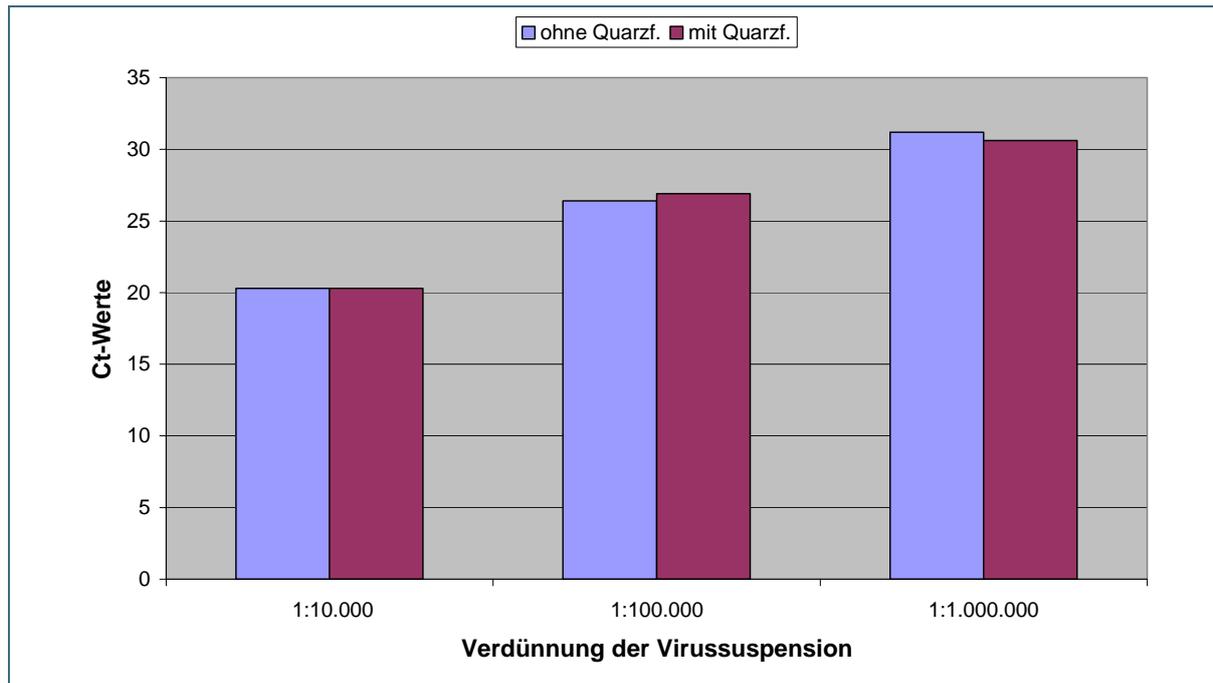


Abb. 55: Vergleich der PCR-Ergebnisse zum Nachweis von Influenza-Viren in Kotsuspensionen ohne bzw. mit Quarzfaserzusatz

Offensichtlich hatten die Quarzfasern keinen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Influenza-Viren, da weder die Viren noch RNA (s. 4.4.1) von den Quarzfaserfiltern irreversibel adsorbiert wurden.

4.4.2.3 Überprüfung von Extraktionsverfahren zum Influenza-Nachweis in Feinstaubfiltern

Da eine große Stückzahl von Feinstaubfiltern zu untersuchen war, wurden 3 Filterextraktionsvarianten hinsichtlich der Nachweiseffizienz von Influenza-Viren und dem damit verbundenen Arbeitsaufwand überprüft. Primär wurde untersucht, ob sich die Resultate einer Filterextraktion mit PBS-Lösung bei einer 30-minütigen und einer 24-stündigen Extraktionszeit wesentlich unterschieden (Methode A). In Anlehnung an Rutjes et al. (2006) wurde zusätzlich abgeklärt, ob nach einer nur 15-minütigen Extraktion der Filter mit PBS-Lösung und einer anschließenden Polyethylenglykol (PEG)/NaCl-Präzipitation der Viren eine Anreicherung der Influenza-Viren im Extrakt gelang (Methode B).

Arbeitsgang der Methode A:

- Materialien und Lösungen
 - Falconröhrchen 15 ml, autoklaviert mit lose aufgesetztem Deckel
 - PBS-Puffer (8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,44 g/l Na₂HPO₄; 0,24 g/l KH₂PO₄; ad 1.000 ml mit A. dest., pH 7.4), autoklaviert
 - Heraeus Megafuge 1.0 R
 - abgeflamnte Pinzette
 - 1,5 ml Eppendorf-Tubes, RNase-frei
- Durchführung
 - Auftauen der bei -70 °C gelagerten Filter bei + 4 °C, mindestens 30 min
 - Falconröhrchen (15 ml, schmal) mit Filterbezeichnung beschriften
 - Filter mit abgeflammter Pinzette bis zum Boden des Falconröhrchens schieben (Vorsicht: Filter zerreißen leicht)

- 3 ml PBS-Puffer in das Filterlagergefäß pipettieren, aus dem der Filter entnommen wurde
- Filterlagergefäß ausschwenken und Puffer vollständig in das Falconröhrchen überführen
- Falconröhrchen verschließen und 1 min vortexten (solange bis Filter zerfällt)
- Extraktion der Viren von den Quarzfasern durch Inkubation auf einem Schüttler bei 4 °C, für 30 min bzw. 24 h
- 5 min Zentrifugieren bei 6000 x g und 4 °C (Tischzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R)
- Überstand vollständig in RNase-freies Eppendorfgefäß (2 ml-Größe) abnehmen, daraus 400 µl in RNase-freies Eppendorfgefäß (1,5 ml-Größe) pipettieren und bis zur Weiterverarbeitung (am selben Tag) auf Eis lagern. Überstand muss faserfrei sein und zügig von der Filtermasse abgenommen werden. Die größeren Eppendorfgefäße mit dem nicht benötigten Überstand beschriften und als Rückstellprobe (Rohextrakt=RE) sofort bei -70 °C einfrieren.

Der Arbeitsgang von Methode A wurde für die Methode B weitgehend unverändert übernommen, doch wurde die Extraktionszeit auf 15 min reduziert. Daran anschließend wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt, mit denen eine zusätzliche Virusanreicherung erreicht werden sollte:

Ergänzende Arbeitsschritte der Methode B:

- PBS-Filterextrakt komplett in ein 50 ml Falconröhrchen überführen
- Auffüllen mit PBS auf 5 ml
- Hinzufügen von 1 ml PEG/NaCl; die PEG/NaCl-Lösung bestand aus 20 % w/v) PEG und 2,5 Mol/l NaCl
- Inkubieren auf dem Schüttler für 2 h bei 4 °C
- 30 min Zentrifugieren in Heraeus Suprafuge 22 bei 10.000 x g und 4 °C
- Der Überstand wird dekantiert und verworfen
- Das Virus-haltige Pellet wird in 400 µl PBS-Lösung aufgenommen, in ein RNase-freies Eppendorfgefäß (1,5 ml-Größe) pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung (am selben Tag) auf Eis gelagert.

Die Ergebnisse in Abb. 56 verdeutlichen, dass die PEG/NaCl-Präzipitation der Methode B bei der Extraktion der Feinstaubfilter nicht zielführend war. Im Vergleich zu den mit der Methode A erzielten Ergebnissen bei 24-stündiger Extraktion lagen die mit der Methode B erzielten Befunde auf einem um 2 Zehnerpotenzen niedrigeren Niveau. Die Methode B wurde deshalb verworfen.

Der Vergleich der Ergebnisse, die mit der weniger arbeitsaufwendigen Methode A und 30-minütiger Extraktion erzielt wurden, mit den Befunden der 24-stündigen Extraktion, verdeutlicht, dass die länger andauernde Extraktion bei der Aufarbeitung der Feinstaubfilter keine signifikanten Mehrbefunde lieferte (Abb. 57).

Deshalb wurden alle Feinstaubfilterproben für den PCR-Nachweis von Influenza-A-Viren mit der Filterextraktionsmethode A und 30-minütiger Extraktionszeit verarbeitet.

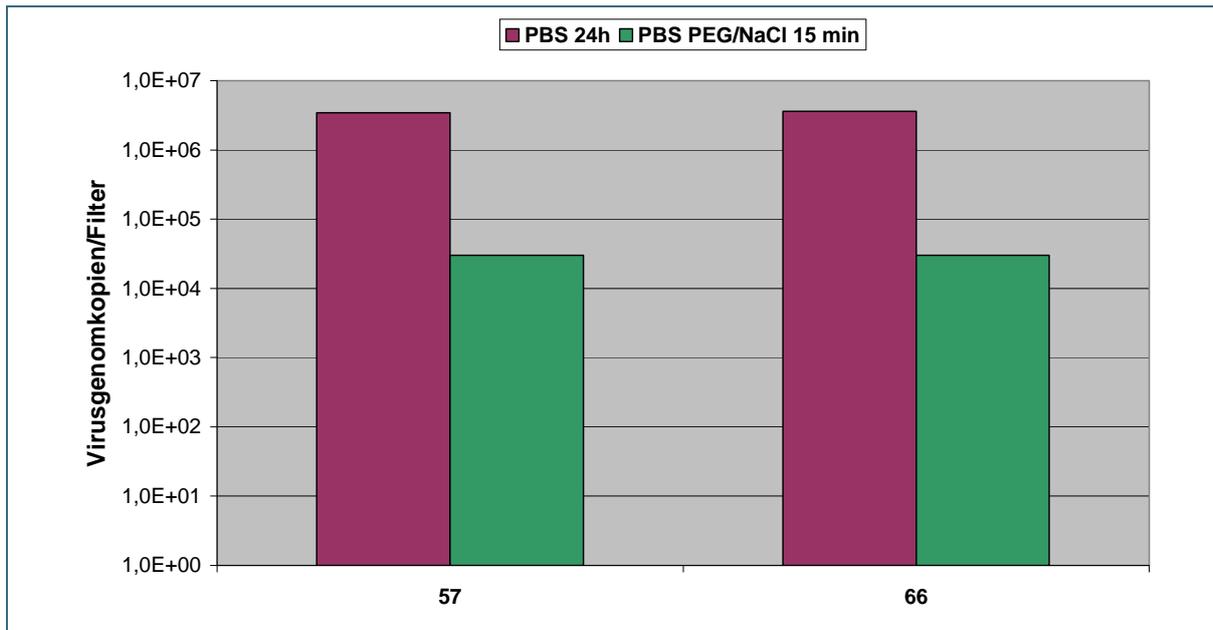


Abb. 56: Vergleich der Nachweiseffizienz von Methode A (24-stündige Extraktion mit PBS) und Methode B (15-minütige Extraktion u. PEG/NaCl-Behandlung)
Überprüft wurde die Virusbeladung von 2 Quarzfaserfiltern (57: -70 °C, 0 h; 66: 4 °C, 96 h) aus Versuch V4 vom 12.11.2007, die mit Influenza-dotiertem Feinstaub aus Hühnerkot beaufschlagt waren.

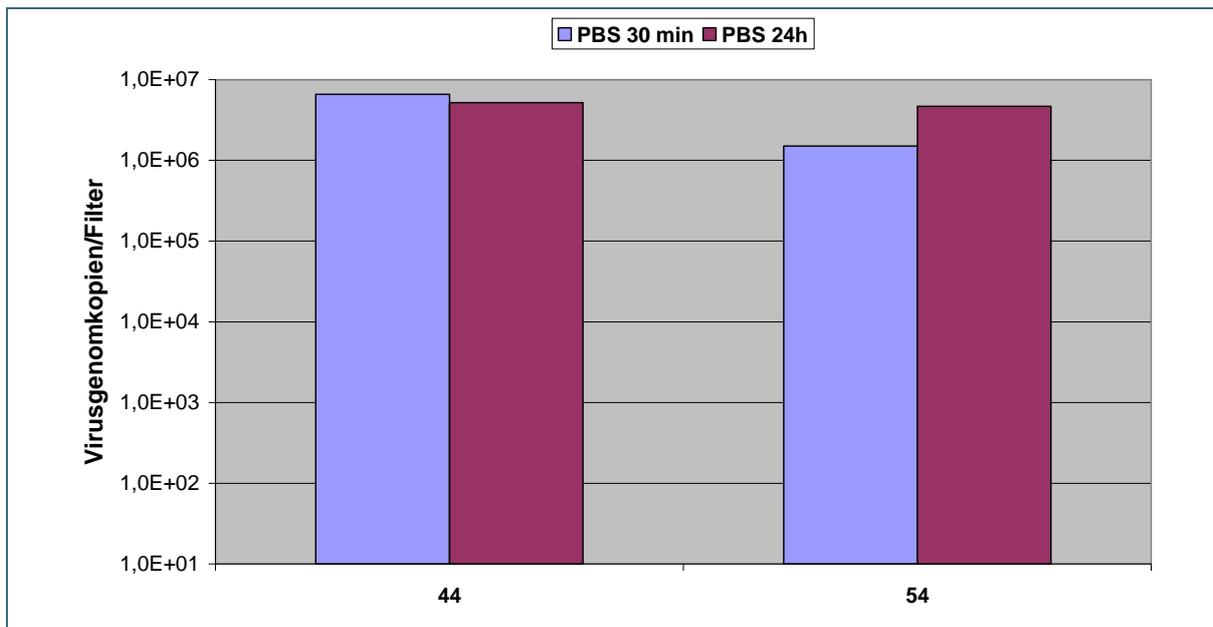


Abb. 57: Vergleich der Nachweiseffizienz von Methode A mit 30-minütiger und 24-stündiger Extraktion
Überprüft wurde die Virusbeladung von 2 Quarzfaserfiltern (44: -70 °C, 0 h; 54: -20 °C, 96 h) aus Versuch V3 vom 12.11.2007, die mit Influenza-dotiertem Feinstaub aus Hühnerkot beaufschlagt waren.

4.4.2.4 Nachweis von Influenza-Viren in Allantoisflüssigkeit

Die Infektiosität der auf den Feinstaubfiltern bei unterschiedlichen Umweltbedingungen gelagerten Influenza-Viren wurde vom LGL mithilfe der Brutei-Nachweismethodik bestimmt.

Im Rahmen dieser Arbeiten fielen Proben mit Allantoisflüssigkeit aus dem Brutei an. Mit einigen dieser Allantoisflüssigkeiten wurde geprüft, ob die vom bifa genutzte PCR-Nachweismethodik auch auf diese

Proben anwendbar war. Zu diesem Zweck wurden die Allantoisflüssigkeiten mit RNase-freiem Reinstwasser 1:100 vorverdünnt. Anschließend wurden 400 µl für die unter 4.4.2.1 beschriebene RNA-Extraktion eingesetzt. Die dabei erhaltenen 50 µl RNA-Extrakt wurden mit dem unter 4.4.2.2 beschriebenen Influenza-spezifischen PCR-Nachweiskit untersucht.

Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tab. 27 zusammengefasst. Die Daten zeigen, dass bei diesen Versuchsreihen in allen untersuchten Proben der Allantoisflüssigkeiten sehr hohe Virusgenomkopieanzahlen in der PCR ermittelt wurden. Die für den RNA-Extrakt angegebenen Ct-Werte wurden so umgerechnet, dass diese Werte erreicht worden wären, wenn die Probe unverdünnt verarbeitet worden wäre. Diese Umrechnung sollte den Ergebnisvergleich mit Befunden des LGL erleichtern. Da vom bifa und dem LGL jedoch unterschiedliche RNA-Extraktionsverfahren und PCR-Systeme benutzt wurden, sind die vom LGL und bifa ermittelten Ct-Werte nicht vergleichbar.

Tab. 27: Ergebnisse der PCR-Untersuchung von Allantoisflüssigkeitsproben auf Influenza-A-Viren

Probe	Lagerungs- temperatur	Lagerungs- dauer	Lagerungs- feuchte	Ct-Werte RNA-Extrakt	Anzahl von Virusgenomkopien in der Allantoisflüssigkeit
	°C	h	--	--	1/ml
Versuchsreihe V1 - 09.10.07 / Lagerung in Kunststoffütten / pH 7,0					
All-3	-70	0	Staubfeucht	12,8	1,3E+09
All-4	37	15	Staubfeucht	13,6	7,9E+08
All-8	37	48	Staubfeucht	13,9	6,8E+08
All-13	37	96	Staubfeucht	13,8	6,9E+08
All-14	20	15	Staubfeucht	11,6	2,6E+09
All-17	20	48	Staubfeucht	11,5	2,7E+09
All-22	20	96	Staubfeucht	11,1	3,5E+09
Versuchsreihe V2 - 09.10.07 / Lagerung in Kunststoffütten / pH 7,0					
All-25	-70	0	Staubfeucht	12,2	1,9E+09
All-27	4	15	Staubfeucht	12,3	1,7E+09
All-30	4	48	Staubfeucht	12,9	1,2E+09
All-38	-20	48	Staubfeucht	11,6	2,5E+09
All-43	-20	96	Staubfeucht	11,0	3,7E+09
All-34	-20	96	Staubfeucht	12,8	1,3E+09
Versuchsreihe V3 - 12.11.07 / Lagerung in Kunststoffütten / pH 6,0					
All-46B	-70	0	Staubfeucht	15,2	3,0E+08
All-50B	-20	15	Staubfeucht	7,0	4,1E+10
All-53B	-20	48	Staubfeucht	11,6	2,5E+09
All-56B	-20	96	Staubfeucht	12,5	1,6E+09
Versuchsreihe V4 - 12.11.07 / Lagerung in Kunststoffütten / pH 6,0					
All-59B	-70	0	Staubfeucht	12,5	1,5E+09
All-62B	4	15	Staubfeucht	11,9	2,1E+09
All-65B	4	48	Staubfeucht	9,1	1,1E+10
All-68B	4	96	Staubfeucht	8,2	1,9E+10
All-71B	20	15	Staubfeucht	17,4	8,2E+07
All-74B	20	48	Staubfeucht	15,6	2,4E+08
All-77B	20	96	Staubfeucht	12,4	1,6E+09
All-80B	37	15	Staubfeucht	15,6	2,4E+08
All-83B	37	48	Staubfeucht	15,9	2,0E+08
All-86B	37	96	Staubfeucht	14,7	4,1E+08
All-KotA				16,6	1,4E+08
All-KotB				16,2	1,7E+08

All-KotA: Allantoisflüssigkeit, die mit der Kotsuspension A geprüft wurde (20 µl Viruslösung pro ml Kotlösung);
 All-KotB: Allantoisflüssigkeit, die mit der Kotsuspension B geprüft wurde (10 µl Viruslösung pro ml Kotlösung)

4.4.2.5 Elution von Feinstaubfiltern und Virusextraktion

In Tab. 29 bis Tab. 34 sind die Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Genomkopien von Influenzaviren auf den Filtern zusammengefasst. Bei Untersuchungsreihen V1 bis V4 wurden direkt 0,4 ml des Filterrohextraktes (die Filter wurden mit 3 ml PBS-Lösung extrahiert) für die RNA-Extraktion eingesetzt. Ab Filterreihe V5 wurden die Filterrohextrakte 1:50 mit RNase-freiem Wasser vorverdünnt und anschließend für die RNA-Extraktion eingesetzt. Die resultierenden RNA-Konzentrationen waren mit der PCR noch immer sehr gut erfassbar. Auf diese Weise blieben zudem Rückstellproben erhalten, die eine Wiederholung des Virusnachweises bei Bedarf möglich machten.

Auf Basis der in Tab. 14 aufgeführten Daten und einer Virusgenomkopienanzahl von 4×10^8 pro ml Virussuspension wären formal Virusanzahlen pro mg Kottrockensubstanz von 8×10^4 bis 4×10^5 zu erwarten gewesen. Dieser Abschätzung lag jedoch die Annahme zugrunde, dass die Viren gleichmäßig über die Partikelmassen verteilt vorliegen würden. Plausibler erschien jedoch die Annahme, dass die Viren bevorzugt von kleinen Partikeln adsorbiert wurden, die sehr große Oberflächen bezogen auf die Partikelmasse hatten. Vom Aerosolgenerator AGK 2000 wurden vorzugsweise kleinere Partikel aerosolisiert; Partikel mit $> 15 \mu\text{m}$ Partikelgröße wurden gänzlich zurückgehalten. Außerdem überführt der Aerosolgenerator auch Viren in die Luft, die in partikelarmen Flüssigkeitströpfchen enthalten waren. Nach dem Trocknen dieser Tröpfchen, waren Partikel mit sehr hohen Virenanzahlen pro Partikelmasse entstanden. Auf Basis dieser Annahmen waren die durchgehend sehr hohen Anzahlen von Virusgenomkopien pro Filter (s. Abb. 58 und Tab. 28) plausibel.

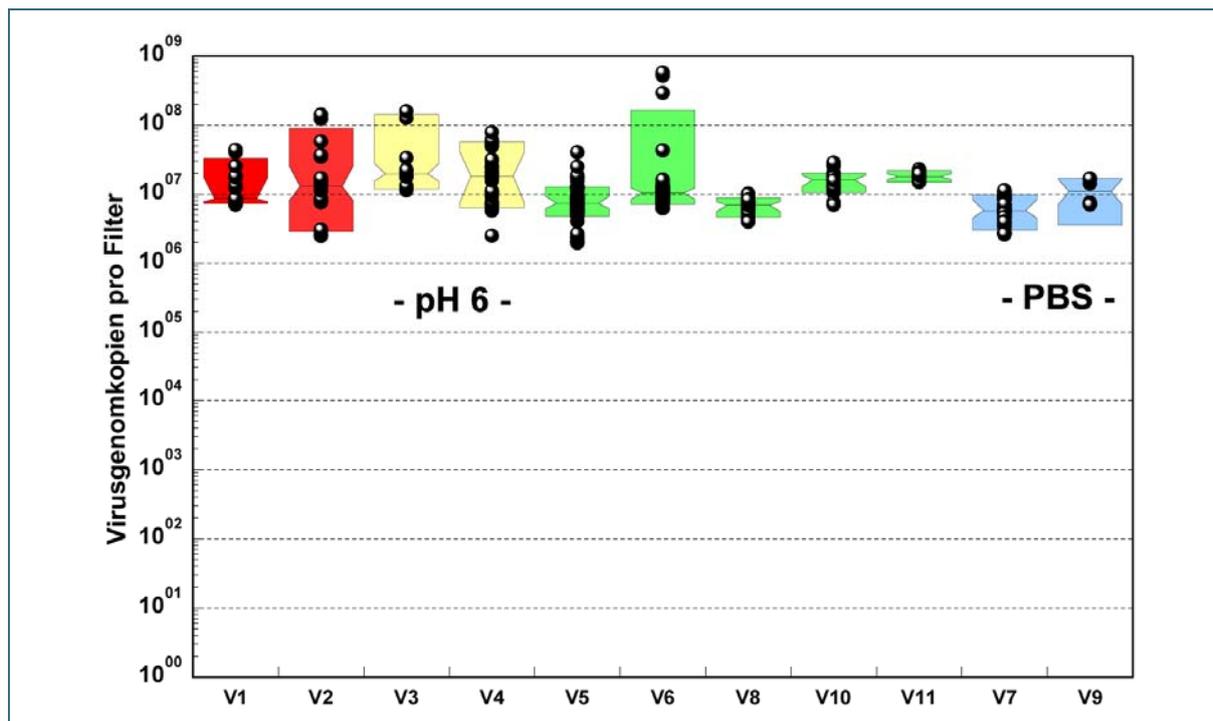


Abb. 58: Mithilfe der PCR auf den Feinstaubfiltern nachgewiesene Genomkopien an Influenza-A-Viren (in Genomkopien/Filter)

ROT: 5-minütige Probenahme, pH7; GELB: 5-minütige Probenahme, pH6; GRÜN: 3-minütige Probenahme, pH7; BLAU: 3-minütige Probenahme, pH7, Virus-dotierte PBS-Lösung; sonstige Variationen: s. Tab. 14

(Die farbigen Boxen schließen 80 % aller Messwerte ein; im eingekerbten Bereich der Boxen liegen 50 % der Messwerte; der Querstrich in den Boxen zeigt den Median)

Tab. 28: Wertebereiche der mithilfe der PCR auf den Feinstaubfiltern nachgewiesenen Genomkopien an Influenza-Viren (in 10^6 Genomkopien/Filter)

Perzentile	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V8	V10	V11	V7	V9
10 %	7,4	3,1	13	6,6	4,9	7,3	4,8	11	15	3,3	7,1
25 %	8,0	8,3	17	8,1	6,2	8,6	5,8	13	17	4,6	7,2
Median	8,6	13	20	18	7,4	10	6,9	16	18	5,8	11
75 %	18	17	25	31	9,4	12	7,7	19	20	8,3	16
90 %	25	58	118	56	13	30	8,6	20	21	9,7	17

Die am 09.10.2007 erzeugten Filter der Reihen V1 und V2 wiesen im Mittel 5,1 mg Feinstaub pro Filter auf. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $3,1 \times 10^6$ bis $5,8 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter. Die Medianwerte lagen bei $8,6 \times 10^6$ (V1) bzw. $1,3 \times 10^7$ (V2) Virusgenomkopien pro Filter.

Tab. 29: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V1

Reihe V1	Filter 2	Filter 5	Filter 9	Filter 12	Filter 15	Filter 18	Filter 21
A	1,8E+07	7,6E+06	8,1E+06	4,4E+07	1,8E+07	8,0E+06	2,5E+07
B	7,4E+06	8,1E+06	8,7E+06	4,0E+07	7,1E+06	7,0E+06	1,2E+07
C	7,6E+06	8,4E+06	8,6E+06	1,3E+07	8,6E+06	8,6E+06	1,7E+07
Mittelwert	1,1E+07	8,0E+06	8,5E+06	3,3E+07	1,1E+07	7,9E+06	1,8E+07

Tab. 30: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V2

Reihe V2	Filter 24	Filter 26	Filter 29	Filter 33	Filter 35	Filter 37	Filter 41
A	1,4E+07	1,6E+07	7,6E+06	1,4E+08	8,3E+06	3,1E+06	5,8E+07
B	1,3E+07	1,6E+07	8,7E+06	1,2E+08	8,0E+06	2,5E+06	3,7E+07
C	1,1E+07	1,5E+07	8,4E+06	3,5E+07	8,3E+06	2,7E+06	1,7E+07
Mittelwert	1,3E+07	1,5E+07	8,2E+06	1,0E+08	8,2E+06	2,7E+06	3,7E+07

Die am 12.11.2007 erzeugten Filter der Reihen V3 und V4 wiesen im Mittel 5,0 mg Feinstaub pro Filter auf. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $6,6 \times 10^6$ bis $1,2 \times 10^8$ Virusgenomkopien pro Filter. Die Medianwerte lagen bei $2,0 \times 10^7$ (V3) bzw. $1,8 \times 10^7$ (V4) Virusgenomkopien pro Filter.

Reihe V3	Filter 44	Filter 48	Filter 51	Filter 54
A	1,3E+08	1,3E+07	1,8E+07	2,1E+07
B	1,6E+08	1,3E+07	1,8E+07	2,3E+07
C	3,3E+07	1,1E+07	1,8E+07	2,2E+07
Mittelwert	1,1E+08	1,2E+07	1,8E+07	2,2E+07

Tab. 31: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V3

Reihe V4	Filter 57	Filter 60	Filter 63	Filter 66	Filter 69
A	2,1E+07	2,5E+06	7,6E+06	6,1E+07	1,1E+07
B	7,9E+07	5,7E+06	6,7E+06	5,6E+07	1,1E+07
C	5,9E+07	6,1E+06	7,0E+06	4,9E+07	1,1E+07
Mittelwert	5,3E+07	4,8E+06	7,1E+06	5,5E+07	1,1E+07
Reihe V4	Filter 72	Filter 75	Filter 78	Filter 81	Filter 84
A	2,1E+07	1,9E+07	7,0E+06	1,8E+07	2,5E+07
B	1,6E+07	5,3E+07	9,3E+06	1,7E+07	3,2E+07
C	2,4E+07	3,0E+07	7,6E+06	2,6E+07	5,0E+07
Mittelwert	2,0E+07	3,4E+07	8,0E+06	2,0E+07	3,6E+07

Tab. 32: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V4

Die am 21.01.2008 erzeugten Filter der Reihe V5 wiesen im Mittel 2,6 mg Feinstaub pro Filter auf. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $4,9 \times 10^6$ bis $1,3 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter. Der Medianwert lag bei $7,4 \times 10^6$ (V5) Virusgenomkopien pro Filter.

Tab. 33: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V5

Reihe V5	Filter 01	Filter 04	Filter 07	Filter 10	Filter 13	Filter 16
A	4,0E+06	5,3E+06	6,0E+06	6,1E+06	1,7E+07	5,6E+06
B	4,9E+06	5,2E+06	6,2E+06	6,5E+06	1,8E+07	6,5E+06
C	1,5E+07	4,7E+06	6,4E+06	6,2E+06	1,9E+07	7,6E+06
Mittelwert	8,1E+06	5,1E+06	6,2E+06	6,3E+06	1,8E+07	6,6E+06
	Filter 19	Filter 22	Filter 25	Filter 28	Filter 31	Filter 34
A	5,6E+06	6,6E+06	1,3E+07	6,6E+06	8,9E+06	5,7E+06
B	6,9E+06	8,3E+06	1,3E+07	7,0E+06	8,3E+06	5,3E+06
C	5,9E+06	9,0E+06	1,2E+07	6,6E+06	8,6E+06	4,0E+07
Mittelwert	6,1E+06	8,0E+06	1,2E+07	6,7E+06	8,6E+06	1,7E+07
	Filter 37	Filter 40	Filter 43	Filter 46	Filter 49	Filter 52
A	7,7E+06	7,1E+06	--	8,9E+06	6,8E+06	5,4E+06
B	8,1E+06	6,4E+06	7,6E+06	6,6E+06	6,3E+06	6,1E+06
C	8,1E+06	5,7E+06	8,9E+06	8,7E+06	9,5E+06	6,2E+06
Mittelwert	8,0E+06	6,4E+06	8,3E+06	8,1E+06	7,5E+06	5,9E+06
	Filter 55	Filter 58	Filter 61	Filter 64	Filter 67	Filter 70
A	1,2E+07	2,4E+06	2,0E+06	9,0E+06	--	2,5E+07
B	8,8E+06	2,3E+06	2,0E+06	9,2E+06	1,1E+07	7,3E+06
C	9,4E+06	2,7E+06	2,1E+06	8,6E+06	1,3E+07	7,3E+06
Mittelwert	1,0E+07	2,5E+06	2,0E+06	9,0E+06	1,2E+07	1,3E+07

Die am 29.01.2008 erzeugten Filter der Reihe V6 wiesen im Mittel 1,8 mg Feinstaub pro Filter auf. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $7,3 \times 10^6$ bis $3,0 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter. Der Medianwert lag bei $1,0 \times 10^7$ (V6) Virusgenomkopien pro Filter.

Tab. 34: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V6

Reihe V6	Filter 75	Filter 78	Filter 81	Filter 84	Filter 87	Filter 90
A	6,2E+06	9,1E+06	1,2E+07	1,4E+07	7,4E+08	1,2E+07
B	6,2E+06	9,1E+06	9,0E+06	1,2E+07	1,6E+07	1,1E+07
C	6,3E+06	1,2E+07	8,5E+06	5,7E+08	1,1E+07	1,1E+07
Mittelwert	6,3E+06	9,9E+06	9,7E+06	2,0E+08	2,5E+08	1,2E+07
	Filter 93	Filter 96	Filter 99	Filter 102	Filter 105	Filter 108
A	1,0E+07	1,3E+07	1,2E+07	7,1E+06	1,3E+07	8,4E+06
B	9,6E+06	1,3E+07	1,0E+07	8,0E+06	1,2E+07	9,1E+06
C	1,0E+07	9,6E+06	1,1E+07	9,0E+06	1,3E+07	--
Mittelwert	9,9E+06	1,2E+07	1,1E+07	8,0E+06	1,2E+07	8,8E+06
	Filter 111	Filter 114	Filter 117	Filter 120		
A	1,1E+07	7,8E+06	5,2E+08	7,5E+06		
B	9,5E+06	8,3E+06	1,3E+09	7,2E+06		
C	1,0E+07	8,0E+06	4,3E+07	--		
Mittelwert	1,0E+07	8,0E+06	6,1E+08	7,3E+06		

Die am 03.03.2008 erzeugten Filter der Reihe V7 wiesen im Mittel 0,7 mg Feinstaub pro Filter auf. Bei dieser Untersuchungsreihe waren die Viren nicht in einer Kot-, sondern in einer PBS-Lösung suspendiert. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $3,4 \times 10^6$ bis $9,5 \times 10^6$ Virusgenomkopien pro Filter. Der Medianwert lag bei $6,0 \times 10^6$ (V7) Virusgenomkopien pro Filter.

Tab. 35: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V7

Reihe V7	Filter 01	Filter 03	Filter 06	Filter 07	Filter 09
A	n. b.	2,7E+06	6,0E+06	1,0E+07	1,1E+07
B	n. b.	3,2E+06	6,5E+06	1,1E+07	1,1E+07
C	n. b.	3,8E+06	6,9E+06	1,0E+07	1,1E+07
Mittelwert	n. b.	3,3E+06	6,5E+06	1,0E+07	1,1E+07
	Filter 11	Filter 13	Filter 15	Filter 17	Filter 19
A	8,9E+06	6,4E+06	5,1E+06	3,4E+06	6,5E+06
B	8,6E+06	5,8E+06	5,9E+06	3,6E+06	7,0E+06
C	1,0E+07	6,2E+06	5,9E+06	3,5E+06	7,2E+06
Mittelwert	9,1E+06	6,1E+06	5,6E+06	3,5E+06	6,9E+06
	Filter 21	Filter 23	Filter 25	Filter 27	Filter 29
A	7,1E+06	8,2E+06	4,7E+06	5,3E+06	4,0E+06
B	8,3E+06	8,4E+06	4,4E+06	5,4E+06	4,7E+06
C	8,4E+06	9,3E+06	4,5E+06	5,2E+06	4,0E+06
Mittelwert	7,9E+06	8,6E+06	4,5E+06	5,3E+06	4,2E+06
	Filter 31	Filter 33	Filter 35	Filter 37	
A	9,4E+06	6,0E+06	5,6E+06	2,7E+06	
B	8,9E+06	5,8E+06	5,1E+06	2,6E+06	
C	8,8E+06	5,7E+06	5,5E+06	2,8E+06	
Mittelwert	9,0E+06	5,8E+06	5,4E+06	2,7E+06	

Die am 03.03.2008 erzeugten Filter der Reihe V8 wiesen im Mittel 1,6 mg Feinstaub pro Filter auf. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $4,9 \times 10^6$ bis $8,4 \times 10^6$ Virusgenomkopien pro Filter. Der Medianwert lag bei $6,8 \times 10^6$ (V8) Virusgenomkopien pro Filter.

Tab. 36: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V8

Reihe V8	Filter 39	Filter 41	Filter 43	Filter 45	Filter 47
A	--	6,1E+06	6,3E+06	7,9E+06	6,3E+06
B	--	5,3E+06	6,4E+06	7,8E+06	6,3E+06
C	--	5,3E+06	5,8E+06	6,6E+06	5,5E+06
Mittelwert	--	5,5E+06	6,1E+06	7,4E+06	6,0E+06
	Filter 49	Filter 51	Filter 53	Filter 55	Filter 57
A	6,5E+06	4,7E+06	7,1E+06	8,7E+06	8,0E+06
B	5,8E+06	5,1E+06	6,6E+06	7,6E+06	6,9E+06
C	5,4E+06	5,2E+06	6,9E+06	7,9E+06	7,7E+06
Mittelwert	5,9E+06	5,0E+06	6,9E+06	8,1E+06	7,5E+06
	Filter 59	Filter 61	Filter 63	Filter 65	Filter 67
A	4,5E+06	7,5E+06	7,9E+06	7,4E+06	9,2E+06
B	4,9E+06	7,6E+06	7,6E+06	7,4E+06	1,0E+07
C	4,5E+06	6,4E+06	7,4E+06	7,8E+06	8,3E+06
Mittelwert	4,6E+06	7,2E+06	7,6E+06	7,5E+06	9,1E+06
	Filter 69	Filter 71	Filter 73	Filter 75	
A	9,3E+06	7,2E+06	6,9E+06	4,1E+06	
B	9,8E+06	7,7E+06	6,4E+06	4,0E+06	
C	1,0E+07	8,0E+06	5,9E+06	4,0E+06	
Mittelwert	9,7E+06	7,6E+06	6,4E+06	4,0E+06	

Die am 08.04.2008 erzeugten Filter der Reihe V9 wiesen im Mittel 0,7 mg Feinstaub pro Filter auf. Bei dieser Untersuchungsreihe waren die Viren nicht in einer Kot-, sondern in einer PBS-Lösung suspendiert. Der Median der PCR-Resultate lag bei $1,2 \times 10^7$ (V7) Virusgenomkopien pro Filter.

Reihe V9	Filter 05	Filter 06
A	7,6E+06	1,4E+07
B	7,1E+06	1,6E+07
C	7,1E+06	1,7E+07
Mittelwert	7,3E+06	1,6E+07

Tab. 37: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V9

Die am 08.04.2008 erzeugten Filter der Reihe V10 wiesen im Mittel 2,5 mg Feinstaub pro Filter auf. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $1,2 \times 10^7$ bis $2,0 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter. Der Medianwert lag bei $1,6 \times 10^7$ (V10) Virusgenomkopien pro Filter.

Tab. 38: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V10

Reihe V10	Filter 11	Filter 16	Filter 21	Filter 26	Filter 31
A	7,2E+06	2,0E+07	2,0E+07	1,3E+07	1,4E+07
B	7,6E+06	2,0E+07	1,5E+07	1,2E+07	1,8E+07
C	7,0E+06	1,8E+07	2,0E+07	1,2E+07	1,6E+07
Mittelwert	7,4E+06	1,9E+07	1,8E+07	1,2E+07	1,6E+07
	Filter 36	Filter 41	Filter 46	Filter 51	Filter 56
A	2,6E+07	1,8E+07	1,6E+07	1,1E+07	1,3E+07
B	2,6E+07	1,5E+07	1,7E+07	1,2E+07	1,3E+07
C	2,9E+07	1,6E+07	1,6E+07	1,1E+07	1,3E+07
Mittelwert	2,7E+07	1,6E+07	1,6E+07	1,1E+07	1,3E+07
	Filter 61	Filter 66	Filter 71		
A	2,0E+07	1,8E+07	1,3E+07		
B	2,0E+07	1,9E+07	1,7E+07		
C	1,9E+07	1,8E+07	1,6E+07		
Mittelwert	2,0E+07	1,8E+07	1,5E+07		

Die am 30.05.2008 erzeugten Filter der Reihe V11 wiesen im Mittel 2,1 mg Feinstaub pro Filter auf. 80 % der PCR-Resultate lagen zwischen $1,5 \times 10^7$ bis $2,1 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter. Der Medianwert lag bei $1,8 \times 10^7$ (V11) Virusgenomkopien pro Filter.

Tab. 39: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter bei der Reihe V11

Reihe V11	Filter (6+16+26+36)	Filter (7+17+27+37)	Filter (8+18+28+38)	Filter (9+19+29+39)	Filter (10+20+30+40)
A	1,6E+07	1,7E+07	1,5E+07	1,8E+07	2,3E+07
B	1,6E+07	1,8E+07	1,8E+07	2,0E+07	2,0E+07
C	1,8E+07	1,5E+07	1,9E+07	2,1E+07	2,0E+07
Mittelwert	1,7E+07	1,6E+07	1,7E+07	2,0E+07	2,1E+07

Die Auswertung der spezifischen Virusgehalte (Virusgenomkopien/mg) des erzeugten Feinstaubes mit Influenzavirus-Genomkopien ist in Abb. 59 und Tab. 40 zusammengefasst. Aus Tab. 14 ist zu entnehmen, dass bei den Versuchsreihen Virus-dotierte Suspensionen zum Einsatz kamen, deren Viruskonzentrationen sich um bis zu Faktor 5 unterschieden. Dementsprechend wären formal die niedrigsten Virusgehalte für Stäube aus der Reihe V8 und fünffach höhere Gehalte für Stäube der Reihe V3 zu erwarten gewesen. Die Mediane der pro mg Feinstaub erfassten Virusgenomkopien lagen jedoch sehr dicht zusammen. Offensichtlich haben sich die unterschiedlichen Dosierungen der Virussuspension nicht maßgeblich auf die spezifischen Virusgehalte des erzeugten Feinstaubes ausgewirkt. Andere, bislang nicht bekannte Einflussfaktoren bedingten, dass sich bereits innerhalb einer Untersuchungsreihe Unterschiede der spezifischen Virusgehalte ergaben, die größer waren als die Ansatzvarianten der ausgewerteten Untersuchungsreihen: Die Unterschiede der 10- und 90%-Perzentile waren Faktor 4 bei V1, Faktor 15 bei V2, Faktor 11 bei V3, Faktor 8 bei V4, Faktor 3 bei V5, Faktor 2 bei V6, Faktor 2 bei V8 und V10 sowie Faktor 1,3 bei V11. Bei der Verarbeitung von Virus-dotierten PBS-Lösungen waren die Unterschiede der 10- und 90%-Perzentile Faktor 3 bei V7 und Faktor 2 bei V9. Erwartungsgemäß wiesen die aus PBS-Lösung generierten Feinstäube die höchsten Virusgehalte pro mg auf. Bei diesen Versuchsreihen waren die Feinstäube durch die Trocknung der PBS-Lösung entstanden, wodurch die Viren stärker angereichert wurden als bei den feststoffhaltigen Kotsuspensionen.

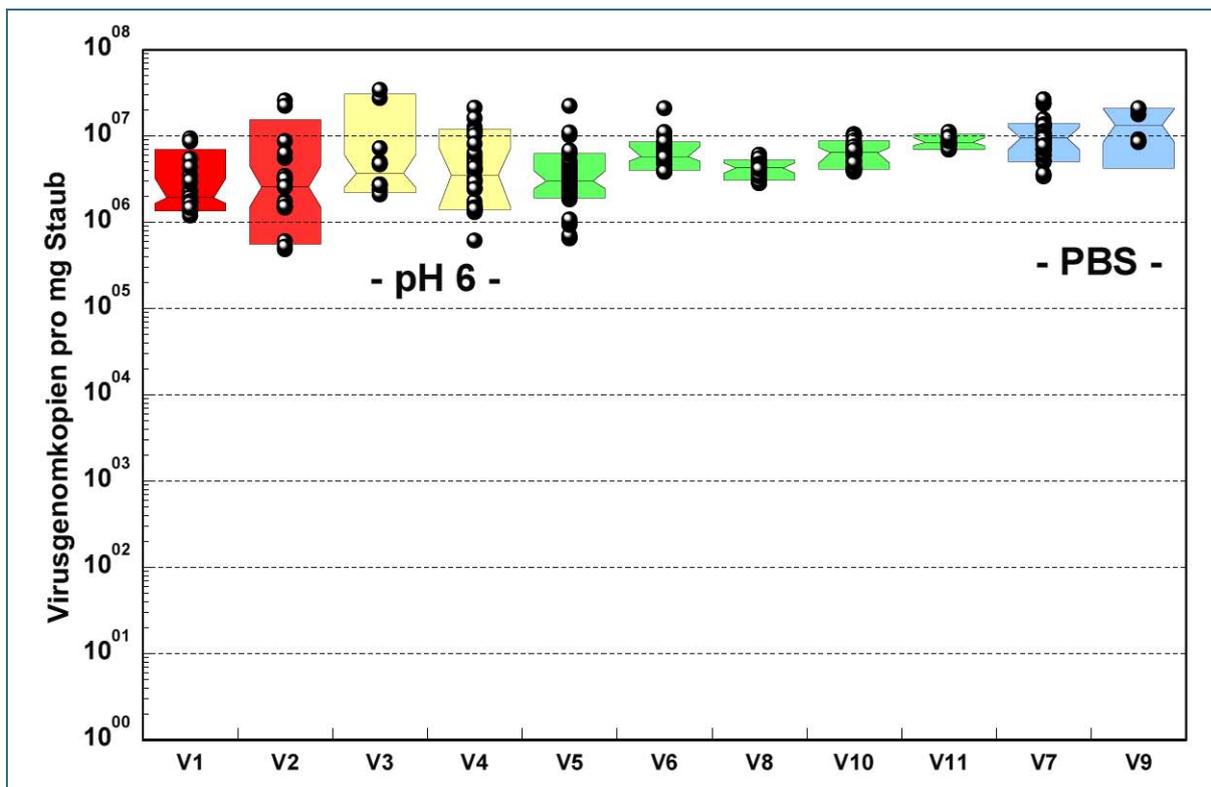


Abb. 59: Mithilfe der PCR im Feinstaub nachgewiesene Genomkopien an Influenza-A-Viren (in Genomkopien/mg Staub)

ROT: 5-minütige Probenahme, pH7; GELB: 5-minütige Probenahme, pH6; GRÜN: 3-minütige Probenahme, pH7; BLAU: 3-minütige Probenahme, pH7, Virus-dotierte PBS-Lösung; sonstige Variationen: s. Tabelle 14

(Die farbigen Boxen schließen 80 % aller Messerte ein; im eingekerbten Bereich der Boxen liegen 50 % der Messwerte; der Querstrich in den Boxen zeigt den Median)

Tab. 40: Wertebereiche der mithilfe der PCR in den Feinstaubmassen nachgewiesenen Genomkopien der Influenza-A-Viren (in 10⁶ Genomkopien/mg)

Perzentile	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V8	V10	V11	V7	V9
10 %	1,4	0,6	2,3	1,4	2,0	4,1	3,1	4,1	7,2	5,1	8,5
25 %	1,7	1,5	2,6	1,6	2,5	5,1	3,7	4,9	7,8	7,0	8,7
Median	1,9	2,6	3,7	3,5	3,0	5,8	4,3	6,4	8,4	9,4	13
75 %	3,0	3,4	5,5	6,1	3,9	7,5	4,8	7,2	9,5	12	20
90 %	5,4	8,7	25	12	6,0	8,4	5,3	8,4	9,7	14	21

Die PCR-Befunde dokumentieren, dass bei allen Untersuchungsreihen Filter mit mehr als 10⁶ Virusgenomkopien pro Filter erzeugt wurden. Daraus wurden Filterextrakte gewonnen, die mehr als 10⁶ Virusgenomkopien pro 3 ml Extraktionslösung enthielten. Von entsprechenden Extrakten wurden dann beim LGL 0,2 ml (= 6,7 %) zur Animpfung von einem Brutei eingesetzt, sodass entsprechende Bruteier mit mindestens 6,7 x 10⁴ Virusgenomkopien angeimpft waren.

4.4.2.6 Untersuchung von Feinstaubfiltern aus LÜB-Messstationen auf Influenza-A-Virusgenome

Das LfU betreibt das Lufthygienische Landesüberwachungssystem Bayern (LÜB), um die Luftqualität kontinuierlich überprüfen zu können. Im Rahmen dieser Überwachungstätigkeit fallen je nach Messstation kontinuierlich auch Feinstaubfilter an.

Einige Filter von 2 LÜB-Messstationen wurden verwendet, um den Einfluss der im städtischen Raum (LfU, Augsburg) bzw. im ländlichen Raum (Andechs) anfallenden Feinstäube auf die vom bifa erarbeiteten Influenza-Virus-Nachweismethodik mittels RT-PCR orientierend zu prüfen.

Tab. 41: Kenndaten der untersuchten LÜB-Feinstaubfilter

Standort	Filter 610077-080721-	Datum / PM₁₀ pro Filter / PM ₁₀ -Tagesmittelwert
Augsburg /LfU, städtisch 	001A	03.01.08/ 1.220 µg PM10 /Filter/22,1 µg/m ³
	002A	05.01.08/ 2.250 µg PM10 /Filter/40,8 µg/m ³
	003A	24.01.08/ 1.849 µg PM10 /Filter/33,5 µg/m ³
	004A	30.01.08/ 1.633 µg PM10 /Filter/29,6 µg/m ³
	005A	18.02.08/ 2.465 µg PM10 /Filter/44,7 µg/m ³
	006A	20.02.08/ 2.457 µg PM10 /Filter/44,5 µg/m ³
Andechs, ländlich 	001B	03.01.08/ 881 µg PM10 /Filter/16,0 µg/m ³
	002B	05.01.08/ 592 µg PM10 /Filter/10,7 µg/m ³
	003B	24.01.08/ 229 µg PM10 /Filter/4,1 µg/m ³
	004B	30.01.08/ 1.315 µg PM10 /Filter/23,8 µg/m ³
	005B	18.02.08/ 559 µg PM10 /Filter/10,1 µg/m ³
	006B	20.02.08/ 1.227 µg PM10 /Filter/22,2 µg/m ³

Von besonderem Interesse war, ob typische, in der Umwelt vorkommende Feinstäube den PCR-Nachweis stören. Sollte dies nicht der Fall sein, könnten prinzipiell LÜB-Feinstaubfilter im Bedarfsfall herangezogen werden, um das Vorkommen von luftgetragenen Influenza-Viren im Umfeld der LÜB-Stationen zu erfassen.

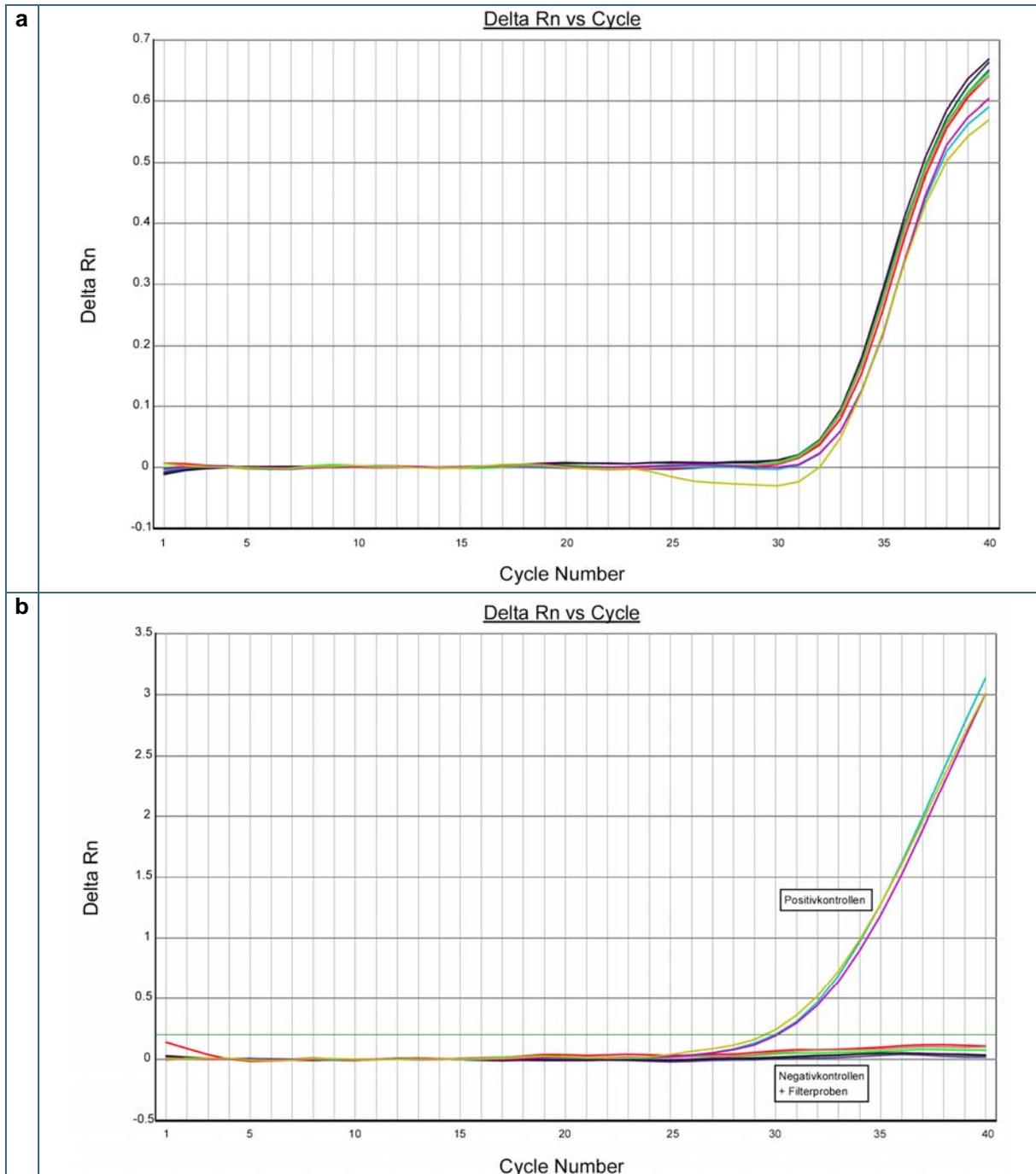


Abb. 60: PCR-Ergebnisse für die Negativkontrolle, die Positivkontrolle und eine Filterprobe (LfU-005A)
 a: Vergleich der Kurvenverläufe für die internen Positivkontrollen
 b: Vergleich der Kurvenverläufe für das Influenza-A-Templat

Die untersuchten LÜB-Filter wiesen PM₁₀-Feinstaubauflagen von 0,2 bis 2,5 mg pro Filter auf. Die beprobte Luft im Bereich der LÜB-Stationen wies PM₁₀-Feinstaubgehalte von 4,1 bis 44,7 µg/m³ auf.

Bei der Aufarbeitung der Filter wurden diese mit 3 ml steriler, RNA-freier PBS-Lösung eluiert. Da 0,4 ml des Filtereluates jeweils für die Virus-RNA-Extraktion eingesetzt wurden, gelangten rechnerisch 13,3 % des Feinstaubes eines Filters in die weitere Aufarbeitung. Dabei wurden 50 µl RNA-Extrakt erhalten, von denen jeweils 10 µl in einem PCR-Ansatz (10 µl/well) eingesetzt werden. Letztlich gelangen beim aktuellen Arbeitsgang somit maximal 2,7 % des Feinstaubes eines Filters in einen PCR-Ansatz.

Bei den überprüften LÜB-Filtern waren rechnerisch die Inhaltsstoffe von 6,1 bis 66 µg PM₁₀-Feinstaub in einem PCR-Ansatz vorhanden. Weniger als 10 Influenza-Genomkopien pro PCR-Ansatz konnten in der PCR nachgewiesen werden (s. Abschnitt 4.4.2). Folglich waren beim hier genutzten Arbeitsgang Influenza-A-Viren nachweisbar, wenn mehr als 375 Virusgenomkopien pro Filter vorhanden waren. Unter Berücksichtigung der PM₁₀-Feinstaubauflagen und der PM₁₀-Feinstaubkonzentrationen der beprobten Luft hatten rechnerisch bereits 7 Virusgenomkopien pro m³ Luft bzw. 0,15 Virusgenomkopien pro µg PM₁₀-Feinstaub für einen positiven Influenza-Nachweis ausgereicht. Durch Optimierungen des Elutions- und RNA-Extraktionsablaufes könnte die Nachweisempfindlichkeit um maximal Faktor 10 verbessert werden, sodass ein Influenza-Virusgenomnachweis ab 0,7 Virusgenomkopien/m³ Luft realisierbar sein sollte, wenn die Viren mit Feinstaubfiltern aus der Luft abscheidbar wären. Da in den LÜB-Messstationen Augsburg/LfU und Andechs für die PM₁₀-Bestimmung 55 m³ Luft beprobt wurden, könnten die PM₁₀-Feinstaubfilter eine gute Basis für Programme zum Monitoring von luftgetragenen Viren in der Umwelt bieten.

Bei den aktuell untersuchten LÜB-Filtern wurde in keinem Fall ein positiver Influenza-Nachweis erhalten. Alle Proben sollten somit weniger als 375 Influenza-Virusgenomkopien pro Filter gehabt haben. In jedem PCR-Ansatz wurde eine interne Positivkontrolle („IPC“) mitgeführt, die Aufschluss darüber geben sollte, ob die untersuchte Probe Hemmstoffe enthielt. In einem solchen Fall hätten sich für die interne Positivkontrolle Minderbefunde ergeben. Obwohl die Extrakte der LÜB-Filter unverdünnt zum Einsatz kamen, wurden bei keiner Probe für die interne Positivkontrolle Minderbefunde erhalten (s. Beispiel in Abb. 60a). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Filterextrakte den PCR-Nachweis störten: Wenn mehr als 375 Influenza-Genomkopien pro Filter vorhanden gewesen wären, hätte der PCR-Nachweis zu positiven Befunden führen müssen. Abb. 60b zeigt den Vergleich der Fluoreszenzsignale für eine Positivkontrolle, eine Negativkontrolle und ein Filterextrakt mit der höchsten Feinstaubbelastung (Augsburg/LfU-005A) bei der PCR (jeweils mit 3 Wiederholungen): Nur der Ansatz mit den Positivkontrollen ergab ein signifikant ansteigendes Fluoreszenzsignal; in den anderen Ansätzen waren keine Influenza-A-Genome nachweisbar. Da dies bei allen LÜB-Filterproben der Fall war, hatten alle untersuchten LÜB-Filter weniger als 375 Influenza-Virusgenome pro Filter.

Zur Absicherung dieser Befunde wurden einige Extrakte von LÜB-Filtern mit sehr hoher Feinstaubbelastung (Augsburg/LfU: 005A; 006A; Andechs: 004B, 006B) mit Influenza-Viren dotiert. Hierzu wurde die Viruslösung 1:10.000 vorverdünnt und dann wurden 40 µl verdünnte Virussuspension mit 360 µl der Filtereluate vermischt. Parallel dazu wurde PBS-Lösung mit einer identischen Virusdotierung hergestellt. Nach Extraktion der Virus-RNA wurden die Virusgenomanzahlen mittels PCR bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abb. 61: Die beiden Kontrollansätze (jeweils 3 PCR-Ansätze) ergaben im Mittel $7,6 \times 10^5$ Virusgenomkopien pro ml. Im Vergleich dazu wurden für die 4 überprüften, mit Viren dotierten Filtereluate nahezu übereinstimmende Werte ermittelt. Eine Hemmung der PCR durch deren Filterinhaltsstoffe war folglich nicht gegeben. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Befunde für die LÜB-Extrakte ohne Virusdotierung falsch-negativ waren. Offenbar störten Feinstaubinhaltsstoffe der LÜB-Messstationen Augsburg/LfU und Andechs das eingesetzte Influenza-Nachweissystem nicht.

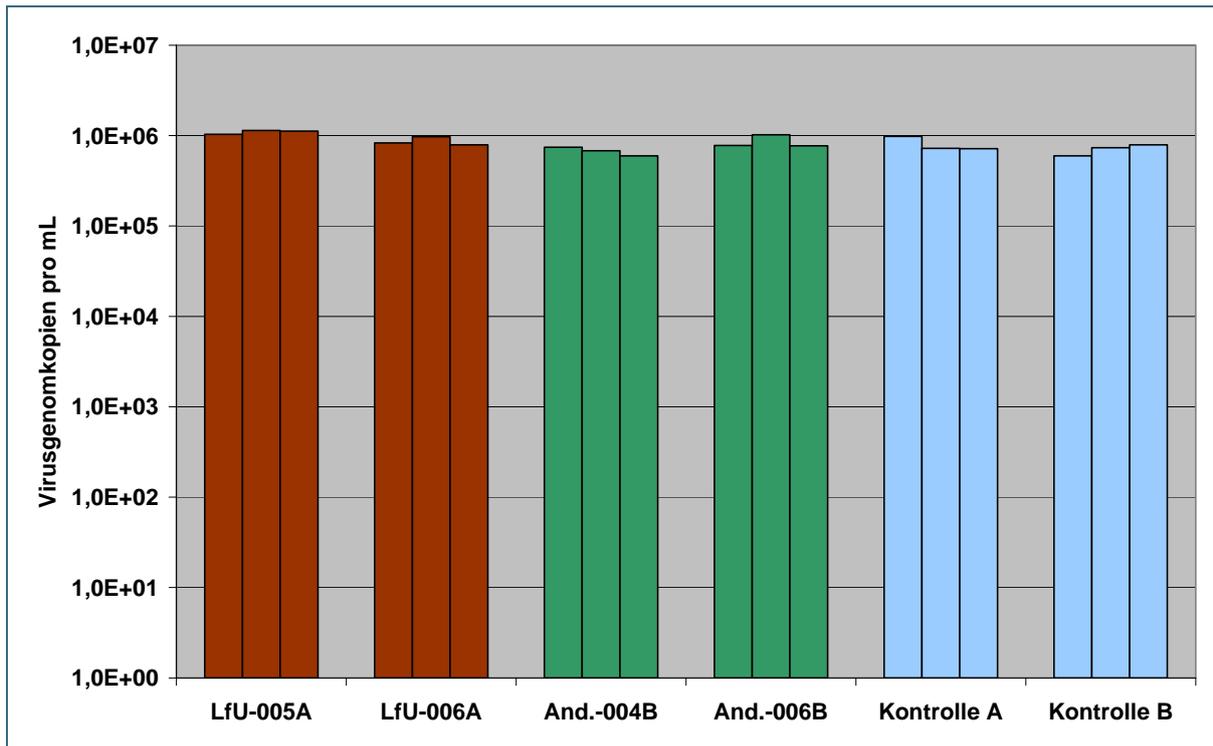


Abb. 61: Vergleich der PCR-Befunde (jeweils 3 Wiederholungen) für Influenza-A-Virus-dotierte LÜB-Filterextrakte mit den Kontrollansätzen in PBS-Lösung

4.4.2.7 Stabilität der viralen RNA während einer 24-h-Feinstaubprobenahme

Ergänzend zu den unter 4.4.2.6 beschriebenen Untersuchungen wurde orientierend geprüft, ob die Nachweisbarkeit der Genomkopien von Influenza-A-Viren in Feinstaubfiltern auch dann erhalten blieb, wenn die Feinstaubfilter 24 Stunden im Feinstaubprobenehmer mit einem kontinuierlichen Raumluftvolumenstrom beaufschlagt wurden.

Zwei Rückstellfilter der Untersuchungsreihe V5 / pH7 / 21.01.2008, die mit Virus-dotiertem Feinstaub aus Hühnerkot beaufschlagt waren, wurden hierzu aufgetaut und in den Feinstaubprobenehmer eingespannt. Dieser wurde anschließend über 24 h betrieben; während dieser Zeit wurde Laborluft mit Raumtemperatur durch den Filter gesaugt und der darin enthaltene Feinstaub wurde zusätzlich auf den Filtern abgeschieden.

Die gelagerten Filter wurden bei -70 °C zwischengelagert. Anschließend wurden die Filter zum Nachweis der Virusgenomkopien herangezogen.

	Filter 2	Filter 11
A	1,1E+07	1,1E+07
B	1,2E+07	1,4E+07
C	--	1,2E+07
Mittelwert	1,1E+07	1,2E+07

Tab. 42: Ergebnisse der mittels PCR ermittelten Anzahlen an Virusgenomkopien pro Filter nach Einsatz der Filter für 24 h im Feinstaubprobenehmer

Der Filter 2 war ursprünglich direkt nach der Filterherstellung bei -70 °C als Kontrollfilter gelagert worden; der Filter 11 war staubfeucht bei -20 °C über 96 h gelagert und anschließend bei -70°C gelagert worden.

Auf beiden Filtern wurden nach einer 24-stündigen Lagerung im Feinstaubprobenehmer übereinstimmende Anzahlen an Virusgenomkopien gefunden. Für nicht im Feinstaubprobenehmer mit Raumluft-beaufschlagte Feinstaubfilter der Reihe V5 / pH7 / 21.01.2008 wurden $4,9 \times 10^6$ bis $1,3 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter nachgewiesen (vgl. Tab. 33).

Dieser Befund deutet darauf hin, dass auf Feinstaubfiltern während einer 24-h-Feinstaubprobenahme abgeschiedene Influenza-Viren relativ stabile Virusgenome haben sollten und somit mithilfe der PCR nachweisbar sein könnten.

4.4.3 Fazit

Im Rahmen des Vorhabens konnte gezeigt werden, dass die für die Feinstaubanalysen routinemäßig eingesetzten Quarzfaserfilter keine nachteiligen Einflüsse auf die Nachweisbarkeit von Influenza-A-Virus-RNA hatten. Nukleinsäuremoleküle sind an geladenen Oberflächen wie z. B. Glas adsorbierbar, allerdings hängt das Sorptionsverhalten stark von den sonstigen physikochemischen Bedingungen ab (Nanassya et al., 2007). Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde nicht die isolierte Virus-RNA, sondern Viruspartikel sowie Hühnerkot auf den Quarzfaserfiltern abgeschieden. Eine RNA-Adsorption auf den Quarzfasern wurde nicht beobachtet.

Die für Feinstaubanalysen eingesetzten Filter schieden den Staub auch in tieferen Schichten des Filtergewebes ab (Tiefenfilter). Ursprünglich war befürchtet worden, dass deshalb bei der Elution des Feinstaubes Anteile im Filtermaterial zurückbleiben. Die Elution des Feinstaubes erwies sich jedoch als unproblematisch, da die Quarzfaserfilter im Elutionsmedium rasch zerfielen. Rund 50 % des Elutionsmediums konnten aus dem Filterfaserbrei wieder zurückgewonnen werden, sodass für die weitere Bearbeitung etwa die Hälfte des Feinstaubes zur Verfügung stand. Durch den Einsatz größerer Mengen an Elutionsflüssigkeit könnte die eluierte Feinstaubmasse weiter erhöht werden, doch würden sich dabei niedrigere Feinstaubkonzentrationen im Eluat ergeben. Für eine hohe Nachweisempfindlichkeit sollte deshalb das im Vorhaben gewählte Volumen von 3 ml PBS-Lösung pro Filter beibehalten werden. Die dann zur Verfügung stehenden 1-1,5 ml Filtereluat waren im Bedarfsfall ausreichend für eine zwei- bis dreimalige Wiederholung der Virus-RNA-Extraktion.

Die Virus-RNA-Extraktion mit dem MagMAX™ Viral RNA Isolation Kit der Firma Ambion hatte sich bewährt: Die aus den Viren freigesetzte und an den magnetic beads fixierte RNA ermöglichte eine weitreichende Abtrennung der RNA von sonstigen Filtereluatbestandteilen. Zusätzlich wird in diesem Kit eine achtfache Aufkonzentrierung der RNA erreicht, da 400 µl Filtereluat zu 50 µl RNA-Extrakt aufbereitet werden. Je 10 µl des RNA-Extraktes werden für einen PCR-Ansatz genutzt; im Vorhaben wurden jeweils 3 Wiederholungen des PCR-Ansatzes für eine Filterprobe verwendet. Wenn das Filtereluat unverdünnt verarbeitet wird, gelangen beim aktuellen Arbeitsgang bis zu 2,7 % des Feinstaubes eines Filters in einen PCR-Ansatz. Zur Optimierung der Nachweisempfindlichkeit könnten die Filterelution, die RNA-Extraktion sowie der PCR-Ansatz so angepasst werden, dass eine 10fach niedrigere Nachweisgrenze realisierbar wären. Die im Rahmen des Vorhabens erzeugten Feinstaubfilter aus Virus-dotiertem Hühnerkot hatten jedoch hinreichend hohe Virusgehalte; vor der RNA-Extraktion wurden die Filtereluate meist um Faktor 50 verdünnt, damit im PCR-Ansatz nicht zu hohe RNA-Mengen vorhanden waren. Doch auch wenn unverdünnte Filtereluate verarbeitet wurden, wurden keine Inhibitionen der PCR beobachtet. Offenbar wurden potenzielle PCR-Störstoffe bei der RNA-Extraktion wirkungsvoll abgetrennt.

Bemerkenswert war die Beobachtung, dass zumindest der Teil der Influenza-Virus-RNA, der für den Influenza-Nachweis herangezogen wurde, im Kotstaub recht stabil war, da auch nach 96-stündiger Lagerung bei bis zu 50 °C keine signifikante Abnahme der Virusgenomanzahl im Feinstaub beobachtet wurde. Auch Thomas et al. (2008) berichten, dass die mittels PCR nachweisbaren Teilsequenzen der viralen RNA recht stabil sind. Über 10 Tage hinweg nahm die auf Banknoten nachweisbare Virus-RNA nur geringfügig ab.

Die im Abschnitt 4.5 beschriebenen Ergebnisse belegen zudem, dass auch die Virusinfektiosität im trockenen Staub 4 Tage lang erhalten bleibt. Vermutlich reduziert die Trockenheit die Aktivität von Umweltkeimen; höhere Temperaturen und Wassergehalte in der Umgebungsluft förderten vermutlich aber die Abbauaktivität von Umweltkeimen, sodass die Infektiosität der geprüften Influenza-A-Viren zwar rasch abnahm, aber die RNA der geprüften Influenza-A-Viren über den gesamten Lagerungszeitraum von bis zu 4 Tagen mithilfe der PCR unverändert nachweisbar war.

Bereits wenn der im Vorhaben genutzte Arbeitsgang unverändert beibehalten wird, sollten auf Feinstaubfiltern Influenza-Viren nachweisbar sein, wenn auf dem Filter mehr als 375 Virusgenome abgeschieden wurden. Bei den in der Praxis bei Feinstaubmessungen üblichen Probenahmevolumina von 55 m³ Luft/24 h (low volume sampler) wären somit positive Influenza-Nachweise erzielbar, wenn in der Luft mehr als $(375/55=)$ 7 Virusgenomkopien/m³ vorhanden wären. Dieser Wert ist um mehr als 4 Zehnerpotenzen niedriger als jene Virusanzahl, die in der Abluft von Tierstallungen Influenza-infizierter Bestände erwartet werden kann. Auch in mehreren Hundert Meter Entfernung von entsprechenden Tierstallungen sollten in der Luft noch Anzahlen von Virusgenomkopien weit oberhalb der Nachweisgrenze der im Vorhaben genutzten Methodik vorliegen.

Eine Nachweisgrenze von 10 Influenzagenomkopien/m³ Luft ist für die meisten Praxisfragestellungen empfindlich genug: Beim Menschen wurden bei 50 % der Probanden Influenza-Infektionen beobachtet, wenn diese 10 Liter eines mit humanen Influenza-Viren dotierten Aerosols mit 1-3 µm großen Tröpfchen inhaliert und dabei 0,6-3,0 TCID₅₀ aufgenommen haben (zitiert von Tellier, 2006). Das Aerosol hatte folglich 60-300 TCID₅₀/m³. Berücksichtigt man, dass die Virusgenomanzahl von Virussuspensionen um mehrere Zehnerpotenzen über der mit Zellkulturen feststellbaren infektiösen Dosis (TCID₅₀) liegt, ist anzunehmen, dass die Virusgenomkopienanzahl/m³ bei den zitierten Untersuchungen bei mehreren Tausend Kopien/m³ und damit weit oberhalb der Nachweisgrenze der in diesem Vorhaben genutzten Arbeitsmethode lag.

Da die verwendete PCR-Methodik alle bekannten Influenza-A-Varianten detektieren kann, könnte sie ein Baustein für ein Feinstaub-basiertes Umweltmonitoring von Influenza-A-Viren werden. Bislang fehlen Kenntnisse darüber, bis in welche Entfernung von Emittenten mit erhöhten Virengehalten in der Luft gerechnet werden muss. Emissionsrelevant wären z. B. Tierstallungen mit Influenza-erkrankten Tieren und die Ausbringung von Wirtschaftsdüngern aus Stallungen mit erkrankten Tieren.

4.5 Prüfung der Stabilität der Virus-RNA in Staubproben

Die aus den Influenza-A-Viren-dotierten Suspensionen hergestellten Feinstaubfilter wurden anfangs unmittelbar nach ihrer Herstellung in verschließbare Kunststofftüten eingelegt und die in Tüten verpackten Filter wurden danach bei unterschiedlichen Temperaturen (-70 °C, -20 °C, 4 °C, 20 °C, 37 °C) über bis zu 96 h gelagert (s. 4.5.1). Dabei kamen auf pH 7,0 und 6,0 eingestellte Kotsuspensionen zum Einsatz. Bei der Verarbeitung ergaben sich jedoch Schwierigkeiten, da bei der Entnahme der Filter aus den Kunststofftüten Anteile des Feinstaubes an den Tüten haften blieben, sodass die Tüten nachgespült werden mussten. Deshalb wurden die beaufschlagten Filter ab der Untersuchungsreihe V5 unmittelbar in verschließbare, sterile Falcon-Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff (Fa. NUNC) eingelegt. Diese Röhrchen wurden dann bei unterschiedlichen Temperaturen (-70 °C, -20 °C, 4 °C, 20 °C, 37 °C, 50 °C) und Feuchtebedingungen gelagert (s. 4.5.2). Die Lagerungsbedingung „staubfeucht“ wurde realisiert, indem die Filter in verschlossenen Zentrifugenröhrchen mit der Aerosolkammerbedingten Restfeuchte gelagert wurden. Für eine „trockene“ Lagerung wurden die Zentrifugenröhrchen geöffnet in eine mit Silicagel als Trockenmittel gefüllte Kunststoffdose gestellt, die verschlossen wurde, sodass den Filtern die Restfeuchte entzogen wurde. Für eine „feuchte“ Lagerung wurden die geöffneten Zentrifugenröhrchen in eine am Boden mit Wasser gefüllte Kunststoffdose gestellt, die verschlossen wurde, sodass sich die Filter über die wasserdampfgesättigte Luft ebenfalls anfeuchteten.

Abschließend wurde untersucht, wie stabil die eingesetzten Influenza-A-Viren im Feinstaub waren, wenn das Aerosol statt aus einer Kotsuspension aus einer PBS-Lösung hergestellt wurde. Diese Prüfung sollte zeigen, ob die Viren durch die Kotpartikel stabilisiert wurden (s. 4.5.2.2).

Nach der Lagerung wurden die Filter bis zur Aufarbeitung bei -70 °C gelagert. Für die geprüften Lagerungsbedingungen (Temperatur, Zeit, Feuchte) wurden jeweils mehrere Filter erzeugt. Ein Satz der Filter wurde vom bifa verarbeitet, um die Anzahl der Virusgenomkopien auf den Filtern der Untersuchungsreihe mithilfe der PCR zu ermitteln. Ein Satz der Filter wurde für die Beurteilung der Restinfektiosität der auf den Filtern vorhandenen Viren vom LGL untersucht: Die Filter wurden mit 3 ml PBS-Antibiotikallösung mindestens 2 h bei + 4 °C eingeweicht und dann bei 2.500 Umdrehungen pro Minute über 10 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 0,2 ml in je zwei bebrütete Hühnereier in die Allantoishöhle der Embryonen geimpft. Die Lebensfähigkeit der Embryonen wurde unter der Schierlampe täglich überprüft. Vor und nach der Bruteipassage wurden Aliquote der Allantoisflüssigkeit mithilfe der PCR auf nachweisbare Influenza-Virusgenome (Angabe als Ct-Werte der PCR) geprüft. Ergänzend wurden die Hämagglutinationstiter bestimmt. Wenn die untersuchte Probe infektiöse Influenza-Viren enthielt, führte die Bruteipassage im Regelfall zu niedrigeren Ct-Werten bei der PCR (bedingt durch den Anstieg der Virusgenomkopienanzahl) sowie zu einem nachweisbaren Hämagglutinationstiter. Entsprechende Befunde wurden in den nachfolgenden Tabellen orange eingefärbt. Wurden dagegen keine Hinweise auf noch infektiöse Influenza-Viren gefunden, wurden die entsprechenden Tabellenfelder grün markiert.

4.5.1 Ergebnisse der in Kunststofftüten gelagerten Virus-dotierten Feinstaubfilter

Tab. 43 enthält die Untersuchungsergebnisse von Feinstaubfiltern, für deren Herstellung eine Hühnerkotsuspension (50 g TS/l) mit pH 7 und einer Virusdotierung von 10 ml/l Suspension eingesetzt wurden. Dabei wurden Filter erhalten, die $2,7 \times 10^6$ bis $3,7 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter aufwiesen. Die ins Brutei dosierten 0,2 ml Filterextrakt sollten dann mehr als $1,8 \times 10^5$ Virusgenomkopien enthalten haben. Dementsprechend erwiesen sich die unmittelbar nach der Filterherstellung bei -70 °C eingelagerten Kontrollfilter im Brutei-Versuch als infektiös. Aber auch alle bei -20 °C, 20 °C und 37 °C über bis zu 96 h gelagerten Filter enthielten im Bruteiversuch nachweisbare infektiöse Influenza-A-Viren. Staubfeucht in Kunststofftüten bei 4 °C gelagerte Filter wiesen jedoch nach 96 h Lagerung keine im Bruteiversuch nachweisbaren infektiösen Influenza-Viren mehr auf.

Zur Absicherung dieser Befunde wurde ein zweiter Filtersatz für die Prüfungen der Restinfektiosität im Bruteiversuch eingesetzt, wobei nahezu übereinstimmende Befunde erhalten wurden.

Die Filteruntersuchungen ließen zudem keine signifikante Abnahme der mithilfe der PCR nachweisbaren Virusgenomanzahlen bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und -zeiten erkennen, sodass das Influenza-Genom bei den geprüften Lagerungsbedingungen stabil war.

Tab. 43: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihen V1 u. V2/pH7/09.10.2007/Kunststofftüten

Filter	Staubbelastung mg/Filter	Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämagl.		
		1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor	nach	vor	nach	
							Ei-Passage		Ei-Passage		
1	3,7	--	--	-70 °C	0 h	Staubfeucht	33,9	16,5	Neg.	1:4	
2	3,3	1,1E+07	3,3E+06				--	--	--	--	
3	3,5						23,9	14,7	Neg.	1:16	
4	3,5	--	--	37 °C	15 h	Staubfeucht	24,3	13,5	Neg.	1:8	
5	4,3	8,0E+06	1,9E+06				--	--	--	--	
7	4,0	--	--				24,1	14,4	Neg.	1:16	
8	3,8	--	--				23,2	21,6	Neg.	1:8	
9	4,9	8,5E+06	1,7E+06				--	--	--	--	
10	4,6	--	--				23,5	14,8	Neg.	1:16	
11	4,6	--	--		31,7	14,6	Neg.	1:16			
12	4,7	3,3E+07	6,9E+06		--	--	--	--			
13	4,7	--	--		22,5	20,0	Neg.	1:4			
14	5,3	--	--		23,3	13,4	Neg.	1:8			
15	5,2	1,1E+07	2,2E+06		20 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--
16	5,7	--	--					24,1	13,8	Neg.	1:16
17	5,6	--	--	32,1				13,9	Neg.	1:8	
18	5,9	7,9E+06	1,3E+06	--				--	--	--	
19	5,4	--	--	31,4		14,5	Neg.	1:16			
20	5,6	--	--	22,8		13,2	Neg.	1:16			
21	5,8	1,8E+07	3,2E+06	--		--	--	--			
22	5,8	--	--	23		12,9	Neg.	1:32			
23	4,6	--	--	-70 °C	0 h	Staubfeucht	23,1	23,0	Neg.	1:8	
24	4,4	1,3E+07	2,9E+06				--	--	--	--	
25	4,7	--	--				23,7	16,2	Neg.	1:8	
26	4,7	1,5E+07	3,3E+06	4 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--	
27	5,3	--	--				23,8	14,0	Neg.	1:8	
28	4,8	--	--				34	22,2	Neg.	1:16	
29	5,0	8,2E+06	1,6E+06				--	--	--	--	
30	5,3	--	--				24,7	14,8	Neg.	1:8	
31	5,4	--	--		26,7	37,0	Neg.	Neg.			
32	5,7	--	--		24,5	Kein Ct	Neg.	Neg.			
33	5,5	1,0E+08	1,8E+07		--	--	--	--			
34	4,0	--	--		-20 °C	15 h	Staubfeucht	23,5	16,2	Neg.	1:8
35	5,5	8,2E+06	1,5E+06					--	--	--	--
36	5,6	--	--	24,5				13,6	Neg.	1:32	
37	5,1	2,7E+06	5,3E+05	--				--	--	--	
38	6,5	--	--	24,3		20,0	Neg.	1:16			
39	6,5	--	--	32,8		14,7	Neg.	1:16			
40	3,5	--	--	28,1		14,0	Neg.	1:32			
41	6,6	3,7E+07	5,6E+06	--		--	--	--			
42	6,6	--	--	--		--	--	--			
43	7,3	--	--	24,3		13,2	Neg.	1:16			

Tab. 44 enthält die Untersuchungsergebnisse von Feinstaubfiltern, für deren Herstellung eine Hühnerkotsuspension (50 g TS/l) mit pH 6 und einer Virusdotierung von 10-20 ml/l Suspension eingesetzt wurde. Dabei wurden Filter erhalten, die $4,8 \times 10^6$ bis $1,1 \times 10^8$ Virusgenomkopien pro Filter aufwiesen. Die ins Brutei dosierten 0,2 ml Filterextrakt sollten dann mehr als $3,2 \times 10^5$ Virusgenomkopien enthalten haben. Trotz des veränderten pH-Wertes der Kotsuspension ergaben sich nahezu identische Befunde wie bei den in Tab. 43 dargestellten Befunden der pH7-Untersuchungsreihe. Wiederum enthielten alle bei -20 °C, 20 °C und 37 °C über bis zu 96 h gelagerten Filter im Bruteiversuch nachweisbare infektiöse Influenza-Viren. Staubfeucht in Kunststofftüten bei 4 °C gelagerte Filter wiesen jedoch nach 96 h keine im Bruteiversuch nachweisbaren infektiösen Influenza-A-Viren mehr auf. Diese Befunde wurden mit einem zweiten Filtersatz überprüft, wobei sich ebenfalls nahezu übereinstimmende Befunde ergaben. Die Änderung des pH-Wertes von pH 7 auf pH 6 hatte somit keinen erkennbaren

Einfluss auf die Infektiosität der geprüften Influenza-Viren. Orientierend hat das LGL Verdünnungen des Extraktes des bei 37 °C über 48 h gelagerten Filters 82 im Brutei überprüft. Dabei waren auch in 100fach verdünnten Extrakten im Brutei noch infektiöse Influenza-A-Viren vorhanden.

Tab. 44: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihen V3 u. V4/pH6/12.11.2007/Kunststofftüten

Filter	Staubbelastung mg/Filter	Virusgenomkopien 1/Filter 1/mg		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämaggl.		
							vor	nach	vor	nach	
				Ei-Passage		Ei-Passage					
44	4,7	1,1E+08	2,3E+07	-70 °C	0h	Staubfeucht	--	--	--	--	
45	4,5	--	--				33,4	12,7	Neg.	1:16	
46	5,5	--	--				24,5	13,1	Neg.	1:16	
48	5,5	1,2E+07	2,3E+06	-20 °C	15h	Staubfeucht	--	--	--	--	
49	4,9	--	--				24,8	13,7	Neg.	1:8	
50	5,7	--	--				23,3	13,8	Neg.	1:8	
51	6,7	1,8E+07	2,7E+06				--	--	--	--	
52	7,8	--	--		48h	Staubfeucht	28,5	13,6	Neg.	1:16	
53	6,3	--	--				23,7	13,3	Neg.	1:16	
54	4,6	2,2E+07	4,8E+06				--	--	--	--	
55	3,0	--	--				26,3	12,5	Neg.	1:16	
56	2,4	--	--		23,6	13,2	Neg.	1:8			
57	3,7	5,3E+07	1,4E+07		-70 °C	0 h	Staubfeucht	--	--	--	--
58	4,2	--	--					32,9	20	Neg.	1:16
59	4,2	--	--					24,4	13,8	Neg.	1:8
60	4,1	4,8E+06	1,2E+06	4 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--	
61	4,5	--	--				26,1	19,7	Neg.	1:16	
62	5,0	--	--				24,6	13,1	Neg.	1:8	
63	4,9	7,1E+06	1,4E+06				--	--	--	--	
64	4,3	--	--		48 h	Staubfeucht	26,7	13,3	Neg.	1:16	
65	5,0	--	--				25,0	25,0	Neg.	Neg.	
66	4,8	5,5E+07	1,1E+07				--	--	--	--	
67	4,5	--	--				34,9	32,2	Neg.	Neg.	
68	4,6	--	--		31,7	23,4	Neg.	Neg.			
69	4,5	1,1E+07	2,4E+06		20 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--
70	4,3	--	--					24,8	13,3	Neg.	1:16
71	4,4	--	--					33,1	14,6	Neg.	1:4
72	5,0	2,0E+07	4,0E+06	48 h		Staubfeucht	--	--	--	--	
73	4,8	--	--				25,3	12,6	Neg.	1:16	
74	4,5	--	--				24,7	13,9	Neg.	1:8	
75	4,8	3,4E+07	7,1E+06	96 h		Staubfeucht	--	--	--	--	
76	4,9	--	--				27,3	12,5	Neg.	1:16	
77	5,4	--	--				24,4	12,3	Neg.	1:16	
78	5,4	8,0E+06	1,5E+06	37 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--	
79	5,4	--	--				24,1	12,6	Neg.	1:16	
80	5,9	--	--				23,6	12,8	Neg.	1:16	
81	6,0	2,0E+07	3,4E+06		48 h	Staubfeucht	--	--	--	--	
82	5,6	--	--				24,8	12,6	Neg.	1:16	
83	6,2	--	--				24,2	12,4	Neg.	1:16	
84	6,2	3,6E+07	5,7E+06		96 h	Staubfeucht	--	--	--	--	
85	5,9	--	--				24,4	13	Neg.	1:8	
86	5,9	--	--				23,7	13,0	Neg.	1:16	

4.5.2 Ergebnisse der in Zentrifugenröhrchen gelagerten Virus-dotierten Feinstaubfilter

4.5.2.1 Feinstaubherstellung aus Virus-dotierter Hühnerkotsuspension

Da die vorangegangenen Untersuchungsreihen gezeigt hatten, dass die erzeugten Feinstaubfilter höhere Virusgehalte als angenommen hatten (vergl. 4.4.2.7), wurden für alle nachfolgenden Untersuchungen eine niedrigere Virusdotierung der Kotsuspension (4-5 statt 10-20 ml/l) sowie eine kurze Filterbeaufschlagungszeit (3 statt bisher 5 Minuten) gewählt. Außerdem wurden die mit Feinstaub beaufschlagten Filter nunmehr in Zentrifugenröhrchen statt in Kunststofftüten aufbewahrt, damit unkalku-

liebbare Feinstaubverluste durch Adhäsion am Aufbewahrungsmaterial weitgehend ausgeschlossen werden konnten.

Tab. 45 enthält die Untersuchungsergebnisse von entsprechenden Feinstaubfiltern, für deren Herstellung eine Hühnerkotsuspension (50 g TS/l) mit pH 7 und einer Virusdotierung von 5 ml/l Suspension eingesetzt wurde. Dabei wurden Filter erhalten, die $6,3 \times 10^6$ bis $2,8 \times 10^8$ Virusgenomkopien pro Filter aufwiesen. Die ins Brutei dosierten 0,2 ml Filterextrakt sollten dann mehr als $4,2 \times 10^5$ Virusgenomkopien enthalten haben. Wie an anderer Stelle bereits diskutiert (s. 4.4.2.7), hatten die um Faktor 3-7 reduzierten Virus- und Feinstaubbeaufschlagungen zu keiner signifikanten Abnahme der Virusgenomanzahlen auf den Filtern geführt.

Die unmittelbar nach der Filterherstellung bei -70 °C eingelagerten Kontrollfilter erwiesen sich im Brutei-Versuch als infektiös. Auch die bei -20 °C staubfeucht gelagerten Filter lieferten durchgehend Influenza-positive Befunde. Die restlichen Ergebnisse wichen dagegen deutlich von den bisherigen Befunden ab: Die bei 4 °C gelagerten Filter ergaben auch nach 96 h noch positive Influenza-Befunde im Brutei. Auch bei den bei 20 °C gelagerten Filtern lieferten fast alle Filter positive Befunde im Brutei; lediglich bei einem 96 h bei 20 °C gelagerten Filter war keine Infektiosität mehr nachweisbar. Die bei 37 °C und 50 °C gelagerten Filter wiesen bereits nach 15 Stunden keine im Brutei infektiösen Influenza-Viren mehr auf.

Die Unterschiede dieser Befunde von den Befunden der in Kunststofftüten gelagerten Filter führten zu der Hypothese, dass die Feuchtigkeit des Feinstaubes einen Einfluss auf die Stabilität der Influenza-Viren hatte: Die Kunststofftüten konnten nicht luftdicht verschlossen werden, sodass mit steigender Lagerungstemperatur eine zunehmende Trocknung des Feinstaubes stattfinden konnte. Die bei 4 °C im Kühlraum gelagerten Filter hätten dagegen Feuchtigkeit aus der Luft aufnehmen können, sodass die in Kunststofftüten gelagerten Filter verschiedene Feuchtegehalte entwickelten, die sich stärker auf die Stabilität der Viren auswirkte als die geprüften Lagerungstemperaturen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Filter zusätzlich trocken und feucht in Zentrifugenröhrchen gelagert. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in Tab. 46, Tab. 47 und Tab. 48 zusammengestellt.

Tab. 45: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihe V6/pH7/ 29.01.2008/Zentrifugenröhrchen

Filter	Staubbelastung mg/Filter	Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämaggl.			
		1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor	nach	vor	nach		
							Ei-Passage		Ei-Passage			
075	1,3	6,3E+06	4,9E+06	-70 °C	0 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
076	1,2											
077	1,4	--	--							32,6	11,9	Neg.
078	1,5	9,9E+06	6,7E+06	-20 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
079	1,6											
080	1,8	--	--						26,9	14,1	Neg.	1:16
081	1,5	9,7E+06	6,6E+06						--	--	--	--
082	2,1						48 h					
083	1,8	--	--						26,5	11,9	Neg.	1:16
084	1,4	1,3E+07	9,2E+06						--	--	--	--
085	2,1						96 h					
086	2,1	--	--						26,9	11,2	Neg.	1:16
087	1,5	1,3E+07	9,1E+06						--	--	--	--
088	1,4			4 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
089	1,5	--	--							31,5	11,1	Neg.
090	1,6	1,2E+07	7,3E+06				48 h		--	--	--	--
091	1,8											
092	1,9	--	--						27,7	11,9	Neg.	1:8
093	1,8	9,9E+06	5,4E+06				96 h		--	--	--	--
094	1,8	--	--									
095	1,6	--	--						34,8	19,4	Neg.	1:8
096	1,7	1,2E+07	6,8E+06	20 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
097	1,9											
098	2,0	--	--						26,8	18,7	Neg.	1:8
099	2,0	1,1E+07	5,4E+06				48 h		--	--	--	--
100	1,9											
101	1,3	--	--						27,8	19,5	Neg.	1:16
102	1,4	8,0E+06	5,6E+06				96 h		--	--	--	--
103	1,9											
104a	1,8	--	--						26,7	13,2	Neg.	1:8
104b	1,8	--	--						26,7	Kein Ct	Neg.	Neg.
105	1,5	1,2E+07	8,1E+06	37 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
106	1,7											
107	1,4	--	--						32,3	Kein Ct	Neg.	Neg.
108	1,8	1,0E+08	5,8E+07				48 h		--	--	--	--
109	1,9											
110	2,3	--	--						33,7	Kein Ct	Neg.	Neg.
111	1,9	1,0E+07	5,5E+06				96 h		--	--	--	--
112	1,7											
113	1,9	--	--				26,9	Kein Ct	Neg.	Neg.		
114	2,0	8,0E+06	3,9E+06	50 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
115	2,0											
116	2,1	--	--						26,3	34,9	Neg.	Neg.
117	2,1	2,8E+08	1,4E+08				48 h		--	--	--	--
118	1,9											
119	1,8	--	--						34	Kein Ct	Neg.	Neg.
120	1,9	7,3E+06	3,9E+06				96 h		--	--	--	--
121	2,1											
122	2,3	--	--				26,9	Kein Ct	Neg.	Neg.		

In Tab. 46 sind die Ergebnisse der Untersuchungsreihe zusammengefasst, bei der die Feinstaubfilter bei unterschiedlichen Feuchten gelagert wurden. Für die Herstellung der Feinstaubfilter wurde eine Hühnerkotsuspension (50 g TS/l) mit pH 7 und einer Virusdotierung von 5 ml/l Suspension eingesetzt. Dabei wurden Filter erhalten, die $2,0 \times 10^6$ bis $1,7 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter aufwiesen. Die ins Brutei dosierten 0,2 ml Filterextrakt sollten dann mehr als $1,3 \times 10^5$ Virusgenomkopien enthalten haben. Die Befunde der staubfeucht gelagerten Filter bestätigten die in Tab. 45 dokumentierten Ergebnisse: Erst bei einer Lagerung bei 20 °C wurde bei einem Filter innerhalb von 96 h eine Inaktivierung der Influenza-Viren beobachtet. Mit steigender Lagerungstemperatur nahm die Virusstabilität rasch ab, sodass die bei 50 °C für 15 h gelagerten Filter im Brutei nicht mehr infektiös waren. Bemerk-

kenswert sind Befunde für die in feuchter Atmosphäre gelagerten Filter: Sowohl die bei 4 °C als auch die bei 37 °C gelagerte Filter enthielten bereits nach 48 h keine infektiösen Viren mehr. Die staubfeucht und in trockener Atmosphäre bei 4 °C gelagerten Filter waren noch nach 96 h im Brutei infektiös. Hohe Luftfeuchtigkeit und hohe Temperaturen bewirkten demnach eine schnellere Inaktivierung der Influenza-Viren auf den Feinstaubfiltern; die bei 37 °C gelagerten Filter erwiesen sich nach 48 h unabhängig von der Feuchte im Brutei als nicht mehr infektiös.

Tab. 46: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihe V5/pH7/ 21.01.2008/Zentrifugenröhrchen

Filter	Staubbelastung mg/Filter	Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämaggl.			
		1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor	nach	vor	nach		
							Ei-Passage		Ei-Passage			
01	1,5	8,1E+06	5,4E+06	-70 °C	0 h	Kontrolle	--	--	--	--		
02	1,6	--	--				--	--	--	--	--	--
03	1,7	--	--				27,4	13	Neg.	1:8		
28	2,7	6,7E+06	2,5E+06	4 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--		
29	3,0	--	--				--	--	--	--	--	--
30	2,9	--	--				28,2	Kein Ct	Neg.	Neg.		
31	2,2	8,6E+06	3,9E+06		96 h		--	--	--	--	--	
33	2,7	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.		
58	2,3	2,5E+06	1,1E+06				--	--	--	--	--	--
59	2,5	--	--	37 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--		
60	2,7	--	--				--	--	--	--	--	--
61	2,8	2,0E+06	7,2E+05				36,2	37	Neg.	Neg.		
62	3,0	--	--		--		--	--	--	--	--	
63	2,9	--	--		96 h		--	--	--	--	--	
04	1,9	5,1E+06	2,6E+06				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.		
05	2,0	--	--	--		--	--	--	--	--		
06	2,2	--	--	-20 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
07	2,4	6,2E+06	2,6E+06				27,5	17,3	Neg.	1:16		
08	2,5	--	--				--	--	--	--	--	--
09	2,7	--	--		48 h		26,5	20,6	Neg.	1:8		
10	2,8	6,3E+06	2,2E+06				--	--	--	--	--	--
11	2,8	--	--				96 h	27	19	Neg.	1:8	
12	2,6	--	--	--	--	--		--	--	--		
13	2,8	1,8E+07	6,4E+06	--	--	--		--	--	--		
14	2,7	--	--	4 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--		
15	2,6	--	--				25,9	12,5	Neg.	1:8		
16	1,6	6,6E+06	4,1E+06				--	--	--	--	--	--
17	2,0	--	--		48 h		27,9	19,7	Neg.	1:8		
18	2,1	--	--				--	--	--	--	--	--
19	2,3	1,6E+07	5,4E+06				--	--	--	--	--	--
20	2,4	--	--	96 h	--	--	--	--	--	--		
21	2,4	--	--		33,5	19,2	Neg.	1:8				
34	2,3	1,7E+07	7,3E+06		--	--	--	--	--	--		
35	2,7	--	--		20 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--	
36	1,8	--	--					30,3	14	Neg.	1:16	
37	2,3	8,0E+06	3,5E+06					--	--	--	--	--
38	2,5	--	--	48 h		--		--	--	--	--	--
39	2,5	--	--			33,8		17	Neg.	1:16		
40	2,8	6,4E+06	2,2E+06			--		--	--	--	--	--
41	2,7	--	--	96 h	--	--	--	--	--	--		
42a	3,1	--	--		Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.				
42b	3,1	--	--		Kein Ct	19,7	Neg.	1:8				
43	3,3	8,3E+06	2,5E+06		--	--	--	--	--	--		
44	3,1	--	--		37 °C	15 h	Staubfeucht	--	--	--	--	
45	3,3	--	--					Kein Ct	19,4	Neg.	1:8	
46	2,9	8,1E+06	2,8E+06	--				--	--	--	--	--
47	2,6	--	--	48 h		--		--	--	--	--	--
48	2,4	--	--			28,2		Kein Ct	Neg.	Neg.		
49	2,4	7,5E+06	3,2E+06			--		--	--	--	--	--
50	2,4	--	--	96 h	--	--	--	--	--	--		
51	2,6	--	--		27,4	Kein Ct	Neg.	Neg.				
64	2,9	9,0E+06	3,1E+06		50 °C	15 h	--	--	--	--	--	
65	3,0	--	--	--			--	--	--	--	--	--

Filter	Staubbelastung mg/Filter	Virusgenomkopien 1/Filter 1/mg		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämaggl.	
							vor	nach	vor	nach
				Temp.	Dauer	Feuchte	Ei-Passage		Ei-Passage	
66	3,0	--	--	48 h	96 h	Trocken	33,9	35,5	Neg.	Neg.
67	3,1	1,2E+07	3,8E+06				--	--	--	--
68	2,7	--	--				--	--	--	--
69	2,4	--	--				35,3	36,2	Neg.	Neg.
70	2,2	1,3E+07	6,1E+06				--	--	--	--
71	2,3	--	--				--	--	--	--
72	2,4	--	--				34,8	36,8	Neg.	Neg.
22	2,5	8,0E+06	3,2E+06	48 h	96 h	Trocken	--	--	--	--
23	2,8	--	--				--	--	--	--
24	3,0	--	--				26,6	12,3	Neg.	1:16
25	2,8	1,3E+07	4,5E+06				--	--	--	--
26	2,7	--	--				--	--	--	--
27	3,0	--	--				26,3	20,3	Neg.	1:8
73	2,4	--	--				--	--	--	--
52	2,7	5,9E+06	2,2E+06	37 °C	48 h	Trocken	--	--	--	--
53	2,7	--	--				--	--	--	--
54	2,7	--	--				28	27,9	Neg.	Neg.
55	2,4	1,0E+07	4,1E+06				--	--	--	--
56	2,3	--	--				--	--	--	--
57	2,6	--	--				28	Kein Ct	Neg.	Neg.

Zur Überprüfung des Einflusses der Lagerungsfeuchte auf die Infektiosität der Influenza-Viren wurden ergänzende Untersuchungsreihen durchgeführt.

Die in Tab. 47 aufgeführten Befunde bestätigen die bisherigen Beobachtungen: In feuchter Atmosphäre und bei 4 °C, 20 °C und 37 °C gelagerte Filter wiesen bereits nach 48 h keine im Brutei mehr nachweisbare Infektiosität auf. Staubfeucht und in trockener Atmosphäre bei 4 °C gelagerte Filter erwiesen sich auch nach 96 h im Brutei noch als infektiös. Bei 37 °C gelagerte Filter waren bei allen geprüften Feuchten bereits nach 48 h im Brutei nicht mehr infektiös.

Für die Herstellung der Feinstaubfilter wurde eine Hühnerkotsuspension (50 g TS/l) mit pH 7 und einer Virusdotierung von 4 ml/l Suspension eingesetzt. Dabei wurden Filter erhalten, die $4,0 \times 10^6$ bis $9,7 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter aufwiesen. Die ins Brutei dosierten 0,2 ml Filterextrakt sollten dann mehr als $2,7 \times 10^5$ Virusgenomkopien enthalten haben.

Tab. 47: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihe V8/pH7/03.03.2008/Zentrifugenröhrchen

Filter	Staubbelastung mg/Filter	Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämagl.	
		1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor	nach	vor	nach
							Ei-Passage		Ei-Passage	
39	1,4	--	--	-70 °C	0 h	Kontrolle	--	--	--	--
40a	1,3	--	--				31	Kein Ct	Neg.	Neg.
40b	1,3	--	--				31	12,7	Neg.	1:4
49	1,4	5,9E+06	4,1E+06	4 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--
50	1,6	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
51	1,3	5,0E+06	3,9E+06				--	--	--	--
52	1,3	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
61	1,9	7,2E+06	3,8E+06				--	--	--	--
62	1,9	--	--				26,4	Kein Ct	Neg.	Neg.
63	1,8	7,7E+06	4,3E+06	20 °C	96 h	Feucht	--	--	--	--
64	1,8	--	--				29,9	Kein Ct	Neg.	Neg.
73	1,8	6,4E+06	3,6E+06	37 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--
74	1,6	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
75	1,3	4,0E+06	3,0E+06				--	--	--	--
76	1,3	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
41	1,6	5,5E+06	3,5E+06	4 °C	48 h	Staubfeucht	--	--	--	--
42a	1,5	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
42b	1,5	--	--				Kein Ct	12,5	Neg.	1:4
43	1,3	6,1E+06	4,7E+06				--	--	--	--
44a	1,2	--	--				36	Kein Ct	Neg.	Neg.
44b	1,2	--	--				36	16,3	Neg.	1:4
53	1,6	6,9E+06	4,4E+06	20 °C	96 h	Staubfeucht	--	--	--	--
54	1,6	--	--				34,1	Kein Ct	Neg.	Neg.
55	1,4	8,1E+06	5,6E+06				--	--	--	--
56	1,5	--	--				35,1	Kein Ct	Neg.	Neg.
65	2,0	7,5E+06	3,8E+06	37 °C	48 h	Staubfeucht	--	--	--	--
66	2,1	--	--				27,8	Kein Ct	Neg.	Neg.
67	1,9	9,2E+06	4,7E+06				--	--	--	--
68	1,7	--	--				29,6	Kein Ct	Neg.	Neg.
45	1,5	7,4E+06	4,9E+06	4 °C	48 h	Trocken	--	--	--	--
46a	1,4	--	--				29,4	14,3	Neg.	1:8
46b	1,4	--	--				29,4	16,8	Neg.	1:4
47	1,1	6,0E+06	5,3E+06				--	--	--	--
48a	1,3	--	--				30,8	Kein Ct	Neg.	Neg.
48b	1,3	--	--				30,8	11,8	Neg.	1:8
57	1,7	7,5E+06	4,4E+06	20 °C	96 h	Trocken	--	--	--	--
58 *	1,7	--	--				28,4	14,2	Neg.	1:4
59	1,6	4,6E+06	2,9E+06				--	--	--	--
60	1,6	--	--				35	Kein Ct	Neg.	Neg.
69	2,0	9,7E+06	5,0E+06				--	--	--	--
70	1,9	--	--				30,8	Kein Ct	Neg.	Neg.
71	1,5	7,6E+06	5,1E+06	37 °C	48 h	Trocken	--	--	--	--
72	1,4	--	--				29	Kein Ct	Neg.	Neg.

Die Aussagekraft der Ergebnisse der Untersuchungsreihe V8 wurde jedoch dadurch eingeschränkt, dass am Tag der Filterherstellung ein Defekt der Tiefkühltruhe festgestellt wurde und nicht abschließend geklärt werden konnte, ob die eingesetzten Viren bereits längere Zeit bei höheren Temperaturen als den angestrebten -70 °C gelagert waren. Deshalb wurde eine weitere Untersuchungsreihe zur Absicherung der Befunde durchgeführt, deren Ergebnisse in Tab. 48 zusammengefasst sind.

Die in Tab. 48 aufgeführten Befunde der Untersuchungsreihe V10 bestätigen die bisherigen Beobachtungen: In feuchter Atmosphäre bei 4 °C und 20 °C gelagerte Filter wiesen bereits nach 48 h keine im Brutei mehr nachweisbare Infektiosität auf. Staubfeucht und in trockener Atmosphäre bei 4 °C gelagerte Filter erwiesen sich auch nach 96 h im Brutei noch als infektiös. Bei 20 °C gelagerte Filter waren bei staubfeuchter Lagerung bereits nach 48 h im Brutei nicht mehr infektiös; bei trockener Lagerung war nach 48 und 96 h noch Infektiosität nachweisbar. Für die Herstellung der Feinstaubfilter wurde eine Hühnerkotsuspension (50 g TS/l) mit pH 7 und einer Virusdotierung von 5 ml/l Suspension eingesetzt. Dabei wurden Filter erhalten, die $7,4 \times 10^6$ bis $2,7 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter aufwiesen. Die ins Brutei dosierten 0,2 ml Filterextrakt sollten dann mehr als $4,9 \times 10^5$ Virusgenomkopien enthalten haben.

Für die Untersuchungen im Brutei wurden jeweils 4 Filtereluate zu einer Poolprobe vereint, um den Bruteiverbrauch kostengünstig und optimal zu gestalten.

Tab. 48: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihe V10/pH7/08.04.2008/Zentrifugenröhrchen

Filter	Staubbeladung mg/Filter	Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämagl.	
		1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor	nach	vor	nach
							Ei-Passage		Ei-Passage	
7-10	2,03	--	--	-70 °C	0 h	Staubfeucht	26,9	12,2	Neg.	1:8
11	1,8	7,4E+06	4,0E+06				--	--	--	--
22-25	2,3	--	--				26,0	36,3	Neg.	Neg.
26	1,9	1,2E+07	6,6E+06	+4 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--
37-40	2,5	--	--				34,3	34,6	Neg.	Neg.
41	2,2	1,6E+07	7,5E+06				--	--	--	--
52-55	2,7	--	--				35,4	37,2	Neg.	Neg.
56	3,1	1,3E+07	4,2E+06				--	--	--	--
67-70	3,0	--	--	+20 °C	96 h	Feucht	26,2	38	Neg.	Neg.
71	3,3	1,5E+07	4,7E+06				--	--	--	--
12-15	1,7	--	--	+4 °C	48 h	Staubfeucht	34,4	29,9	Neg.	Neg.
16	2,0	1,9E+07	9,7E+06				--	13,5		1:16
27-30	2,2	--	--				35,2	12,9	Neg.	1:16
31	2,4	1,6E+07	6,6E+06	+20 °C	96 h	Staubfeucht	--	--	--	--
42-45	2,7	--	--				25,6	30,6	Neg.	Neg.
46	2,7	1,6E+07	6,1E+06				--	--	--	--
57-60	3,2	--	--				25,2	36,1	Neg.	Neg.
61	2,9	2,0E+07	6,7E+06				--	--	--	--
17-20	2,4	--	--	+4 °C	48 h	Trocken	36,8	12,5	Neg.	1:16
21	2,9	1,8E+07	6,4E+06				--	--	--	--
32-35	2,8	--	--				25,8	12,7	Neg.	1:16
36	3,3	2,7E+07	8,3E+06				--	--	--	--
47-50	2,3	--	--	+20 °C	48 h	Trocken	33,5	36,3	Neg.	Neg.
51	2,5	1,1E+07	4,5E+06				--	12,8		1:16
62-65	2,6	--	--				26,0	34,6	Neg.	Neg.
66	2,6	1,8E+07	7,1E+06	--	--	--	--	13,78	1:8	

In Tab. 49 sind die Befunde der ergänzenden Untersuchungsreihe V11 zusammengefasst. Bei dieser Reihe wurden wiederum jeweils 4 Feinstaubfilter zu einer Poolprobe vereint. Die Filter wurden nur im staubfeuchten Zustand bei 4 und 20 °C bis zu 96 h gelagert. Für die Herstellung der Feinstaubfilter

wurde eine Hühnerkotsuspension (50 g TS/l) mit pH 7 und einer Virusdotierung von 5 ml/l Suspension eingesetzt. Dabei wurden Filter erhalten, die $1,6 \times 10^7$ bis $2,1 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter aufwiesen. Die ins Brutei dosierten 0,2 ml Filterextrakt sollten dann mehr als $1,1 \times 10^6$ Virusgenomkopien enthalten haben.

Tab. 49: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihe V11/pH7/30:05:2008/Zentrifugenröhrchen

Filter	Staubbe- ladung	Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämaggl.	
		mg/Filter	1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor	nach	vor
	Ei-Passage		Ei-Passage							
1+11+21+31	1,9	--	--	- 70 °C	0 h	Staub- feucht	26,0	18,5	Neg.	1:16
6+16+26+36	2,1	1,7E+07	8,2E+06				--	--	--	--
2+12+22+32	2,0	--	--	4 °C	48 h	Staub- feucht	29,4	12,7	Neg.	1:16
7+17+27+37	2,2	1,6E+07	7,4E+06				--	--	--	--
3+13+23+33	2,1	--	--				26,1	12,1	Neg.	1:64
8+18+28+38	2,2	1,7E+07	7,9E+06	20 °C	96 h	Staub- feucht	--	--	--	--
4+14+24+34	2,1	--	--				26,0	40,8	Neg.	Neg.
9+19+29+39	2,2	2,0E+07	9,3E+06				--	--	--	--
5+15+25+35	2,0	--	--				25,9	Kein Ct	Neg.	Neg.
10+20+30+40	2,1	2,1E+07	1,0E+07				--	--	--	--

Die Ergebnisse bestätigen die Befunde der vorangegangenen Untersuchungen: Staubfeucht bei 4 °C gelagerte Virus-dotierte Feinstaubfilter erwiesen sich nach 96 h im Brutei noch als infektiös. Bei 20 °C staubfeucht gelagerte Virus-dotierte Feinstaubfilter waren bereits nach 48 h im Brutei nicht mehr infektiös.

Neben den unverdünnten Filtereluaten wurden bei dieser Untersuchungsreihe zusätzlich Verdünnungen der Eluate im Brutei eingesetzt, um den Infektiositätstiter der Virus-dotierten Feinstaubfilter zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigt Tab. 50.

Tab. 50: Virustiter im Brutei von staubtrocken gelagerten Feinstaubfiltern der Reihe V11

Verd.	-70 °C; 0 h					4 °C; 48 h					4 °C; 96 h				
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1:1	***	26,0	18,5	Neg.	1:16	****	29,4	12,7	Neg.	1:16	*	26,1	12,1	Neg.	1:64
			25,1		Neg.	1:16				Kein Ct	Neg.		Neg.		
1:2	****	27,0	12,5	Neg.	1:16	***	26,6	16,5	Neg.	1:16		37,1	Kein Ct	Neg.	Neg.
			29,0		Neg.	1:16				Neg.					
1:10	***	34,2	11,8	Neg.	1:32	***	33,2	12,5	Neg.	1:16	*	34,0	18,7	Neg.	1:32
			Kein Ct		Neg.	1:16				Kein Ct	Neg.				
1:50	***	32,8	12,9	Neg.	1:8	***	33,2	12,2	Neg.	1:16		34,5	Kein Ct	Neg.	Neg.
			Kein Ct		Neg.	1:16				Neg.					
1:100		34,9	Kein Ct	Neg.	Neg.		33,3	38,9	Neg.	Neg.		35,5	Kein Ct	Neg.	Neg.

A: * markiert ein abgestorbenes Ei bzw. *** drei- bzw. **** vier abgestorbene Eier; leeres Feld ohne Stern bedeutet, dass das Ei vital blieb / B, C: Ct-Werte bei der PCR vor bzw. nach Eipassage / D, E: Hämagglutinationstiter vor bzw. nach Eipassage

Bei den unmittelbar nach der Filterherstellung bei -70 °C gelagerten Filtern waren noch die 1:50 verdünnten Filtereluaten im Brutei infektiös: Bei 3 von 4 Bruteiern bewirkte rechnerisch die Dosierung von 22.000 Virusgenomkopien eine Influenza-Infektion, die zum Absterben des Hühnerembryos führte.

Ein vergleichbarer Titer infektiöser Influenza-Viren lag bei den bei 4 °C über 48 h staubfeucht gelagerten Feinstaubfiltern vor. Bei 4 °C über 96 h staubfeucht gelagerten Feinstaubfiltern war nur noch das 1:10 verdünnte Filtereluat infektiös. Offenbar war die Infektiosität der Influenza-Viren zwischen der 48.ten und 96.ten Lagerungsstunde stark zurückgegangen.

4.5.2.2 Feinstaubherstellung aus Virus-dotierter PBS-Lösung

Um zu prüfen, ob die Kotbestandteile einen positiven Einfluss auf die Virusstabilität im Feinstaub hatten, wurde für die Feinstaubherstellung anstelle einer virusdotierten Kotsuspension eine mit 5 ml/l Viruslösung dotierte PBS-Lösung eingesetzt. Die dabei erhaltenen Ergebnisse zeigt Tab. 51.

Tab. 51: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihe V7/pH7/03.03.2008/PBS-Lösung/Zentrifugenröhrchen

Filter	Staubbelastung mg/Filter	Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämaggl.	
		1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor Ei-Passage	nach Ei-Passage	vor Ei-Passage	nach Ei-Passage
	01	0,4	--	--	-70 °C	0h	Kontrolle	--	--	--
02	0,5	--	--	Kein Ct				Kein Ct	Neg.	Neg.
11	0,6	9,1E+06	1,4E+07	4 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--
12	0,6	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
13	0,5	6,1E+06	1,3E+07				--	--	--	--
14	0,5	--	--				34	Kein Ct	Neg.	Neg.
23	0,4	8,6E+06	2,5E+07	20 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--
24	0,8	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
25	0,7	4,5E+06	6,8E+06				--	--	--	--
26	0,6	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
35	0,7	5,4E+06	7,5E+06	37 °C	48 h	Feucht	--	--	--	--
36	0,7	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
37	0,8	2,7E+06	3,5E+06				--	--	--	--
38	0,8	--	--				Kein Ct	34,9	Neg.	Neg.
03	0,5	3,3E+06	6,0E+06	4 °C	48 h	Staubfeucht	--	--	--	--
04	0,7	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
05	0,6	--	--				36	32	Neg.	Neg.
06	0,7	6,5E+06	8,9E+06				--	--	--	--
15	0,6	5,6E+06	1,0E+07	20 °C	48 h	Staubfeucht	--	--	--	--
16	0,8	--	--				38,3	Kein Ct	Neg.	Neg.
17	0,7	3,5E+06	5,1E+06				--	--	--	--
18	0,7	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
27	0,6	5,3E+06	9,6E+06	37 °C	48 h	Staubfeucht	--	--	--	--
28	0,7	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
29	0,7	4,2E+06	6,3E+06				--	--	--	--
30	0,7	--	--				37,1	Kein Ct	Neg.	Neg.
07	0,8	1,0E+07	1,3E+07	4 °C	48 h	Trocken	--	--	--	--
08	0,8	--	--				39,6	Kein Ct	Neg.	Neg.
09	0,8	1,1E+07	1,3E+07				--	--	--	--
10a	0,8	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
10b	0,8	--	--	Kein Ct	17,2	Neg.	1:16			
19	0,8	6,9E+06	8,5E+06	20 °C	48 h	Trocken	--	--	--	--
20	0,9	--	--				38,2	Kein Ct	Neg.	Neg.
21	0,9	7,9E+06	9,2E+06				--	--	--	--
22	0,9	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
31	0,8	9,0E+06	1,1E+07	37 °C	48 h	Trocken	--	--	--	--
32	0,7	--	--				Kein Ct	Kein Ct	Neg.	Neg.
33	0,6	5,8E+06	9,5E+06				--	--	--	--
34	0,6	--	--				35,3	Kein Ct	Neg.	Neg.

Obwohl bei dieser Untersuchungsreihe eine um 20 % höhere Virusdotierung gewählt wurde als bei der Untersuchungsreihe V8 (s. Tab. 47), war bereits bei dem unmittelbar nach der Filterherstellung bei -70 °C gelagerten Kontrollfilter im Brutei keine Infektiosität mehr nachweisbar. Im Vergleich zu den in der Untersuchungsreihe V8 aufgeführten Befunden wurden auf den mit der PBS-Lösung hergestellten Filtern deutlich geringere Befunde für die Virusinfektiosität gefunden: Nur einer von 19 geprüften Filtern ergab eine im Brutei nachweisbare Infektiosität; bei der Reihe V8 ergaben 7 der 24 geprüften Filter Influenza-positive Befunde. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Viren bei der Aerosolherstellung aus PBS-Lösung beim Eintrocknen der PBS-Aerosoltröpfchen durch die resultierenden hohen Salzkonzentrationen geschädigt werden. Da bei dieser Untersuchungsreihe auch jene Viruslösung zum Einsatz kam, von der wegen eines Defektes der Tiefkühltruhe unbekannt war, ob die Viren bereits bei der Lagerung vorgeschädigt waren, wurde eine ergänzende Untersuchungsreihe durchge-

führt. Hierbei wurde wiederum eine PBS-Lösung mit 5 ml/l Viruslösung dotiert. Die vom bifa überprüften Filter wiesen im Mittel $1,2 \times 10^7$ Virusgenomkopien pro Filter auf, so dass die im Brutei eingesetzten 0,2 ml Filtereluat mindestens $4,9 \times 10^5$ Virusgenomkopien enthalten hatten. Bereits die Mischprobe der 4 unmittelbar nach der Filterbeaufschlagung bei -70 °C gelagerten Filter erwies sich im Brutei als nicht mehr infektiös. Dieselbe Viruscharge war am gleichen Tag in Kotsuspension eingetragen worden und die daraus hergestellten Hühnerkotfeinstaubfilter erwiesen sich bei vergleichbaren Virusgenomkopien pro Filter im Brutei als infektiös (vergleiche Tab. 48). Dieser Vergleich verdeutlicht, dass die Infektiosität der Viren bei einer Trocknung eines Aerosols aus mineralischer Lösung wesentlich schneller verloren geht als bei der Trocknung eines Aerosols aus organikreicher Kotsuspension.

Tab. 52: Ergebnisüberblick der Untersuchungsreihe V9/pH7/08.04.2008/PBS-Lösung/Zentrifugenröhrchen

Filter	Staubbelastung		Virusgenomkopien		Lagerungsbedingungen			PCR Ct-Werte		Hämaggl.	
	mg/Filter	1/Filter	1/mg	Temp.	Dauer	Feuchte	vor	nach	vor	nach	
							Ei-Passage		Ei-Passage		
1	0,5	--	--	-70 °C	0 h	Staubfeucht	37,2	Kein Ct	Neg.	Neg.	
2	0,6	--	--								
3	0,7	--	--								
4	0,8	--	--								
5	0,8	7,3E+06	8,7E+06								
6	0,8	1,6E+07	2,0E+07								
Vergleichsdaten aus Tab. 48 von Filtern mit Hühnerkotfeinstaubauflage											
7-10	2,03	--	--	-70 °C	0 h	Staubfeucht	26,9	12,2	Neg.	1:8	
11	1,8	7,4E+06	4,0E+06				--	--	--	--	

4.5.3 Fazit

Anfangs wurden die Virus-dotierten Filter in Kunststofftüten **staubfeucht** bei verschiedenen Temperaturen bis zu 96 h gelagert. Im Brutei erwiesen sich nur einige der bei 4 °C gelagerten Feinstaubfiltereluate nicht mehr als infektiös. Alle bei -70 °C (Kontrolle), -20 °C , 20 °C und 37 °C gelagerten Filter waren auch nach 96 h noch infektiös. Bei der Bearbeitung war jedoch aufgefallen, dass bei den bei 4 °C gelagerten Filtern Feinstaub an den Tüten haftete, was auf eine erhöhte Feuchtigkeit bei der Lagerung (Kondensation von Luftfeuchtigkeit) hindeutete.

Deshalb wurden die Virus-dotierten Filter danach in Kunststoffröhrchen gelagert, die die Anhaftung von Feinstaub an der Wand verhinderten. Außerdem wurden die Filter nun in wassergesättigter Luft („feucht“), „staubfeucht“, d. h. mit der Aerosolkammer-bedingten Restfeuchte und in trockener Luft („trocken“) bei -70 °C (Kontrolle), -20 °C , 20 °C , 37 °C und 50 °C bis zu 96 h gelagert. Als weitere Veränderung wurde die Filterbelastung mit Feinstaub sowie die Virusdotierung der Filter reduziert (vergleiche Tab. 14).

Die wichtigsten Befunde sind in Tab. 53 zusammengefasst.

Alle in wasserdampfgesättigter Luft („feucht“) gelagerten Filter ergaben im Brutei durchgehend negative Befunde: Bereits nach 48-stündiger feuchter Lagerung war die (Rest-)Infektiosität der Viren soweit herabgesetzt, dass im Brutei keine Influenzainfektion mehr stattfand.

Bei 4 °C staubfeucht gelagerte Filter erwiesen sich auch nach 96 h im Brutei noch als infektiös. Offenbar waren die zuvor bei einer Filterlagerung in Kunststofftüten bei 4 °C beobachteten Virusinaktivierungen auf die bei dieser Lagerungsform aufgetretenen erhöhten Feuchtigkeiten zurückzuführen. Dieses Feuchteartefakt konnte bei der Lagerung in Kunststoffröhrchen vermieden werden, sodass das Influenza-A-Virus nunmehr auch bei 4 °C stabil blieb.

Bei Temperaturen über 20 °C war in den meisten Fällen nach 48 h keine Infektiosität im Brutei mehr nachweisbar.

In trockener Luft („trocken“) gelagerte Filter waren bei 4 °C ebenfalls nach 96 h im Brutei noch infektiös. Bei 20 °C erwiesen sich einzelne Filter auch nach 96 h noch als infektiös. Lediglich bei einer Lagerung bei 37 °C war bereits nach 48 h keine Infektiosität im Brutei mehr nachweisbar.

Tab. 53: Qualitative Ergebnismatrix der Restinfektiosität in den Brutei-Versuchen zu den Untersuchungsreihen V5, V8, V10 und V11

GRÜN: keine Restinfektiosität; GELB: Restinfektiosität bei Einzelfiltern nachweisbar
 ROT: Restinfektiosität vorhanden

Lagerung	4 °C				20 °C				37 °C		
Feucht	V5	V8	V10		V5	V8	V10		V5	V8	V10
48 h	GRÜN	GRÜN	GRÜN		GRÜN	GRÜN	GRÜN		GRÜN	GRÜN	
96 h	GRÜN	GRÜN	GRÜN		GRÜN	GRÜN	GRÜN		GRÜN	GRÜN	
Staubfeucht	V5	V8	V10	V11	V5	V8	V10	V11	V5	V8	V10
15 h	ROT				ROT				ROT		
48 h	ROT	GELB	GELB	ROT	ROT	GRÜN	GRÜN	GRÜN	GRÜN	GRÜN	
96 h	ROT	GELB	ROT	ROT	GELB	GRÜN	GRÜN	GRÜN	GRÜN	GRÜN	
Trocken	V5	V8	V10		V5	V8	V10		V5	V8	V10
48 h	ROT	ROT	ROT			ROT	GELB		GRÜN	GRÜN	
96 h	ROT	GELB	ROT			GRÜN	GELB		GRÜN	GRÜN	

Neben der Feuchte und den Temperaturen hatte auch die Anwesenheit von Kotbestandteilen einen Einfluss auf die Infektiosität des Influenza-Teststamms: Wenn die Viren in kotfreier PBS-Lösung zum Aerosol verarbeitet wurden, war bereits in der unmittelbar nach der Filterherstellung bei -70 °C gelagerten Kontrollprobe keine Infektiosität mehr nachweisbar. Offensichtlich stabilisierten die Kotbestandteile die Viren im Feinstaub. Thomas et al. (2008) haben vergleichbare Beobachtungen gemacht: Sie überprüften die Restinfektiosität von Influenza-A-Viren auf Banknotenpapieren. Dabei zeigte sich, dass die Restinfektiosität besonders lange erhalten blieb, wenn die Viren in Sekreten aus dem Atmungstrakt suspendiert und auf die Banknoten aufgebracht wurden.

Zusammenfassend zeigen die Befunde für die untersuchten Influenza-A-Viren, dass diese im Feinstaub aus Hühnerkot bei hohen Feuchten und Temperaturen (> 20 °C) relativ schnell inaktiviert werden. Diese Ergebnisse stimmen recht gut mit den Beobachtungen anderer Autoren überein, die in anderen Umweltmedien vergleichbare Befunde machten (Hemmes et al., 1962; Lowen et al., 2007).

Bei kühler, trockener Witterung und bei geringer Sonneneinstrahlung emittierte Feinstäube aus Influenza-infizierten Stallungen könnten den Befunden zufolge über mehrere Tage infektiös bleiben. Da Feinstäube innerhalb von Tagen über große Entfernungen verfrachtet werden können, sollten Staubemissionen aus Influenza-infizierten Tierbeständen aus infektionsprophylaktischen Gründen schnellstmöglich reduziert werden.

5 Literatur

- Animal Health Australia (2005): Disease strategy: Avian influenza (Version 3.1). Australian Veterinary Emergency Plan (AUSVETPLAN), Edition 3, Primary Industries Ministerial Council, Canberra, ACT
- Applied Biosystems (2006): MagMAX™ AI/ND Viral RNA Isolation (Cat #1929) - Instruction Manual. 0608
- Applied Biosystems (2007): TaqMan® Influenza A/H5/H7/N1 Detection Kits 2.0 – Protocol. 08/2007
- Barbazan, P.; Thitithanyanont, A.; Missé, D.; Dubot, A.; Bosc, P.; Luangsri, N.; Gonzalez, J.P.; Kittayapong, P. (2008): Detection of H5N1 Avian Influenza Virus from Mosquitoes Collected in an Infected Poultry Farm in Thailand. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 8(1), 105-110
- Bean, B.; Moore, B.M.; Stemer, B.; Peterson, L.R.; Gerding, D.N.; Balfour, H.H. (1982): Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *The Journal of Infectious Diseases*; 146(1):47-51
- BfR – Bundesinstitut für Risikobewertung (2006): Pasteurisierung tötet das Influenza-A-Virus in Eiprodukten sicher ab. Stellungnahme Nr. 020/2006 vom 30. März 2006
- Boone, S. A., Gerba, C. P. (2007): Significance of Fomites in the Spread of Respiratory and Enteric Viral Disease. *Appl. Env. Microbiol.*, Vol. 73, No. 6, p. 1687-1696
- Brown, J.D.; Swayne, D.E.; Cooper, R.J.; Burns, R.E.; Stallknecht, D.E. (2007): Persistence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses in Water. *Avian Diseases*, Vol. 51, No. s1, pp. 285–289
- BStMLF – Bayerisches Staatsministerium für Landwirtschaft und Forsten (2006): Bayerischer Agrarbericht 2006
- Buchholz, U.; Uphoff, H.; Haas, W. (2005): Foliensammlung „Influenza 2005“.
http://www.rki.de/clin_049/nn_200120/DE/Content/InfAZ/I/Influenza/AGI/Vortragsfolien,templateId=raw,property=publicationFile.ppt/Vortragsfolien.ppt
- Cardona, C.J. (undatiert): Avian influenza. University of California Davis Veterinary Medicine Extension, Davis, California.
http://www.vetmed.ucdavis.edu/vetext/INFPO_AvianInfluenzaFS.html
- Chumpolbanchorn, K.; Suemanotham, N.; Siripara, N.; Puyati, B.; Chaichoune, K. (2006): The effect of temperature and UV light on infectivity of avian influenza virus (H5N1, Thai field strain) in chicken fecal manure. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, 37(1), 102-105
- De Witt, J.J. (2006): Aviäre Influenza: Risikobewertung und Möglichkeiten der Prophylaxe, Zukunft der Freilandhaltung von Legehennen. Vortrag auf Fachtagung des Zentralverbandes Eier e.V. (ZVE) 2006, <http://www.was-steht-auf-dem-ei.de/dokumente/483496149Vortrag%20Dr.%20Sjaak%20de%20Witt.pdf>
- Elbe, U.; Roß, A.; Steffens, G.; Van den Weghe, H.; Winckler, C. (2005): Ökologische Legehennenhaltung in großen Herden: Spezifische Auslaufnutzung und Nährstoffeintrag. Beitrag präsentiert bei der Konferenz: 8. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau - Ende der Nische, Kassel, 1.03.2005 - 04.03.2005
- European Food Safety Authority (2005): Animal health and welfare aspects of avian influenza. Annex to: The EFSA Journal 266, 1-21; adopted 14-Sep-2005
- Flindt, R. (2000): *Biologie in Zahlen*. SPEKTRUM Akademischer Verlag
- GVSOLAS - Gesellschaft für Versuchstierkunde (2006): Fütterungskonzepte und -methoden in der Versuchstierhaltung und im Tierversuch
<http://www.tiho-hannover.de/einricht/itv/gvsolas/auss/ern/huhnfuetterung.pdf>
- Hemmes, J.H.; Winkler, K.C.; Kool, S.M. (1962): Virus Survival as a Seasonal Factor in Influenza and Poliomyelitis. *Antonie van Leeuwenhoek*, 28, 221-233
- Hinshaw, V.S.; Webster, R.G.; Turner, B. (1979): Water-borne transmission of influenza A viruses? *Intervirology*, 11:66-68

- Hollaender, A.; Oliphant, J.W. (1941): The Inactivating Effect of Monochromatic Ultraviolet Radiation on Influenza Virus. *J. Bacteriol.*, October 48(4), 447–454
- ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses (2007):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm>
- Kamps, B.S.; Hoffmann, C.; Preiser, W. (2006): Influenza Report 2006. www.InfluenzaReport.com
- Krafeldt, A. (2004): Verfahrenstechnik in der Broilermast.
<http://landwirtschaftskammer.de/fachangebot/tierproduktion/gefluegelhaltung/management/broilermast.htm>
- LAI – Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Immissionsschutz (2006): Kanzerogene Wirkungen von Partikeln in der Atemluft. Kurzfassung und Langfassung. September 2006
- Linsel, G. (2001): Bioaerosole - Entstehung und biologische Wirkungen. In: Tagungsband „Sicherer Umgang mit biologischen Arbeitsstoffen und Zytostatika“, Braunschweig, 12.03.-13.03.2001
- Loosli, C.G.; Lemon, H.M.; Robertson, O.H.; Appel, E. (1943): Experimental Air-Borne Influenza Infection. I Influence of Humidity on Survival in Air. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 53, p. 205-206
- Lowen, A.C.; Mubareka, S.; Steel, J.; Palese, P. (2007): Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathogens*, Vol. 3, No. 10, 1470-1476
- Lu, H.; Castro, A.E.; Pennick, K.; Liu, J.; Yang, Q.; Dunn, P.; Weinstock, D.; Henzler, D. (2003): Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Diseases*, 47(s3):1015-1021
- Markwell, D.D.; Shortridge, K.F. (1982): Possible waterborne transmission and maintenance of influenza viruses in domestic ducks. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(1): 110-116
- Modrow, S.; Falke, D.; Truyen, U. (2003): *Molekulare Virologie*. SPEKTRUM Akademischer Verlag, GmbH, Heidelberg, 2. Auflage
- Nanassya, O.Z.; Haydocka, P.V.; Reed, M.W. (2007): Capture of genomic DNA on glass microscope slides. *Analytical Biochemistry*, Vol. 365, 2, 240-245
- Noyce, J.O.; Michels, H.; Keevil, C.W. (2007): Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus Stainless Steel Surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 73, No. 8, 2748–2750
- Power, C. (2005): The Source and Means of Spread of the Avian Influenza Virus in the Lower Fraser Valley of British Columbia During an Outbreak in the Winter of 2004. An Interim Report, February 15, 2005. Animal Disease Surveillance Unit of the Canadian Food Inspection Agency
- Remane, A.; Storch, V.; Welsch, U. (1981): *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. G. Fischer Verlag, Stuttgart
- Rolle/Mayr – Rolle, M.; Mayr, A. (2007): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. F. Enke Verlag, Stuttgart, 8., überarbeitete Auflage. (November 2007)
- Rutjes, S.A.; Lodder-Verschoor, F.; van der Poel, W.H.; van Duijnhoven, Y.T.; de Roda Husman, A.M. (2006): Detection of noroviruses in foods: a study on virus extraction procedures in foods implicated in outbreaks of human gastroenteritis. *J Food Prot.*,69(8), 1949-1956
- Safatov, A.S.; Agranovski, I.E.; Mikheev, V.N.; Kiselev, S.A.; Pyankov, O.V.; Skarnovich, M.O.; Petrishchenko, V.A.; Buryak, G.A.; Shishkina, L.N.; Sergeev, A.N.; Drozdov, I.G. (2007): Avian influenza (subtype H5N1) transmission mechanisms. European Aerosol Conference 2007, Salzburg, Abstract T04A012
- Sawabe, K.; Hoshino, K.; Isawa, H.; Sasaki, T.; Hayashi, T.; Tsuda, Y.; Kurahashi, H.; Tanabayashi, K.; Hotta, A.; Saito, T.; Yamada, A.; Kobayashi, M. (2004): Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. *Am J Trop Med Hyg.*, 75(2), 327-332

Scharf, P. (2004): Einfluss einer biologischen Abluftreinigungsanlage auf die Emission von Mikroorganismen und Endotoxinen aus einem Entenmaststall. Dissertation, Institut für Tier- und Umwelthygiene des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Schofield, I.; Ho, J.; Kournikakis, B.; Booth, T. (2004): AVIAN INFLUENZA AEROSOL SAMPLING CAMPAIGN IN THE BRITISH COLUMBIA FRASER VALLEY APRIL 9-19 2004 – Sampling of rare biological events. Defense R&D Canada – Suufield, Technical Report, DRDC Suffield TR 2005-032, February 2005-05-05

Scholtissek, C. (1985): Stability of Infectious Influenza A Viruses to Treatment at Low pH and Heating. Archives of Virology, 85, p. 1-11

Sobsey, M.D.; Meschke, J.S. (2003): Virus Survival in the Environment with Special Attention to Survival in Sewage Droplets and other Environmental Media of Fecal or Respiratory Origin. Draft – August 21, 2003. Informal Consultation on risk assessment and management for droplet transmission of SARS CoV from faecal and other excreta. Rome, 23-25 September 2003
www.iapmo.org/common/pdf/ISS-Rome/Sobsey_Environ_Report.pdf

SPS - Scientific Report of the Scientific Panel on Biological Hazards (2006): Food as a possible source of infection with highly pathogenic avian influenza viruses for humans and other mammals - March 2006 – 21st Plenary meeting (Question N° EFSA-Q-2005-295). The EFSA Journal, 1-29, www.efsa.eu.int

Stallknecht, D.E.; Keamey, M.T.; Shane, S.M.; Zwank, P.J. (1990a): Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. Avian Diseases, 34:412-418

Stallknecht, D.E.; Shane, S.M.; Keamey, M.T.; Zwank, P.J. (1990b): Persistence of avian influenza viruses in water. Avian Diseases, 34:406-411

Sturm-Ramirez, K.M.; Hulse-Post, D.J.; Govorkova, E.A.; Humberd, J.; Seiler, P.; Puthavathana, P.; Buranathai, C.; Nguyen, T.D.; Chaisingh, A.; Long, H.T.; Naipospos, T.S.P.; Chen, H.; Ellis, T.M.; Guan, Y.; Peiris, J.S.M.; Webster, R.G. (2005): Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? Journal of Virology, 79(17): 1269-11279

Sudhop, R. (2006): Legehennenhaltung – Vom Ei zum Brathähnchen. <http://www.biothemen.de/> unter Verzeichnis/Tierhaltung

Tellier, R. (2006): Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus. Emerging Infection Diseases Vol. 12, No. 11, p. 1657-1662

Thomas, C.; Swayne, D. E. (2007): Thermal inactivation of H5N1 high pathogenicity avian influenza virus in naturally infected chicken meat. J Food Prot.; 70(3); 674-680

Thomas, Y.; Vogel, G.; Wunderli, W.; Suter, P.; Witschi, M.; Koch, D. Tapparel, C.; Kaiser, L. (2008): Survival of Influenza Virus on Banknotes. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, No. 10, 3002–3007

Tiwari, A.; Patnayak, D.P.; Chander, Y.; Parsad, M.; Goyal, S.M. (2006): Survival of Two Avian Respiratory Viruses on Porous and Nonporous Surfaces. Avian Diseases., Vol. 50, No. 2, 284-287

TÜV Süddeutschland (2000): Bericht über „Grundsatzuntersuchung über die Ermittlung der Korngrößenverteilung im Abgas verschiedener Emittenten (< PM_{2,5} und < PM₁₀). Projekt II: Anlagen der Chemieindustrie, Raffinerien, Automobilindustrie, Holzindustrie und Tierhaltungen“. Auftraggeber: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz. Az. 1/6-100-72/99

Van Reth, K. (2006): Resistenz des Vogelgrippe-Virus im Wasser. Wissenschaftliche Stellungnahme 23/03/2006; Virologie-Labor; Veterinärmedizinische Fakultät; Universität Gent; Mitglied des Wissenschaftlichen Ausschusses Influenza

VDI - Verein Deutscher Ingenieure (1992): Richtlinie VDI 2310 Blatt 19: Maximale Immissionskonzentrationen für Schwebstaub, VDI-Handbuch Reinhaltung der Luft, Band 1; Hrsg.: VDI, Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI und DIN – Normenausschuss, Beuth Verlag, Berlin

Virus Taxonomy Online (2007): <http://www.virustaxonomyonline.com>

Webster, R.G.; Yakhno, M.; Hinshaw, V.S.; Bean, W.J.; Murti, K.G. (1978): Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology, 84(2):268-278

WHO (2007): Review of latest available evidence on potential transmission of avian influenza (H5N1) through water and sewage and ways to reduce the risks to human health. Water, Sanitation and Health, Public Health and Environment; Geneva 2006 - Last updated 10/10/2007
http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/emerging/h5n1background.pdf

WHO (2008a):
http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2008_03_18/en/index.html

WHO (2008b):
http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_SubNat_H5N1inAnimalConfirmedCUMULATIVE_20080317.png

Yates, M.V.; Gerba, C.P.; Kelley, L.M. (1985): Virus persistence in groundwater. Applied and Environmental Microbiology, 49(4):778-781

