

# KLINIKUM DER PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG

Anstalt des öffentlichen Rechts, Sitz Marburg



## Institut für Virologie

**HD. Dr. Stephan Becker**

Institut für Virologie • Postfach 2360 • 35011 Marburg

Herr Dr. Völker  
BioClimatic GmbH  
Im Niedernfeld 4

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

Postanschrift: Postfach 2360, 35011 Marburg

**31542 Bad Nenndorf**

Telefon: 06421-28-63061

Telefax: 06421-28-65482

E-mail: [becker@staff.uni-marburg.de](mailto:becker@staff.uni-marburg.de)

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

Datum: 01. November 2004

## Gutachten

### Zur Beurteilung der inhibierenden Wirkung von UVC-Strahlen auf die Infektiosität von SARS-Coronavirus

erstellt von

**PD Dr. rer.nat. Stephan Becker**

**Klinikum der Philipps-Universität Marburg**

**Institut für Virologie**

**Robert-Koch-Str. 17**

**35037 Marburg**

#### 1. Untersuchungsgegenstand:

Untersucht wurde der Einfluss von UVC-Strahlen auf die Infektiosität des SARS-Coronavirus (SARS-CoV).

#### 2. Testmethode

Zur Untersuchung des inhibitorischen Effekts von UVC Strahlen wurde ein Test durchgeführt, der die Infektiosität des SARS-Coronavirus in Zellkultur untersucht (TCID<sub>50</sub>; Bonin 1973).

#### Geräte

*bioclimatic* UVC-Sonderstrahler (185 + 254 nm). Wie unter Experiment 1 zusätzlich mit Einrichtung zur Erzeugung von UV-Strahlen der Wellenlänge 185 nm und 254 nm.

#### 3. Experimentelle Ansätze

##### *Ionisation*

Eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen wurde mit 500 µl Virussuspension pro Vertiefung beschickt. Die Platte wurde unter der Sicherheitswerkbank für 2 h ionisierter Luft ausgesetzt (Abstand ca. 20 cm, höchste Leistungsstufe des Gerätes). Nach 0, 1 und 2 Stunden wurden von der Zellkulturplatte aus jeweils 2 Vertiefungen je 500 µl Probe entnommen und kühl gelagert. Zu

denselben Zeitwerten wurden Proben von einer Kontrollzellkulturplatte entnommen, die keiner ionisierten Luft ausgesetzt wurde (s. Experiment 1).

#### *Kombination Ionisation/UVC*

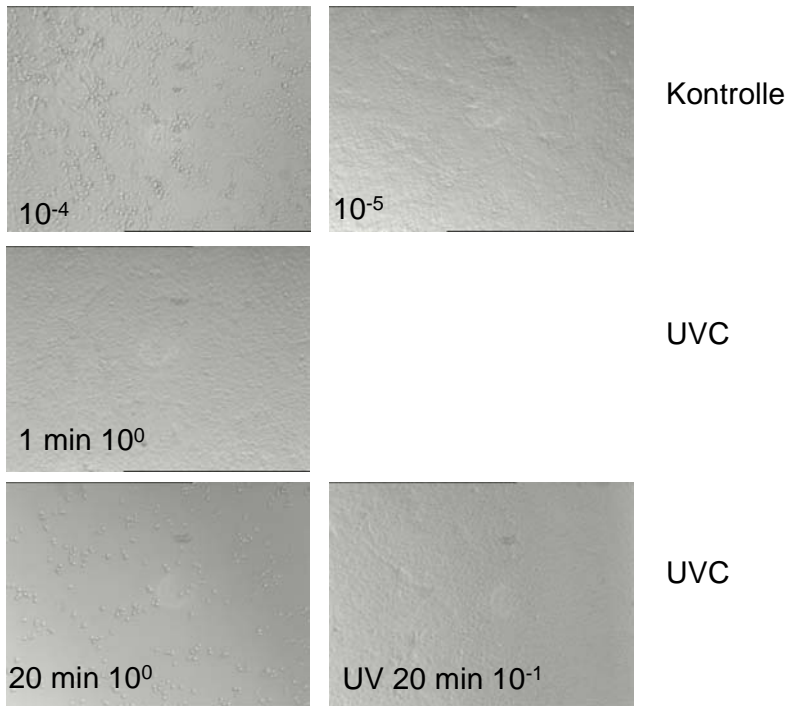
Danach wurde die mit ionisierter Luft behandelte Zellkulturplatte abgedeckt und aus der Sicherheitswerkbank entfernt. Die UVC-Strahler wurden eingeschaltet. Nach einer Minute wurde die Zellkulturplatte mit der Virussuspension erneut unter die Sicherheitswerkbank gestellt, der Deckel abgenommen und der UVC-Strahlung ausgesetzt (Abstand ca. 3 cm). Nun wurden nach 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, und 40 Minuten Proben entnommen. Während dieser Zeit wurde ebenfalls ionisierte Luft produziert. Aus der Kontrollzellkulturplatte, die keiner UVC-Strahlung und ionisierter Luft ausgesetzt war, wurde nach 40 Minuten eine Probe entnommen. Es wurden jeweils Doppelp Proben entnommen. Alle Proben wurden kühl gelagert.

55µl von allen Proben wurden anschließend in 96 well Zellkulturplatten überführt und in Vierfachbestimmung Verdünnungsreihen zur Basis 10 angelegt ( $10^0$  bis  $10^{-7}$ ) Diese Verdünnungen wurden mit abtrypsinierten Vero-Zellen versetzt und für 4 Tage im Zellkulturinkubator bei 37°C in Gegenwart von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Zustand der Zellen wurde täglich mit dem Mikroskop kontrolliert.

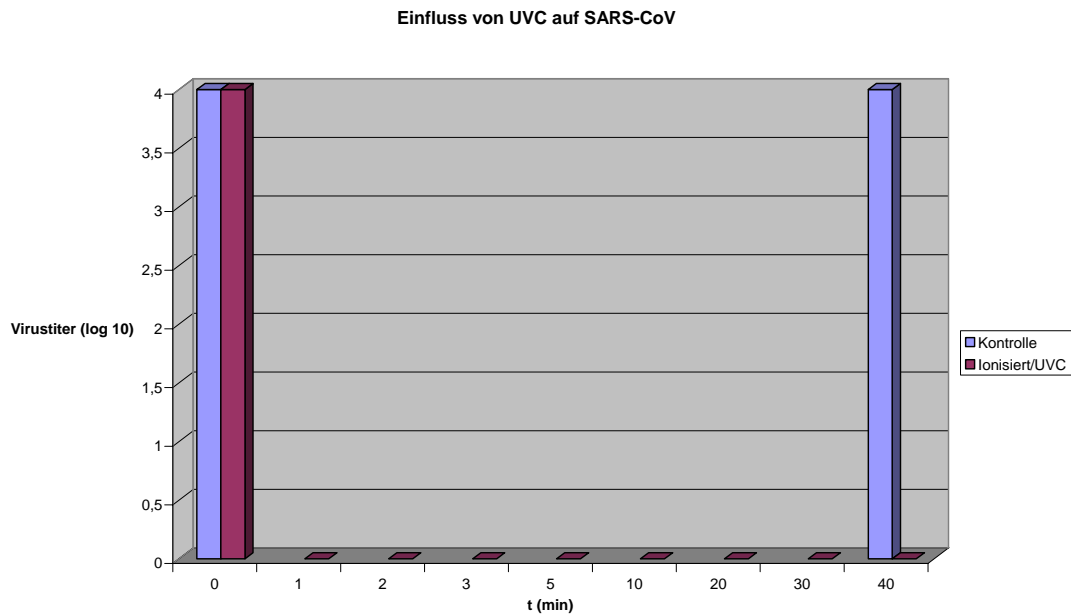
Das gesamte Experiment wurde in dem Hochsicherheitslabor des Instituts für Virologie, Marburg durchgeführt.

#### **Ergebnisse:**

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



**Abb. 1 Einfluss von UVC Strahlen auf die Infektiosität von SARS-CoV.** Eine Suspension von SARS-Cov wurde zunächst für 2 h mit ionisierter Luft behandelt und anschließend für 40 min UVC Strahlen ausgesetzt. Dargestellt sind Zellen, die mit Kontrollviren inkubiert wurden (Obere Reihe, keine Behandlung durch ionisierte Luft und UVC) und Zellen, die mit einer Virussuspension behandelt wurden, die nach 2h Behandlung mit ionisierter Luft für 1 min UVC-Strahlen ausgesetzt waren. Im Gegensatz zur Kontrolle, die erst bei einer Verdünnung von 10<sup>-5</sup> keinen cytopathischen Effekt mehr verursacht, ist die UVC-behandelte Probe auch in der höchsten Konzentration (10<sup>0</sup>) nicht mehr in der Lage, die Zellen zu infizieren. In den unteren Bildern (UVC, 20 min Verdünnung 10<sup>0</sup> und 10<sup>-1</sup>) ist der beobachtete toxische Effekt der UVC-Bestrahlung auf das Zellkulturmedium dargestellt. Nach 20 min Bestrahlung trat in Zellen, die mit der Virussuspension in höchster Konzentration behandelt wurden, ein toxischer Effekt auf, der zum Ablösen der Zellen und der kompletten Abrundung der verbliebenen Zellen führte. Bei einer Verdünnung von 10<sup>-1</sup> war dieser Effekt nicht mehr zu detektieren.



**Abb. 2 Einfluss von UVC Strahlen auf die Infektiosität von SARS-CoV.** Eine Suspension von SARS-Cov wurde zunächst für 2 h mit ionisierter Luft behandelt und anschließend ( $t = 0$ ) für 40 min UVC Strahlen ausgesetzt. Dargestellt sind die die Mittelwerte der erhaltenen Virustiter ( $n=8$ ) für die Zeit der UVC-Behandlung.

## Diskussion

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

## 4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Bestrahlung von SARS-CoV Suspensionen mit UVC reduzierte die Infektiosität innerhalb von einer Minute unter die Nachweisgrenze (Reduktion um mehr als 4 Log Stufen).

## 5. Literatur

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

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

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

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

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

Marburg, 01. November 2004