

□ Elbrachtsweg 76 · 33332 Gütersloh
Telefon: (0 52 41) 3 07 20-0
Telefax: (0 52 41) 3 07 20-79
e-mail: info@biotec-gmbh.com

□ Leipziger Straße 27
09648 Mittweida · Telefon/Fax: (0 37 27) 97 63 11
e-mail: biotec-GmbH@web.de

biotec Umwelt-Analytik-Beratung-Service GmbH · Elbrachtsweg 76 · 33332 Gütersloh



Umwelt - Analytik - Beratung -
Service GmbH

Herr Schönfeld
EFS Schermbeck
Landwehr 134
46514 Schermbeck

Gütersloh, 30.11.2021

Abschlussbericht zum Forschungsprojekt „Inaktivierungsanalyse luftgetragener Viren“

Sehr geehrter Herr Schönfeld,

im Folgenden erhalten Sie den Abschlussbericht zum durchgeführten Forschungsprojekt mit dem Luftentkeimungssystem „Eco Clean E 150“ der Firma EFS Schermbeck. Wir bedanken uns für den interessanten Auftrag. Bei Rückfragen stehen wir jederzeit gern zur Verfügung. Bitte beachten Sie, dass Ergebnisse und Äußerungen unter Benennung der Firma biotec GmbH bzw. einzelner Mitarbeiter in Veröffentlichungen / Prospekten nicht ohne Genehmigung durch die biotec GmbH publiziert werden dürfen.

Mit freundlichem Gruß

Dr. A. BERPPOHL
Geschäftsführer
biotec GmbH

M. Sc. N. BRAND
biotec GmbH

Forschungsprojekt EFS Schermbeck

Inhalt

Projektbeschreibung	3
Material und Methoden	5
Bestimmung der Reduktionsrate von Viren mit MS2 als Virussurrogat	5
Bestimmung der Temperatur und Luftfeuchte	8
Quantifizierung von Ozon	8
Ergebnisse	9
Reduktion von MS2 in der Luft bei Einmalpassage durch das Eco Clean System.....	9
Bestimmung der Ozonkonzentration.....	9
Bewertung	10
Anhang	11
A1: Zertifikat Gelatinefilter und Kalibrierprotokoll MD8	11
A2: Kalibrierprotokoll MD8	12

Projektbeschreibung

Der Luftentkeimer „Eco Clean E 150“ (Abbildung 1, im Folgenden als Eco Clean bezeichnet) hat die Form eines Quaders mit den Maßen 42 x 63 x 67 cm (Herstellerangabe). Der maximale Luftdurchsatz des Systems wird mit 150 m³/h vom Hersteller angegeben. Im System ist ein Elektrofilter verbaut. Das System kann auf zwei Lüfterstufen betrieben werden.



Abbildung 1: Eco Clean.

In dem Forschungsprojekt ist die Reduktion des RNA-Virus MS2 bei Einmalpassage durch das System untersucht worden. Der oben benannte Virus wird als Coronavirus-Surrogat verwendet. MS2 (Familie: *Leviviridae*) ist ein Bakteriophage, der auf *Escherichia coli* plattiert. Es ist ein ssRNA-Virus mit einem 4 kB Genom. Die Phagen messen ca. 26 nm im Durchmesser. SARS-CoV-2 ist der Erreger der aktuellen Coronavirus-Pandemie, der COVID-19 auslöst. Das Coronavirus ist ein umhüllter RNA-Virus mit einem ssRNA Genom.

Bezüglich der Inaktivierung der Viren in der Luft durch UV-C liegen folgende D90-Werte (Dosis, welche für 90%ige Inaktivierung benötigt wird) aus der Literatur vor¹:

Coronavirus	3 J/m ²
MS2	3 – 61 J/m ²

Die Datenlage für das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 ist gering und die Inaktivierungsrate auch immer abhängig von weiteren Faktoren wie z. B. der Luftfeuchtigkeit und Temperatur,

¹ W. Kowalski, 2009. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Ultraviolet Germicidal Irradiation Handbook.

allerdings kann davon ausgegangen werden, dass die Tenazität gegenüber UV-C des Erregers vergleichbar ist mit dem verwendeten Surrogat MS2.

Zusätzlich zu dem viralen Verneblungsexperiment wurde eine Ozon Entwicklung nach einer Stunde Betrieb des Gerätes gemessen.

Material und Methoden

Bestimmung der Reduktionsrate von Viren mit MS2 als Virussurrogat

Zu Beginn ist ein hochtitriges Lysat des Bakteriophagen MS2 DSM 13767 hergestellt worden. Hierzu wurden Verdünnungsreihen des Virenlysates mittels Agar-Assay mit dem Zielbakterium *Escherichia coli* DSM 5210 plattiert (PC-Agar).

Die so gewonnenen Weichagar-Platten sind bis zu 48 h bei 25 °C bebrütet worden. Anhand der Verdünnungsstufe und der Anzahl der vorhandenen Plaques erfolgte die Titerbestimmung. Die Verdünnungsstufe mit konfluenter Lyse wurde eingesetzt, um ein hochtitriges Lysat herzustellen. Hierzu sind 10 Platten mit konfluenter Lyse mit SM (Saline-Magnesium) -Puffer überschichtet worden (4 ml SM-Puffer, min. 4 h, 5 – 8 °C). Das so hergestellte Lysat ist für die Verneblung verwendet worden (Abb. 2).

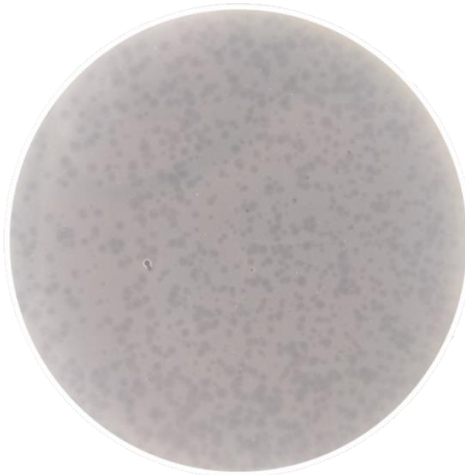


Abbildung 2: *Escherichia coli* -Rasen mit Plaques, die durch die Infektion mit MS2 hervorgerufen wurden.

Zur kontrollierten Vernebelung der Viren wurde das Eco Clean System in einem Kunststoffzelt (11,5 m³) installiert. Das quantifizierte Lysat ist über einen Vernebelungskopf (Pari Boy TurboS, Pari GmbH, Starnberg) in das System eingebracht worden. Die absolute Menge vernebelter Viren ist über eine Differenzwägung und anschließende Berechnung mittels Titer des Lysats bestimmt worden.

Die Größe der erzeugten Partikel pro Volumeneinheit, die durch die Vernebelung entstehen, ist über einen Laserpartikelmonitor (Met One A2408-1-115-1 Laser Particle Counter, Met One Instruments, Inc., Oregon, USA) über eine 1:1000 Verdünnungsstrecke qualifiziert und die Anzahl quantifiziert worden (Abbildung 3).

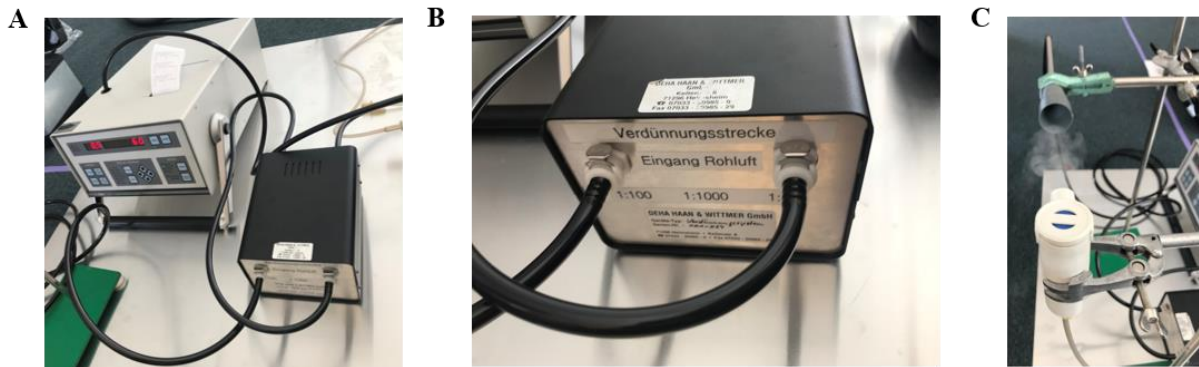


Abbildung 3: A Laserpartikelzähler mit angeschlossener Verdünnungsstrecke. B Verdünnungsstrecke für die Partikel in der Raumluft. C Vernebelung mittels Pari Boy TurboS gegenüber des Probenahmekopfes für die Partikelzählung (Abstand 20 cm).

Die Partikelzählung ergab die in Abbildung 4 dargestellten Partikelgrößen pro Kubikmeter Luft. Gemittelt aus 6 Einzelmessungen ergeben sich folgende Differentialwerte:

Partikel < 0,5 µm: $4,5 \times 10^7$ Partikel / m³

Partikel < 5,0 µm: $1,1 \times 10^5$ Partikel / m³

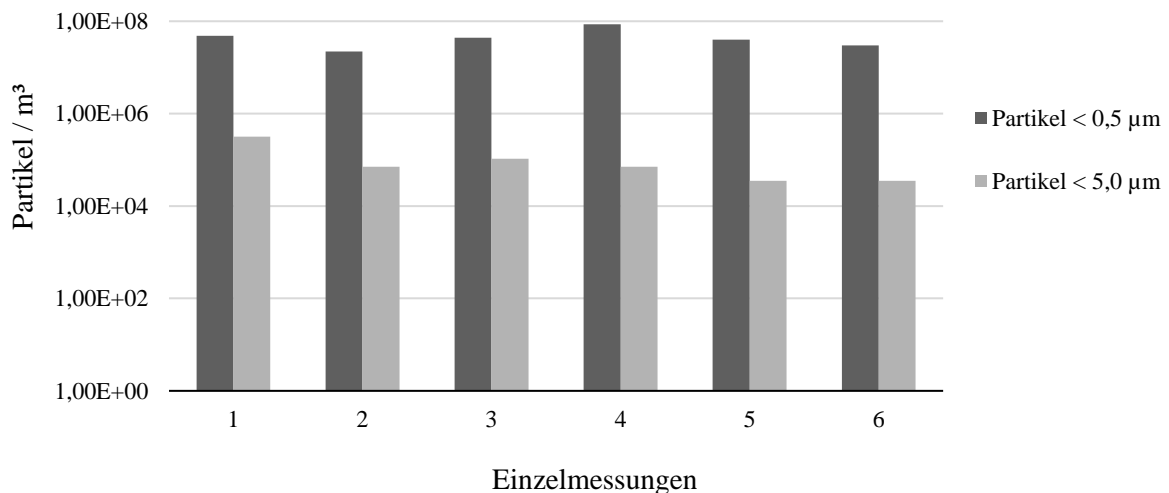


Abbildung 4: Einzelmessungen (mit je 3 Messzyklen bei der Bestimmung) der Partikel < 0,5 µm (dunkelgrau) und < 5 µm (hellgrau) in Partikel/m³. Angegeben ist der Differentialwert.

Die Luftprobenahme erfolgte über eine Membranfiltration (Gelatinefilter Porenweite 3 µm, Anhang A1) mit dem Luftkeimsammler MD8 (Abbildung 5, beides Sartorius AG, Göttingen) mit 6 m³/h für 10 min (1 m³ Probenahmenvolumen, Kalibrierprotokoll in Anhang A1). Der

Gelatinefilter ist in SM-Puffer gelöst worden. Die Anzahl der gesammelten Viren ist durch eine Verdünnungsreihe und anschließendes Agar-Assay ermittelt worden.

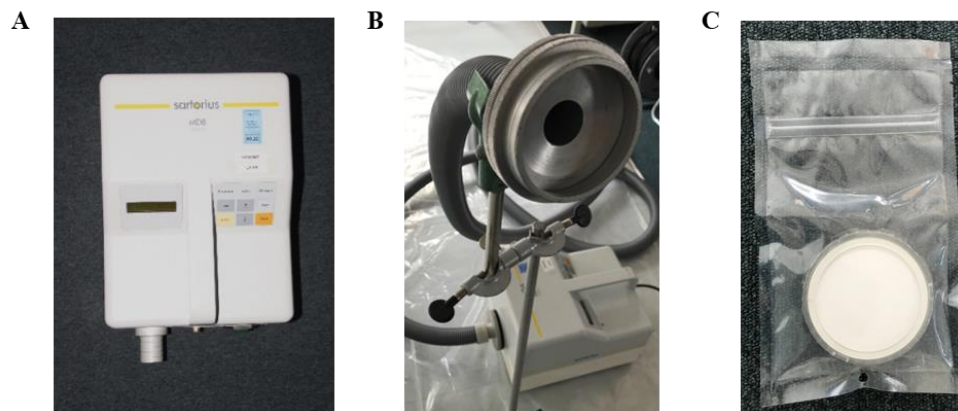


Abbildung 5: A Luftkeimsammler MD8, Sartorius GmbH. Prüfsiegel in blau dokumentiert die aktuelle Kalibrierung des Systems (gültig bis 03/22, siehe Anhang A1). B Probenahmekopf zur Luftansaugung durch die Gelatinemembran des Filters. C Gelatinefilter, steril verpackt zur Anbringung auf dem Probenahmekopf.

Zur Erfassung der Wirkung der Luftentkeimung durch das Eco Clean System, ist zunächst ermittelt worden, wie viele Bakteriophagen nach Passage durch das System mit UV-C Strahlung im austretenden Luftstrom erfasst werden können. Nach Ausschalten der UV-C Strahlung (N_0) ist der Versuch wiederholt worden. Durch den Vergleich der beiden Werte konnte die Inaktivierungsrate berechnet werden. Die Virussuspension wurde direkt an der Luftansaugung vernebelt. Am Luftauslass sind die Viren über eine Membranfiltration der Luft gesammelt worden. Der gesamte Versuchsaufbau für das Eco Clean System ist in Abbildung 6 skizziert.

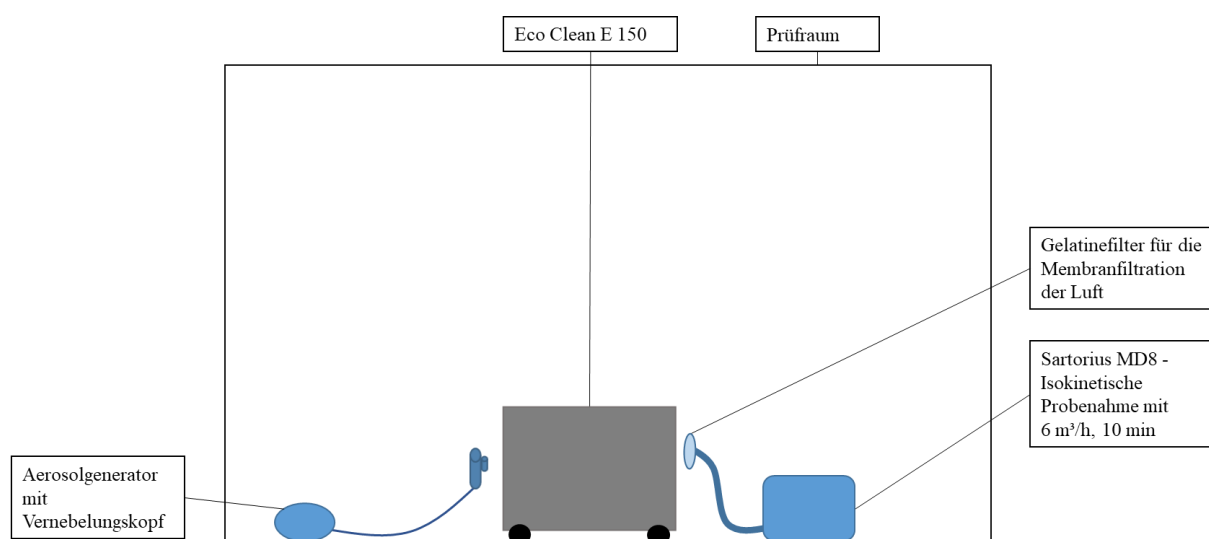


Abbildung 6: Schematische Zeichnung des Versuchsaufbaus zur Analyse aktiver Viren nach Passage durch das Eco Clean System.

Zur Untersuchung der viralen Reduktion bei Einmalpassage durch das System Eco Clean, wurden die Viren am Lufteinlass aus einem Vernebelungskopf als Aerosol in den Luftstrom eingebracht (Abbildung 7 A). Am Luftauslass wurde die Luft über eine isokinetische Membranfiltration gesammelt (Abbildung 7 B). Dieser Filter wurde daraufhin aufgearbeitet.

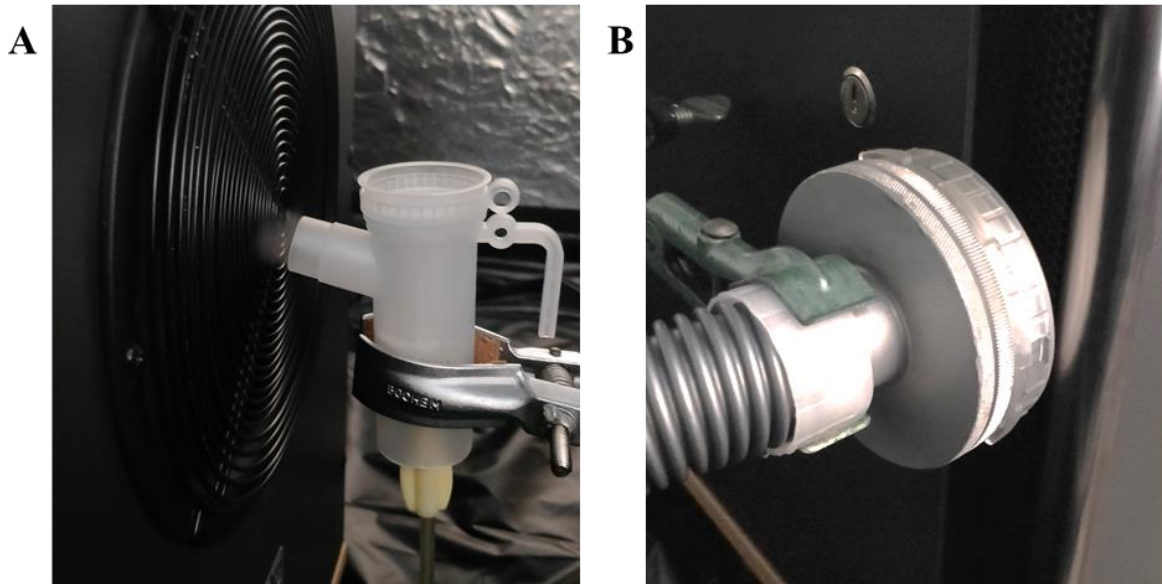


Abbildung 7: A Vernebelung vor der Luftansaugung. B Probenahme am Luftauslass über eine Membranfiltration (Gelatinefilter).

Bestimmung der Temperatur und Luftfeuchte

Die Messung von Temperatur und Luftfeuchte erfolgte nach 10-minütiger Adaptation eines Messfühlers an das Raumklima im Messzelt (testo 605 H1, Testo SE & Co. KGaA).

Quantifizierung von Ozon

Die Ozonmessung wurde mit einer Dräger-Pumpe (Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland) nach 60-minütiger Laufzeit des Systems am Luftauslass durchgeführt. Dabei können Ozonkonzentration mit den verwendeten Prüfröhrchen im Bereich von 0,05 bis 0,7 ppm detektiert werden. Die Dräger-Röhrchen sind mit einer blauen Matrix gefüllt. Bei der Messung wird die Luft durch das Röhrchen gezogen. Das Ozon führt zu einer Farbänderung der Matrix (weiß). Die Pumpe mit Prüfröhrchen für die Ozonmessung ist in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Dräger-Pumpe mit Prüfröhrchen zur Ozonmessung.

Ergebnisse

Reduktion von MS2 in der Luft bei Einmalpassage durch das Eco Clean System

Es wurde ein MS2 Lysat mit $> 10^{11}$ PFU/ml für die Verneblungsexperimente verwendet. In Tabelle 1 sind die ermittelten Daten zusammengefasst.

Tabelle 1: Gemessene Virenkonzentration bei Einmalpassage durch das Luftentkeimungssystem in der Zuluft (PFU/m³) mit Angabe der log-Stufen Reduktion aktiver Viren und zugehöriger Inaktivierungsrate, sowie der Temperatur und der relativen Luftfeuchte. Elektrofilter aus: - (N₀); Elektrofilter an: +.

Elektrofilter	Temperatur [°C]	Relative Luftfeuchte [%]	Virenkonzentration [PFU/m ³]	Log- Stufen Reduktion	Inaktivierungsrate
-	20,3	52,0	$2,90 \times 10^8$	2,30	99,50 %
+	19,9	51,6	$1,46 \times 10^6$		

Bestimmung der Ozonkonzentration

Die Ozonmessung erfolgte mit Dräger-Röhrchen, die einen Ozongehalt in dem Bereich zwischen 0,05 – 0,7 ppm messen. Gemessen wurde am Luftauslass des Systems. Es konnte mit dem abgebildeten Messröhrchen im Luftauslass des Systems kein Ozon detektiert werden (keine visuell erkennbar Farbveränderung von blau nach weiß des Prüf-Röhrchens; siehe Abbildung 9).

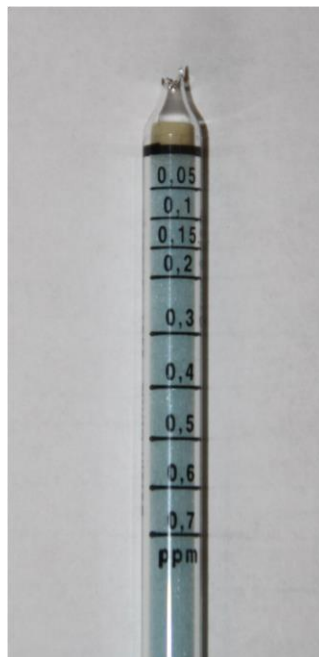


Abbildung 9: Dräger-Röhrchen nach Messung des Ozongehalts des Eco Clean System.

Bewertung

Das System „Eco Clean E 150“ der Firma EFS Schermbeck ist ein Luftentkeimungsgerät, das über einen Elektrofilter die Luft entkeimt.


Die Reduktion von Virusmaterial im Luftstrom ist unter Verwendung des Surrogat-Virus MS2 untersucht worden. Das Eco Clean System konnte unter den gegebenen Bedingungen bei Einmalpassage die Virenlast um 2,3 log-Stufen reduzieren.

Nach einer Stunde Laufzeit konnte im Auslassbereich des Gerätes mit dem verwendeten Prüf-Röhrchen (Dräger) kein Ozon detektiert werden.




Anhang

A1: Zertifikat Gelatinefilter und Kalibrierprotokoll MD8

Quality Assurance Certificate



Gelatine Disposables

Bestell-Nr.:	17528--80----ACD	
Order-no.:		
Stückzahl:	10	
No. of units:		
Abscheiderate nom.:	3 µm	
Retention rate nom.:		
Sterilisationsdatum:	01.20	
Date of sterilization:		
Verfalldatum:	01.25	
Expiration date:		
Chargen-Nr.:	17528 190195	
Lot no.:		

1000016502

Sartorius Stedim Biotech GmbH | 37070 Goettingen | Made in Germany

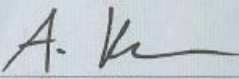
This certifies that the designated product was manufactured by Sartorius Stedim Biotech in accordance with the applicable current Good Manufacturing Practice standards.

This product has been subjected to and has fulfilled Sartorius Stedim Biotech' rigorous quality control standards from the raw material to the final product.


Each manufacturing lot was sampled, tested and released by Quality Assurance with respect to the following characteristics:

- Sterility
- Performance-Test (Thickness, Air-Flow, Solubility)
- Inhibition-Test
- Growth Test

Details of the methodologies used in each test can be obtained from Sartorius Stedim Biotech GmbH.



Dr. Anna Vreemann,
Site Quality Manager



Manufactured by
Sartorius Stedim Biotech GmbH
August-Spindler-Strasse 11
37079 Goettingen, Germany
www.sartorius-stedim.com

S-11003-e191102-06037-530-51-Ver. 11 | 2019

A2: Kalibrierprotokoll MD8

SARTORIUS

Prüfprotokoll MD8® | Test Report MD8®

Modell MD8® airscan (16746) Fabr. Nr. 12201007 Software version 2,7 Inventar / PM Nr. -/-
Model: Serial no.: version Inventar / PM no.:

Es wurden folgende Gerätefunktionen überprüft Flow-Rate Messzeit
The following functions have been checked Flow-rate Time measurement

Überprüfung der Flow-Rate: Zwischen dem Gelatinefilter und Lufterlass des MD8 wird die Kalibriereinheit Durchfluss geschaltet. Je nach der am MD8 vorgewählten Luftdurchsatzmenge wird über einen festen Zeitraum die durchströmende Luftmenge gemessen. Das Messergebnis wird in m³/h ausgegeben. Während des Tests wird die Umgebungstemperatur konstant gehalten. Der Test wird bei Atmosphärendruck durchgeführt. Die Testzeit der einzelnen Tests beträgt 3 Minuten
Beschreibung des Testablaufes

Flow rate check: A calibration unit, for airflow, is installed between the gelatin membrane filter and the air inlet of the MD8. The air volume sampled at an air flow rate preselected on the MD8 is measured over a specific period of time. The result is given in m³/h. A constant temperature is maintained during the test, which is carried out under atmospheric pressure. The time for each test is 3 minutes.
Description of the test run

Messmittel: Kalibriereinheit Type: RVG-ST G16,DN25 Serial no.: 750B7961
Measuring Equipment Calibration unit Prüfmittel Nr. | Testing equipment no.: 19566/10.2020
gültig bis | valid until: 10.2021
Filterhalter zur Aufnahme des Gelatinefilter | Filter holder for again the gelatin filter
Gelatinefilter vom Typ | Gelatin membrane filter type: 12602-080 ALK
Digital-Stoppuhr Type: C-563 No.: CHR / 0229 SI
Digital Stop watch Prüfmittel Nr. | Testing equipment no.: P-5572838
gültig bis | valid until: 02.2022

Messprotokoll | Test record

Es wurden folgende Messzeiten überprüft (Strömungsbereich 2,5 m³/h)
The following air-sampling times were checked (flow 2,5 m³/h)

MD8 m ³ /h	Kalibriereinheit Calibration unit m ³ /h	Abweichung Deviation m ³ /h
8,00	7,95	-0,05
6,00	5,97	-0,03
5,00	5,04	0,04
4,00	4,01	0,01
2,50	2,51	0,01

MD8 Zeit (Min:Sek) Time (min:sec)	Zeit (Stoppuhr) (Min:Sek) Time (Stop watch) (min:sec)	Abweichung (Sek.) Deviation (sec.)
2:00	2:00	0 ✓
3:00	3:01	1 ✓
5:00	5:02	2 ✓

Testergebnisse // Test results

Die maximal gemessenen Luftdurchsatzmengen haben eine Abweichung von 0,6 % vom Maximalwert (8 m³/h).
The maximally measured air volume quantities have a deviation from 0,6 % from the maximum value (8 m³/h).
Die maximal zulässige Abweichung beträgt $\leq \pm 5$ %. | The maximum allowable deviation is $\leq \pm 5$ %.

Die maximal gemessene Messzeit hat eine Abweichung von 2 Sekunde(n).
The maximally measured gate time has a deviation from 2 second(s).
Die maximal zulässige Abweichung ist $\leq \pm 3$ Sekunden, bezogen auf jede einzelne Zeitmessung.
The maximum allowable deviation is $\leq \pm 3$ seconds, related to each individual time measurement.

Die Messergebnisse liegen innerhalb der Toleranzen Ja | Yes Nein | No
The results are within the specified tolerances

Bitte beachten Sie, dass wir eine Kalibrierung einmal im Jahr empfehlen. | Please note that we recommend a recalibration once a year.
Dieses Prüfprotokoll darf nur vollständig und unverändert weiterverbreitet werden. Prüfprotokolle ohne Unterschrift haben keine Gültigkeit.
This test report may only be distributed only completely and unchanged. Test reports without signature are not valid.

Nächste Kalibrierung März 2022 next calibration: March 2022	Firma Company: Kd-Nr. Co-No.: 10055863 biotec Umwelt-Analytik- Beratung-Service GmbH	Frank Enders Repair Center Central Europe Groner Siekanger 1 37081 Göttingen Tel.: 0551.308.3174 Fax:-3737 E-Mail: repaircenter-ce@sartorius.com
Datum 04. März 2021 Date: 04 March 2021	Elbrachtsweg 76	
Prüfer Tested by: F. Enders	33332 Göttersloh	
Unterschrift Signature: 		