UNIVERSITÄT LEIPZIG

Veterinärmedizinische Fakultät

Zentrum für Veterinary Public Health

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
An den Tierkliniken 1 D-04103 Leipzig

Institut für
Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Direktor: Professor Dr. Uwe Truyen

Telefon:+49 341 97 38150
Fax: +49 341 97 38198
Email: truyen@vetmed.uni-leipzig.de

Abschlußbericht

Untersuchungen zur Ermittlung des Abscheidegrades von equinem Arteritis-Virus (als Surrogat für PRRS-Viren) in einem Filterprüfstand

1. Allgemeine Angaben

Abschlussbericht über das Projekts zum XX. Dezember 2012.

1.1 Berichtersteller

Timo Homeier-Bachmann, Dr. med. vet.
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig
An den Tierkliniken 1, 04103 Leipzig
Tel.: 0341-9738153
Fax.: 0341-9738198
E-Mail: homeier@vetmed.uni-leipzig.de

1.2 Thema

Untersuchungen zur Ermittlung des Abscheidegrades von equinem Arteritis-Virus (als Surrogat für PRRS-Viren) in einem Filterprüfstand

1.3 Ort der Versuchsdurchführung

Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

2. Einleitung

In den USA trat erstmals Ende der 1980iger Jahre eine Erkrankung in Schweinebeständen auf, die sich durch deutliche reproduktive Störungen, ausgeprägte Pneumonien bei Absatzferkeln und Wachstumsdepression sowie erhöhten Mortalitätsraten in allen Altersgruppen auszeichnete. Zu Beginn der 1990iger Jahre trat diese Erkrankung auch in Europa auf.
1991 wurde als ätiologisches Agens ein behülltes RNA-Virus identifiziert und entsprechend der Hauptsymptomatik „porcines reproduktives und respiratorisches Syndrom (PRRS)-Virus“ genannt. Das PRRS-Virus ist nahezu weltweit in Schweinebeständen verbreitet. Weiterhin zeichnet sich das Virus durch eine ausgeprägte genetische Instabilität aus, die einerseits zur Entstehung von Genotypen mit unterschiedlichen Virulenz- und Pathogenitätseigenschaften geführt hat und andererseits die Effektivität von Impfstoffen nachteilig beeinflusst.
Neben diesem Variantenreichtum von PRRS-Viren bereitet v. a. die unzureichende Immunantwort des Schweins auf den Erreger Probleme. Entsprechend kommt es in Folge einer PRRSV-Infektion häufig zu verlängerten virämischen Phasen und persistierenden Infektionen, die zu einem hohen Infektionsdruck in betroffenen Beständen führen. Eine Untersuchung ergab, dass allein in den USA jährlich ein volkswirtschaftlicher Schaden von über einer halben Milliarde Dollar durch PRRSV-Infektion entsteht.
Die Übertragung von PRRS-Viren in naive Bestände kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Der Zukauf von infizierten Schweinen wird als der wichtigste Übertragungsmodus angenommen. Daneben kommen Übertragungen durch infizierte bzw. kontaminierte Personen, Tiere, Sperma und Gegenstände sowie Übertragungen über die Luft (aerogen) vor. In Bezug auf die erstgenannten Übertragungswege wird ein Erregereintrag in einen Bestand durch die vielfältigen Maßnahmen, die sich unter dem Begriff „Biosecurity“ subsummieren lassen (Quarantäne-Maßnahmen, Zukauf nur aus PRRSV-freien Beständen, Schutzkleidung und Zwangsduschen für die Mitarbeiter, Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen etc.) deutlich reduziert. Demgegeüber konnte eine dänische Studie die aerogene Übertragung von PRRS-Viren als einen häufigen Eintragsmodus identifizieren. Folglich ist die Einbeziehung der Zuluft in Biosecurity-Maßnahmen dringend geboten.
Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Wirksamkeit von verschiedenen Filtersystemen (Neuentwicklungen und kommerziell verfügbaren) gegenüber Viren in der Zuluft vergleichend zu untersuchen. Als Surrogat für PRRS-Viren wurde das Equine Arteritisvirus (EAV) für die Untersuchungen verwendet. Beide Viren gehören der gleichen Virengattung an (*Arterivius*) und weisen weitgehend übereinstimmende Eigenschaften auf. EAV hat jedoch gegenüber PRRSV den entscheidenden Vorteil einer deutlich besseren Kultivierbarkeit. Der verwendete Prüfstand bestand aus einer Rohgasseite, die eine bekannte Konzentration an Viruspartikeln pro Volumen Luft enthielt. Dieses Rohgas wurde durch den zu prüfenden Filter geleitet, anschließend erfolgte auf der Reingasseite eine Bestimmung der Konzentration an Viruspartikeln. Aus den Viruskonzentrationen auf der Roh- und Reingasseite wurde eine Abscheiderate berechnet, die einen Vergleich der einzelnen Filtersysteme ermöglichte.

3. Material und Methoden

3.1 Prüfviren

PRRSV und PRRSV-Surrogat EAV

PRRS-Viren zeigen in der Zellkultur nur ein schwaches Wachstum, die für die Versuche mit hohem Volumenstrom (1.800 m^3/h) erforderlichen Viruskonzentrationen waren folglich nicht zu erreichen. Das Equine Arteritis-Virus (EAV), das wie PRRS-Viren zur Gattung Arterivirus gehört, kann in geeigneten Zellen leicht zu ausreichenden Titern vermehrt werden. Weiterhin zeichnet sich EAV durch eine weitestgehende Übereinstimmung der Charakteristika (Aufbau, Tenazität etc.) mit PRRS-Viren aus und wurde daher in der vorliegenden Untersuchung als Surrogat für PRRSV verwendet.
In der vorliegenden Untersuchung wurde der EAV-Stamm Bucyrus verwendet.
Zusätzlich wurde für Versuche mit niedrigen Volumenstrom (80 m^3/h) ein PRRS-Virus (Stamm VR-2332) verwendet.

Virus-Vermehrung

Die EA-Viren wurden auf Vero-Zellen vermehrt, einer etablierte Zelllinie, die aus Nierenzellen von Grünen Meerkatzen gewonnen wurde. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen in Zellkulturmedium (DMEM mit 5% FKS) vermehrt bis ein konfluenter Monolayer entstanden war. Im Anschluss an die Inokulation des Virus zeigten sich nach etwa 2-3 Tagen Veränderungen in Form von Löchern im Zellrasen (cytopathischer Effekt). Diese Veränderungen werden durch die mit der Zerstörung der Wirtszellen einhergehenden Vermehrung des Virus verursacht. Bei der Lyse der Wirtszellen gelangen die enthaltenen Viruspartikel in das Medium. Der Virus-haltige Zellkultur-Überstand wurde gesammelt und eingefroren.
Die Vermehrung von PRRSV erfolgte analog in einer murinen Makrophagen-Zelllinie (MA104). Der aus der Virus-Replikation resultierende cytopathische Effekt war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt.

Bestimmung der Viruskonzentration

Die Viruskonzentration (EAV) im Überstand wird durch eine Titration ermittelt. Dazu wird eine dekadische Verdünnungsreihe des Überstandes hergestellt und im Anschluss eine mit Zellen bewachsene Mikroptiterplatte mit den einzelnen Verdünnungsstufen inokuliert. Die Titration erfolgt im 8-fach Ansatz. Nach 4 Tagen wird die Anzahl der Vertiefungen mit cytopathischem Effekt je Verdünnungsstufe bestimmt und daraus mittels der Formel vom Spearman und Kärber die Konzentration der Viren im Überstand berechnet.
Für PRRSV war aufgrund des geringgradig ausgeprägten cytopathischen Effekts eine Bestimmung des Virustiters nicht möglich.

3.2 Filter

Mineralwolle-Filter

Die in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Mineralwolle-Filter wurden von der Firma Reventa zur Verfügung gestellt. Die aus zwei ca. 5 cm starken Lagen bestehenden Filter wurden in einen Holzrahmen eingepasst, mit einer Gaze überdeckt und mittels eines groben Gitternetzes im Rahmen fixiert. Dieser zusammengesetzte Filter wurde anschließend in den Prüfstand eingebaut.

Airguard-Filter

Die verwendeten Airguard-Filter [redacted] wurden ebenfalls von der Firma Reventa zur Verfügung gestellt. In der vorliegenden Untersuchung wurden zwei Airguard-Modell verwendet:

i) [redacted] Effizienzklasse MERV 16) in Verbindung mit einem Vorfilter [redacted] Effizienzklasse MERV 8),

ii) [redacted] Effizienzklasse MERV 15) in Verbindung mit einem Vorfilter [redacted] Effizienzklasse MERV 8).

Die Filter wurden aus der Originalverpackung entnommen und in den Prüfstand eingesetzt.

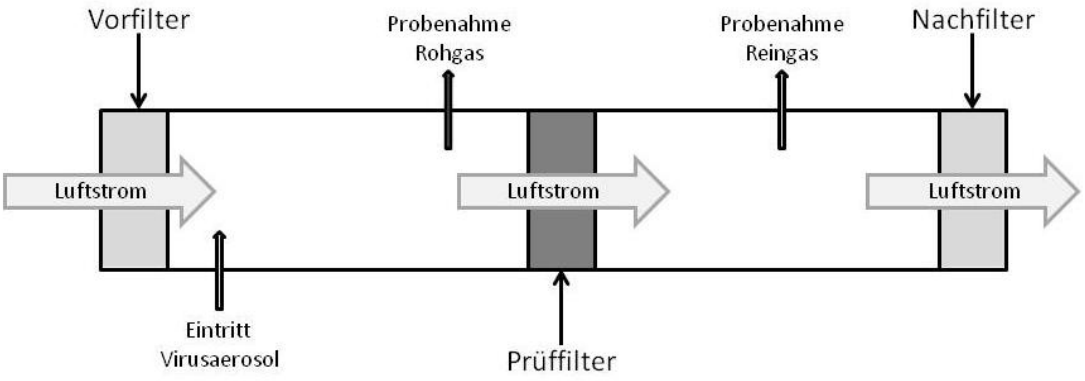
EVAP-Einheit

Die Evaporationskühleinheit wurde eigens für die Versuche im Rahmen dieser Studie von der Firma Revanta aufgebaut. Die Einheit besteht aus einem Wasservorratsbehälter (Fassungsvermögen ca. 150l), der über eine Wasserpumpe mit der eigentlichen EVAP-Einheit verbunden ist. Das Wasser wird mit einem Druck von 1 bar in die EVAP-Einheit gepumpt und im oberen Bereich der Einheit über 4 Düsen vernebelt. Der Corpus der EVAP-Einheit ist aus einem Kunststoffgittergeflecht aufgebaut, das die Strömungsgeschwindigkeit der Luft stark reduziert und somit einen intensiven Kontakt von Luft und Nebel ermöglicht. Der überwiegende Teil des vernebelten Wassers sammelt sich im Boden der EVAP-Einheit und wird wieder in den Vorratsbehälter zurückgeleitet. Für einige Versuche wurde der pH-Wert des zirkulierenden Wassers durch die Zugabe von Essigsäure auf pH<5 abgesenkt.

3.3 Prüfstand

Prinzipieller Aufbau

In den Prüfstand, in dem ein konstanter Volumenstrom etabliert ist, wird ein Virus-haltiges Aerosol mittels Überdruck eingeleitet. Das so entstandene Virus-haltige Rohgas passiert einen Prüffilter, in dem die zuvor eingeleiteten Viren teilweise wieder abgeschieden werden. Roh- und Reingas-seitig werden parallel Proben entnommen und auf den Virengehalt untersucht.



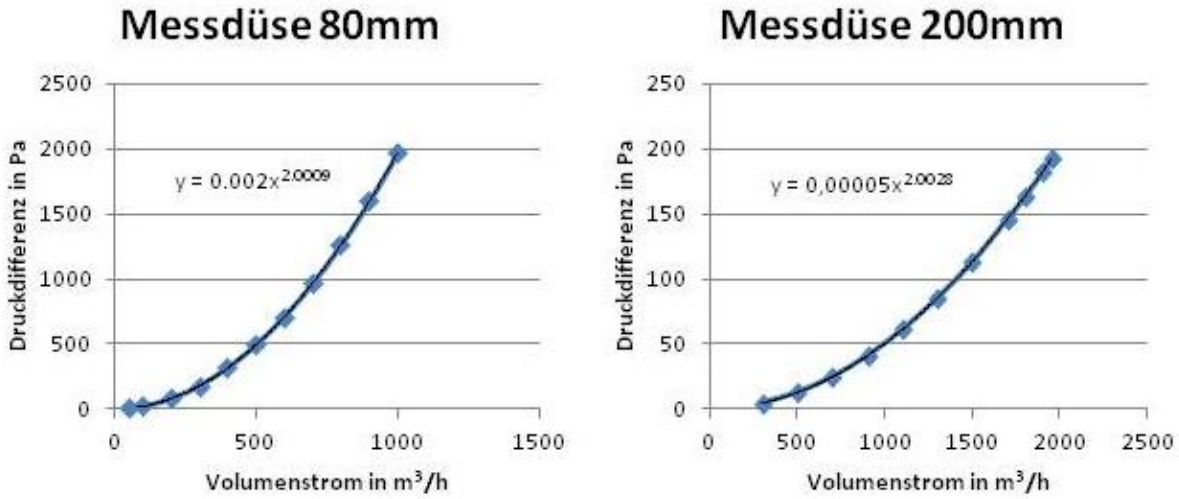
Der Prüfstand wurde durch die Firma Reventa entworfen und im Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen aufgebaut. Der Prüfstand besteht aus zwei Standardelementen in den Abmessungen (LxBxH) 150 x 59 x 59 cm. Zwischen den beiden Elementen werden mittels eines Adapterstückes die zu prüfenden Filter eingesetzt, durch die der Prüfstand in eine Rohgasseite (einlassseitig) sowie eine Reingasseite (auslassseitig) geteilt wird. Ebenfalls

mittels Adapterstücken sind ein- und auslassseitig HEPA-Filter zur Reinigung der Zu- und Abluft angebracht. Zur Messung und Einstellung des Volumenstroms ist einlassseitig eine Düse montiert. Auslassseitig befindet sich hinter dem Nachfilter ein Radialventilator zur Erzeugung des Luftstroms. Je nach Filter sind unterschiedliche Volumenströme, entsprechende des Einsatzbereiches, zu realisieren. Der Mineralwollefilter ist für einen vollflächigen Einbau im Deckenbereich von unterdruckbelüfteten Betriebseinheiten vorgesehen, die im Rahmen der Prüfung zu realisierende Filterflächenbelastung liegt daher bei lediglich 230 m^3/m^2h. Die Airguard-Filter und die EVAP-Einheit werden im Zuluftbereich einer Belüftungsanlage eingesetzt, folglich ist mit 1.800 m^3/h ein deutlich höherer Volumenstrom im Rahmen der Prüfung zu realisieren.
Auf der Reingasseite unmittelbar hinter dem Vorfilter ist der Einlassstutzen für das Virus-haltige Aerosol angebracht.
Die Stutzen zur Entnahme der Luftproben sind rohgasseitig kurz vor dem Prüffilter und reingasseitig in der Mitte der Kammer angebracht.
Das Aerosol wurde mit einem Aerosolgenerator (ATM230, Topas GmbH) erzeugt. Mittels zugeleiteter Druckluft erzeugt das Gerät ein Aerosol, dessen durchschnittliche Partikelgröße durch eine Prallplatte auf 0,1 – 0,5 µm eingestellt wird. Der Volumendurchsatz wurde in Abhängigkeit der zu prüfenden Filter über den Vordruck eingestellt (3,5 – 6,0 bar ≡ 10-20ml/10 min). Zur Erzeugung der Druckluft wurde einem „oil free air“-Kompressor (Atlas Copco SF2) verwendet.

3.4 Durchführung der Prüfung

Vorbereitung des Prüfstandes

Zunächst wurden die zu prüfenden Filter zwischen Roh- und Reingasseite in den Adapter eingebaut und der Ventilator gestartet. Mit Hilfe eines Druckmessers, der an der einlassseitigen Düse den Luftström-abhängigen Unterdruck misst, wird über die Drehzahl des Ventilators der Volumenstrom entsprechend des zu prüfenden Filters eingestellt. Zur Erzeugung der unterschiedlichen Volumenströme sind verschiedene Düsendurchmesser erforderlich. Der Zusammenhang zwischen dem Unterdruck an der Einlassdüse und dem Volumenstrom ist in Abhängigkeit des Düsendurchmessers in folgender Abbildung dargestellt.



Entsprechend wurde ein Volumenstrom von 80 m^3/h für den Mineralwollefilter mit der 80 mm Düse bzw. von 1.800 m^3/h für den Airguard-Filter mit der 200 mm Düse im Prüfstand eingestellt.

Äquilibrieren der Kammer

Vor der eigentlichen Messung wurde der Prüfstand durch die Einleitung eines Aerosols bestehend aus Virus-freiem Zellkulturmedium für 10 Minuten äquilibriert.

Generation des Virusaerosols

Nach der Äquilibrierung des Prüfstandes wurde der Virus-haltige Zellkulturüberstand in den Aerosolgenerator gefüllt. Der Vordruck am Aerosolgenerator würde entsprechend des zu prüfenden Filters eingestellt (Mineralwollefilter 3,5 bar; Airguard-Filter 6 bar). Entsprechend der Vordrücke wurden 10 bzw. 20 ml Virus-haltiger Zellkulturüberstand pro 10 Minuten vernebelt.

Entnahme der Proben

Die Probennahme erfolgte jeweils parallel roh- und reingasseitig. Mittels zweier Pumpen wurden bei einer Förderleisung von 12,5 l/min in 16 Minuten jeweils ein Probenvolumen von 200 l gesammelt. Zum Nachweis der EA-Viren wurden zwei verschiedene Methoden verwendet.

a) Impingement

In einer Gaswaschflasche (Impinger; Duran-Schott) wird die Luftprobe in einer Kapillare stark beschleunigt und anschließend in eine Flüssigkeit geleitet. Durch die hohe Geschwindigkeit wird die Luftprobe fein dispersiert, so dass enthaltene Viruspartikel in die Flüssigkeit ausgewaschen werden.

b) Gelatine-Filtration

Die Luftprobe wird durch einen Tiefenfilter aus Gelatine (Porengröße 3 µm; Sartorius) geleitet, so dass enthaltene Viruspartikel im Filter hängen bleiben. Anschließend wird der Filter in Zellkulturmedium aufgelöst (37°C, 15 min) und die Viren für die folgende Analytik zugängig gemacht.

Bestimmung der Viruskonzentration in den Proben

Die Quantifizierung der Viruspartikel aus beiden Sammelmethoden erfolge auf zweierlei Wegen.

a) Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht die zeitnahe Untersuchung der Proben. Mittels der PCR kann das Vorhandensein des EAV/PRRSV-Genoms spezifisch nachgewiesen werden. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, d.h. durch eine niedrige Nachweisgrenze. Ein Nachweis von Virus-Genom in der Probe kann jedoch nicht mit der strukturellen Integrität des Erregers gleichgesetzt werden, d.h. der Fähigkeit zur Infektion und Vermehrung in Wirtszellen.

Zunächst wurde aus der Probe (Impinger-Flüssigkeit bzw. in Zellkulturmedium aufgelöste Gelatinefilter) Gesamt-RNA isoliert (Qiagen). Bei Arteriviren liegt die Erbinformation in Form von RNA vor und muss vor der PCR in cDNA umgeschrieben werden (Fermentas). Die cDNA dient dann in der PCR als Matrize für die Amplifikation einer EAV-spezifischen DNA-Sequenz (Qiagen) in einem Real-Time-PCR-Thermocycler. Die PCR wurde jeweils im Doppelansatz durchgeführt (Primer und PCR-Bedingungen s. Tabellen unten). Die ursprüngliche Konzentration von Genom-Äquivalenten in der Probe wird über den Abgleich mit einer Standardkurve berechnet.

Tabelle: verwendete Primer

Zielgen	Primer--Nr.	5‘-3‘ Sequenz	Fragmentgröße
EAV ORF7	EAV7.53f (956)/ EAV7.256r (957)	GGCGACAGCCTACAAGCTACA CGGCATCTGCAGTGAGTGA	204
	EAV7.92P (Sonde)	FAM-TTGCGGACCCGCATCTGACCAA-BBQ	
PRRS ORF7	VR2332 f ()/ VR2332 r ()	GTAGTTGCACTCCTTTGGGGGGTGTA CGACAAATGCGTGGTTAT	171
	VR2332 p (Sonde)	FAM-TACATTCTGGCCCCTGCCCACC-BBQ	

Tabelle: Temperatur-Zeit-Bedingungen für die PCR

Zyklus	Dauer	Temperatur.	Anzahl Wiederholungen
initiale Denaturierung	15 min	95°C	1
Denaturierung	30 sec	95°C	40
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	30 sec	72°C	
End-Elongation	10 min	72°C	1

b) Zellkultur

Der zellkulturelle Nachweis von EAV ermöglicht den Nachweis von infektiösem Virus, d.h. die Fähigkeit der Erreger Zellen zu infizieren und sich in diesen zu vermehren. Diese Nachweismethode ist etwas weniger sensitiv und langwieriger als die PCR, jedoch kann die biologische Relevanz/Aktivität beurteilt werden.

Zunächst wurden die Proben (Impinger-Flüssigkeit bzw. in Zellkulturmedium aufgelöste Gelatinefilter) sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm; Sartorius) und dekadische Verdünnungsreihen im 8-fach Ansatz auf Mikrotiterplatten inokuliert. Zuvor wurde in die Mikrotiterplatten die o.g. Zelllinie eingesät. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und täglich kontrolliert. Nach 4 Tagen wurde abschließend die Häufigkeit von Veränderungen (cytopathischer Effekt) in den Einzelnen Verdünnungsstufen festgestellt. Mittels der Formel von Spearman und Kärber wurde die Viruskonzentration in der Probe berechnet.

Wiederholungen

Die beschriebene Prüfung wurde für die Filter (Mineralwolle und Airguard-Filter) in drei Wiederholungen mit jeweils einem neuen Filter durchgeführt. Weiterhin wurden drei Wiederholungen ohne zwischenzeitlichen Filterwechsel durchgeführt. Die zusätzlichen Versuche mit der EVAP-Einheit wurden in fünf (ohne Beeinflussung des pH-Wertes) bzw. drei Wiederholungen (mit reduzierten pH-Wert [pH<5]) durchgeführt.

Auswertung der Ergebnisse

Zur Berechnung des Abscheidegrades der Filter wurde Quotienten aus den Viruskonzentrationen auf der Rohgas- und Reingasseite gebildet.

Zunächst wurden die Abscheidegrade in Abhängigkeit von der Probennahme (Impingement und Gelatine-Filter)- und Nachweismethode (PCR und Zellkultur) für jede Prüfung berechnet und anschließend als Mittelwert mit Standardabweichung zusammengefasst. Für die graphischen Darstellungen wurden die Abscheidegrade der PCR sowie der Zellkultur aus beiden Probennahmemethoden zusammengefasst und als Gesamt-PCR bzw. Gesamt-Zellkultur bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Mineralwollefilter (EAV)

PCR-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	03.05.2012	1.66E+05	3.21E+03	98.1	1
	04.05.2012	1.93E+05	4.24E+03	97.8	1
	08.05.2012	8.09E+04	1.88E+03	97.68	1
	10.05.2012	5.83E+04	9.82E+02	98.32	2
	11.05.2012	5.74E+04	2.86E+03	95.02	3

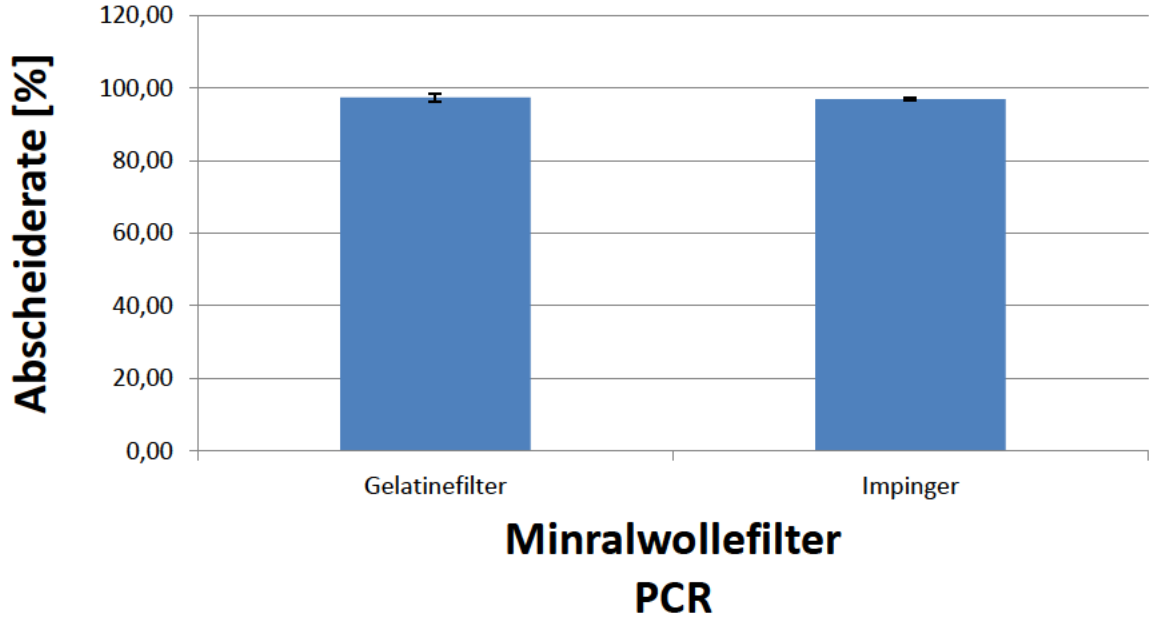
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.38% ±1.20%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	03.05.2012	1.68E+04	4.36E+02	97.4	1
	04.05.2012	2.05E+04	4.79E+02	96.2	1
	08.05.2012	9.09E+03	3.23E+02	96.44	1
	10.05.2012	3.20E+03	8.85E+01	97.23	2
	11.05.2012	7.99E+03	2.23E+02	97.21	3

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 96.90% ±0.48%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der PCR mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



Zellkultur-Untersuchungen

Tabelle: Zellkultur-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
	03.05.2012	1.33E+04	2.37E+02	98.22	1
	04.05.2012	1.33E+04	2.37E+02	98.22	1
	08.05.2012	5.62E+03	1.00E+02	98.22	1
	10.05.2012	7.50E+03	1.78E+02	97.63	2
	11.05.2012	7.50E+03	5.62E+01	99.25	3

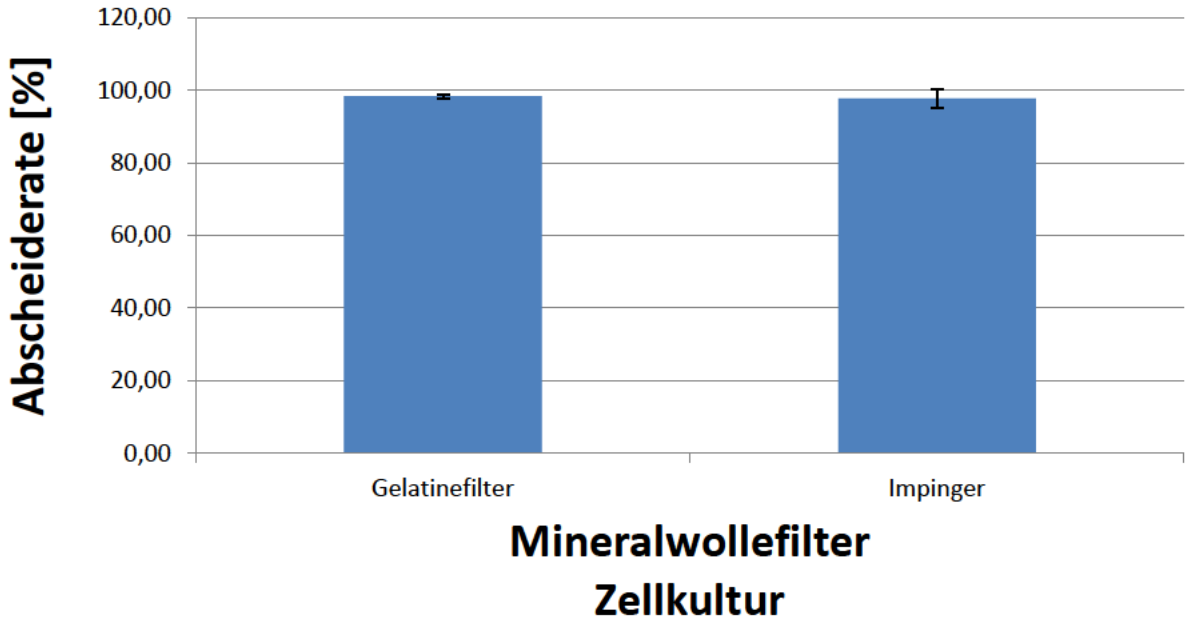
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung; 98.31% ±0.52%

Tabelle: Zellkultur -Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
	03.05.2012	4.22E+03	5.62E+01	98.67	1
	04.05.2012	4.22E+03	5.62E+01	98.67	1
	08.05.2012	1.00E+03	≤ 9,00E+00	≥99.1	1
	10.05.2012	1.78E+03	1.33E+02	92.53	2
	11.05.2012	3.16E+03	1.00E+02	99.68	3

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.73% ±2.63%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der Zellkultur mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



4. 2 Airguardfilter [redacted] (EAV)

PCR-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	21.05.2012	4.84E+03	8.86E+01	98.17	1
	22.05.2012	4.77E+04	5.15E+02	98.92	1
	23.05.2012	1.56E+04	1.15E+02	99.26	1
	25.05.2012	1.42E+04	1.15E+02	99.19	1
	29.05.2012	2.10E+04	2.17E+02	98.97	2
	30.05.2012	9.28E+04	1.27E+03	98.63	3

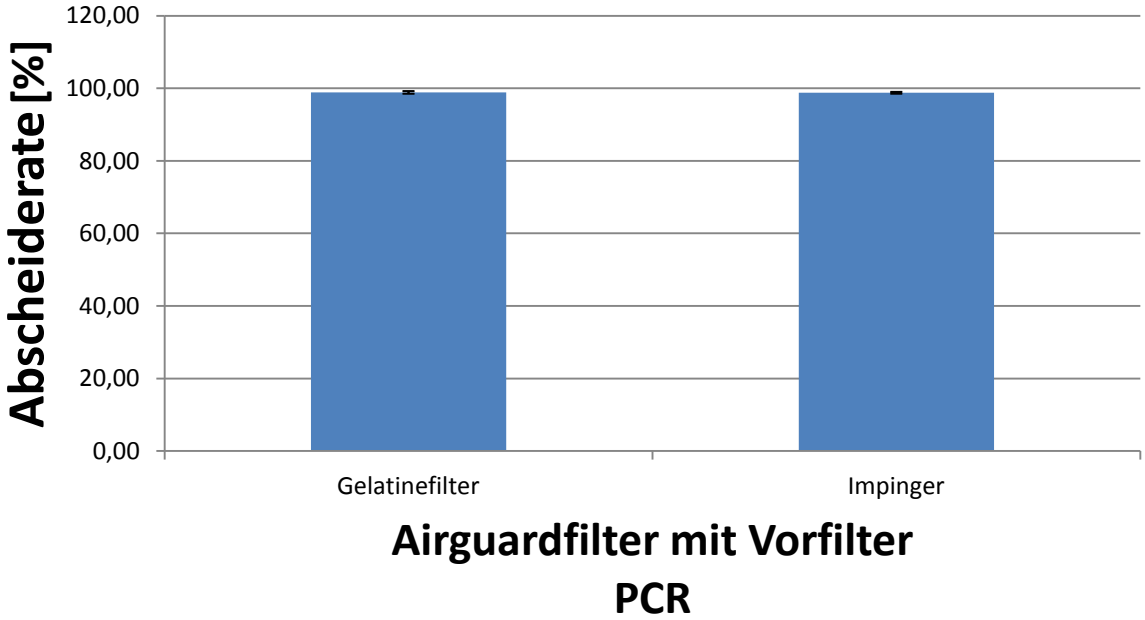
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 98.86% ±0.37%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	21.05.2012	1.19E+03	1.93E+01	98.38	1
	22.05.2012	1.52E+03	1.42E+01	99.07	1
	23.05.2012	1.42E+03	1.58E+01	98.89	1
	25.05.2012	4.72E+02	6.86E+00	98.55	1
	29.05.2012	1.95E+03	2.74E+01	98.59	2
	30.05.2012	8.20E+03	8.06E+01	99.01	3

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 98.75% ±0.26%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der PCR mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



Zellkultur-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
	21.05.2012	1.33E+02	≤ 9,00E+00	≥ 93,23	1
	22.05.2012	1.78E+03	≤ 1,00E+00	≥ 99,94	1
	23.05.2012	2.37E+03	≤ 9,00E+00	≥ 99,62	1
	25.05.2012	1.78E+03	4.22E+01	97.63	1
	29.05.2012	2.37E+03	4.22E+01	98.22	2
	30.05.2012	5.62E+03	5.62E+01	99	3

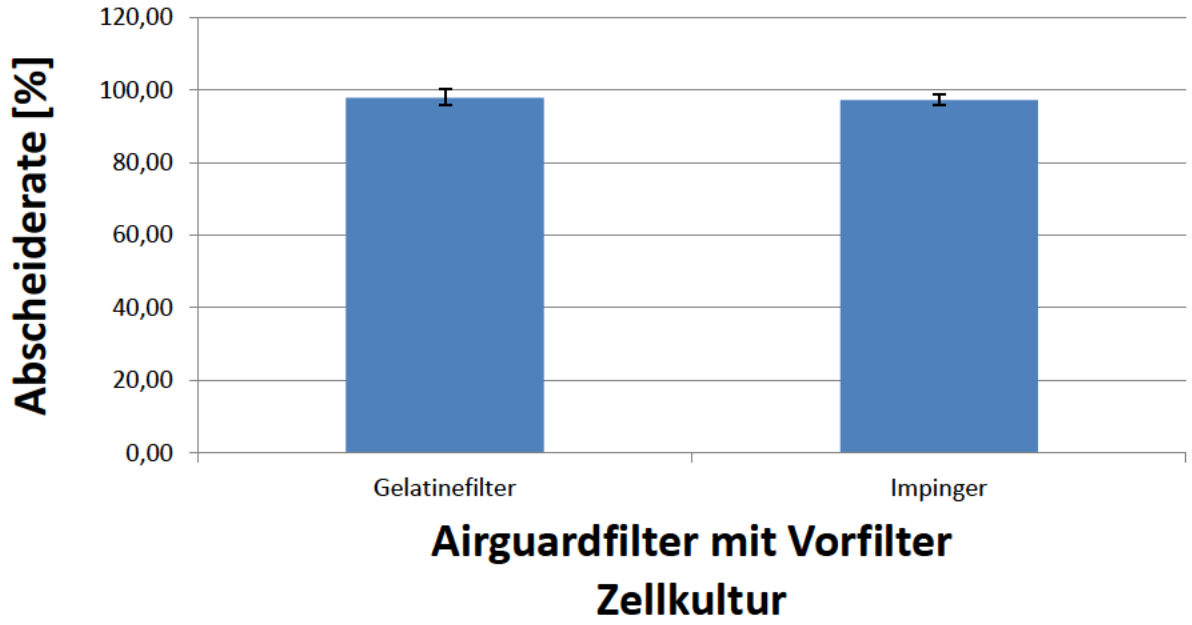
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.94% ±2.25%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
	22.05.2012	4.22E+02	≤ 9,00E+00	≥ 97,87	1
	23.05.2012	7.50E+02	≤ 9,00E+00	≥ 98,8	1
	25.05.2012	5.62E+02	≤ 9,00E+00	≥ 98,39	1
	29.05.2012	7.50E+02	4.22E+01	94.37	2
	30.05.2012	1.78E+03	5.62E+01	96.84	3
	12.06.2012	1,33E+03	4,22E+01	96,83%	4

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.18% ±1.45%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der Zellkultur mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



4. 3 Airguardfilter [redacted] (EAV)

PCR-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	31.07.2012 I	1,14E+05	1,38E+03	98,79	1
	31.07.2012 II	8,66E+04	4,86E+03	94,39	1
	02.08.2012 I	1,23E+05	3,01E+03	97,55	1
	02.08.2012 II	5,74E+04	4,08E+02	99,29	2
	03.08.2012	4,94E+04	3,59E+02	99,27	3

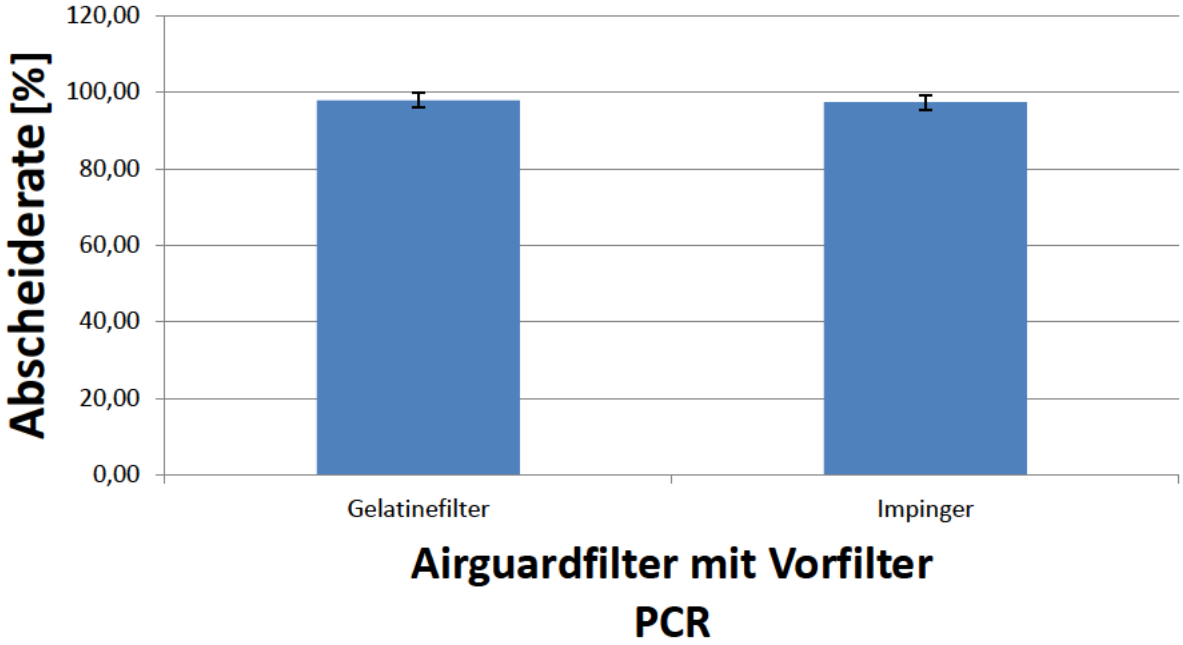
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.86% ±1.85%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	31.07.2012 I	4,32E+03	3,76E+01	99,13	1
	31.07.2012 II	4,97E+03	2,49E+02	94,99	1
	02.08.2012 I	4,52E+03	2,23E+02	95,07	1
	02.08.2012 II	5,74E+03	1,11E+02	98,07	2
	03.08.2012	2,37E+03	1,00E+01	99,57	3

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.37% ±1.97%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der PCR mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



Zellkultur-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
	31.07.2012 I	3,16E+02	9,00E+00	97,15	1
	31.07.2012 II	5,62E+02	9,00E+00	98,40	1
	02.08.2012 I	5,62E+02	9,00E+00	98,40	1
	02.08.2012 II	1,33E+02	9,00E+00	93,23	2
	03.08.2012	2,37E+03	9,00E+00	99,62	3

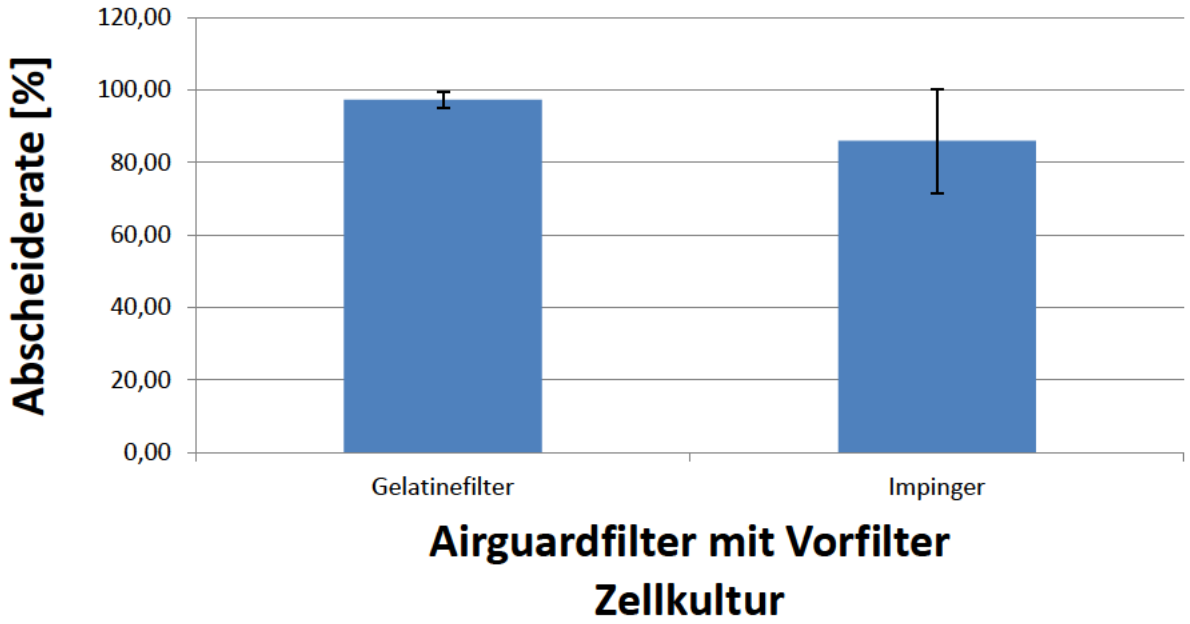
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.36% ±2.21%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
	31.07.2012 I	3,16E+02	9,00E+00	97,15	1
	31.07.2012 II	1,00E+02	4,22E+01	57,8%	1
	02.08.2012 I	4,22E+02	4,22E+01	90	1
	02.08.2012 II	4,22E+02	4,22E+01	90	2
	03.08.2012	1,78E+02	9,00E+00	94,94	3

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 85.98% ±14.36%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der Zellkultur mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



4.4 Mineralwollefilter (PRRSV)

PCR-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	31.08.2012	4,71E+06	2,11E+04	99,55	1
	03.09.2012	3,00E+06	7,61E+04	97,46	1
	05.09.2012	6,40E+06	1,57E+05	97,55	1
	11.09.2012	2,28E+06	5,10E+04	97,63	2
	12.09.2012	5,45E+06	1,44E+05	97,36	3

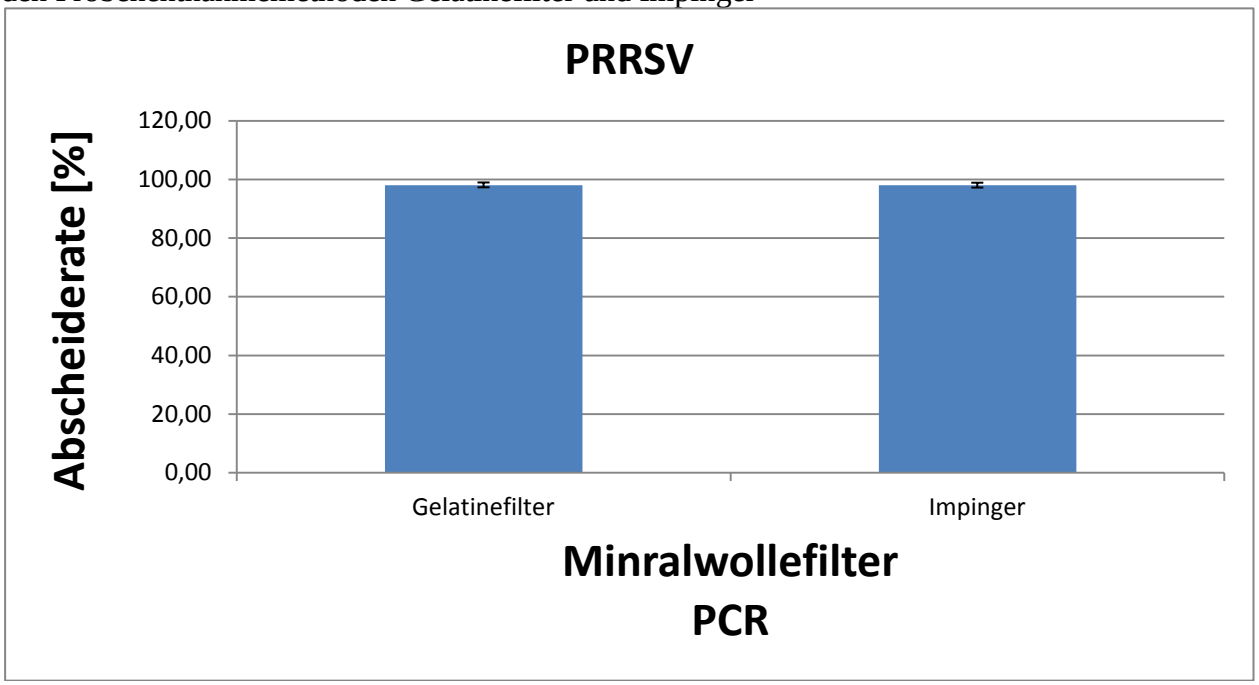
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 98.08% ±0.84%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)			Filter-Nr.
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]	
PCR	31.08.2012	1,24E+05	2,43E+03	98,04	1
	03.09.2012	1,28E+05	3,29E+03	97,43	1
	05.09.2012	3,57E+05	9,92E+03	97,22	1
	11.09.2012	2,22E+05	5,26E+03	97,76	2
	12.09.2012	2,65E+05	1,26E+03	99,52	3

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 97.99% ±0.81%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der PCR mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



4. 5 EVAP-Einheit (EAV)

PCR-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)		
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
PCR	21.09.2012	2,34E+05	1,81E+05	22,65
	24.09.2012	2,16E+05	1,66E+05	23,15
	26.09.2012	2,99E+05	6,84E+04	77,12
	02.10.2012	3,09E+05	1,93E+05	37,54
	04.10.2012	3,95E+05	1,91E+05	51,64

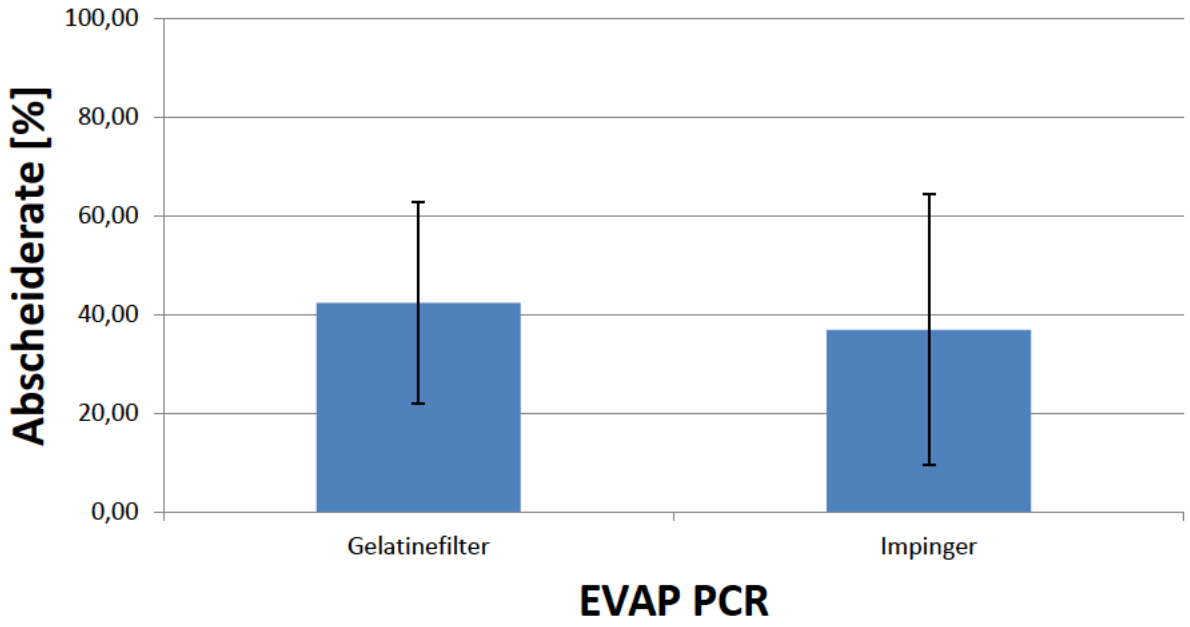
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 42.42% ±20.37%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)		
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
PCR	21.09.2012	3,16E+04	1,14E+04	63,92
	24.09.2012	2,06E+04	8,70E+03	57,77
	26.09.2012	5,73E+03	5,82E+03	0,00
	02.10.2012	1,21E+04	1,12E+04	7,44
	04.10.2012	1,52E+04	6,73E+03	55,72

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 36.97% ±27.38%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der PCR mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



Zellkultur-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)		
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
	21.09.2012	7,94E+01	1,00E+02	0,00
	24.09.2012	0,00E+00	0,00E+00	0,00
	26.09.2012	3,16E+03	2,00E+03	36,71
	02.10.2012	2,51E+04	1,78E+04	29,08
	04.10.2012	3,98E+04	1,00E+04	74,87

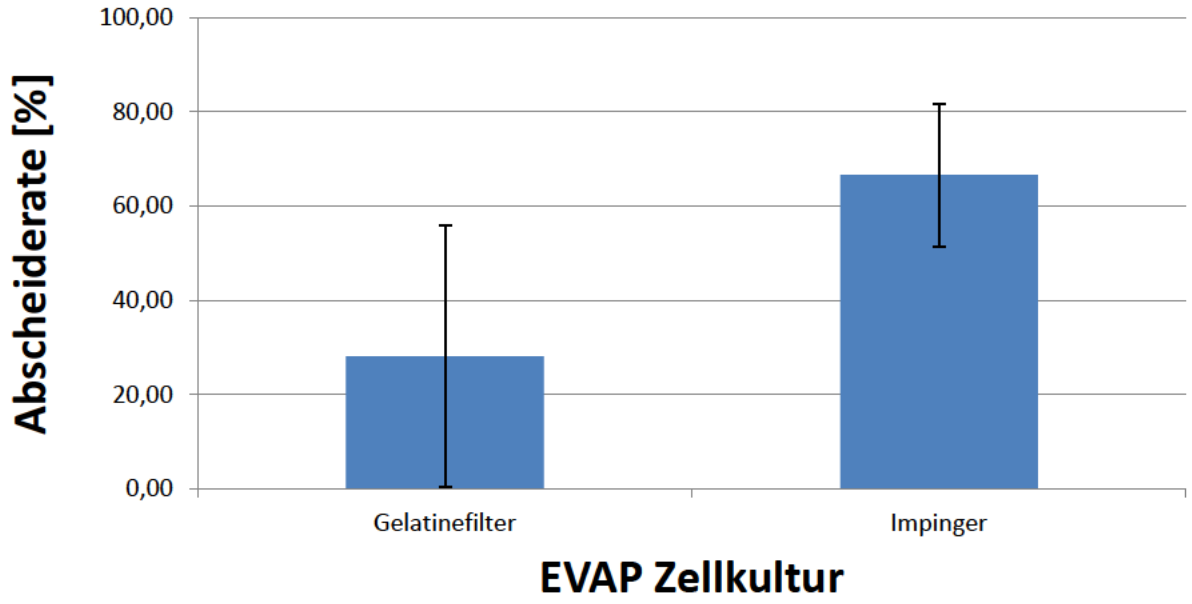
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 28.13% ±27.72%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)		
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
	21.09.2012	1,26E+02	7,94E+01	36,98
	24.09.2012	2,51E+02	5,62E+01	77,61
	26.09.2012	3,98E+02	1,00E+02	74,87
	02.10.2012	1,00E+03	3,16E+02	68,4
	04.10.2012	1,00E+03	2,51E+02	74,9

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 66.55% ±15.09%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der Zellkultur mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



4.6. EVAP-Einheit pH<5 (EAV)

PCR-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)		
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
PCR	17.10.2012	5,23E+05	5,67E+05	0
	26.10.2012	3,10E+05	1,73E+05	44,19
	29.10.2012	2,38E+05	1,76E+05	26,05

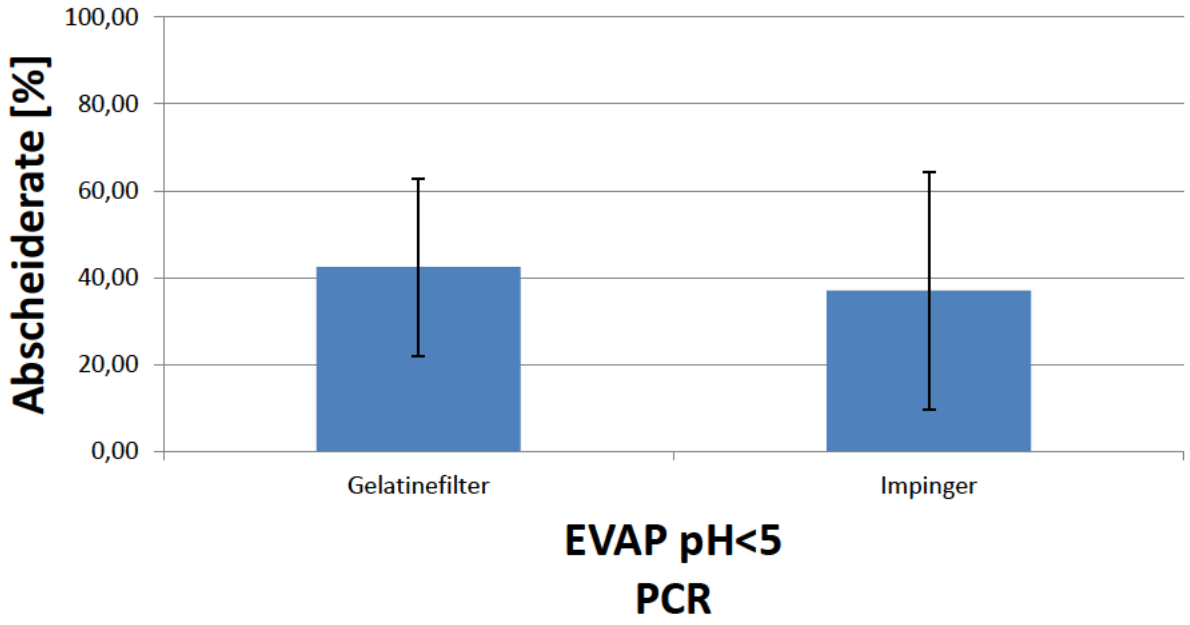
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 23.41% ±18.14%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

		(Viruspartikel/ml)		
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
PCR	17.10.2012	3,85E+04	2,51E+04	34,8
	26.10.2012	1,51E+04	9,37E+03	37,94
	29.10.2012	1,76E+04	1,03E+04	41,48

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 38.07% ±2.73%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der PCR mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



Zellkultur-Untersuchungen

Tabelle: PCR-Untersuchung der Gelatinefilter
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)		
	Gelatinefilter	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
	17.10.2012	1,26E+04	3,16E+03	74,92
	26.10.2012	6,31E+03	1,00E+04	0
	29.10.2012	1,00E+04	6,31E+03	39,9

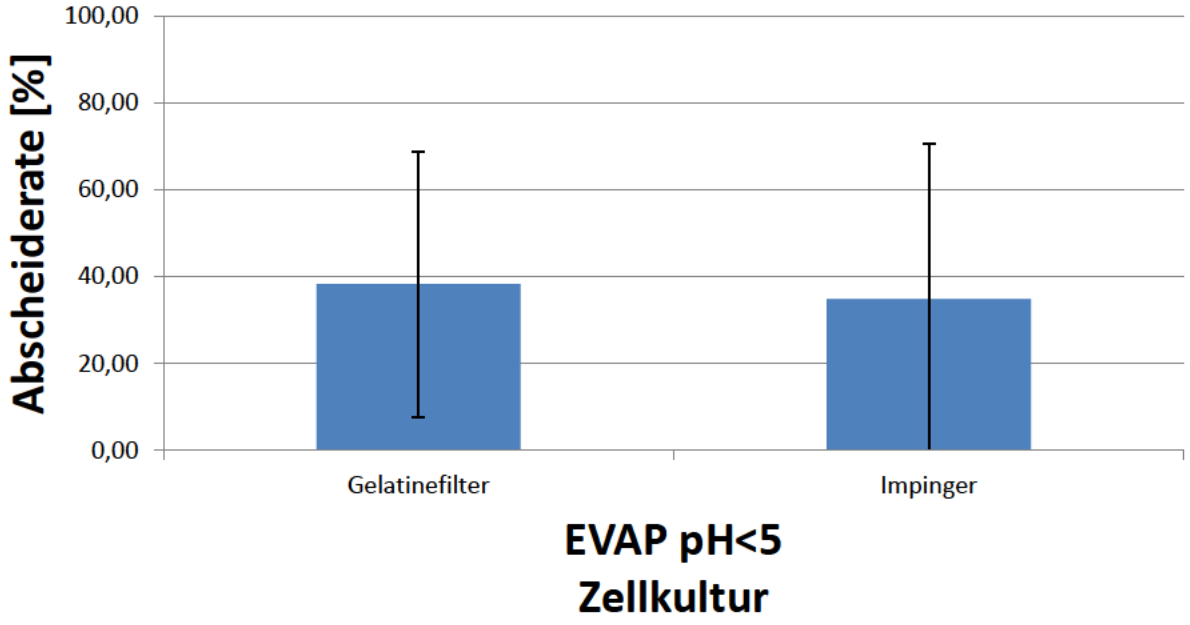
Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 38.27% ±30.61%

Tabelle: PCR-Untersuchung der Impingerflüssigkeit
Viruskonzentrationen und Abscheideraten

Zellkultur		(Viruspartikel/ml)		
	Impinger	Rohgas	Reingas	Abscheiderate [%]
	17.10.2012	3,98E+02	7,94E+02	0
	26.10.2012	2,51E+03	2,00E+02	20,32
	29.10.2012	2,00E+03	3,16E+02	84,2

Resultierender Mittelwert der Abscheiderate ± Standardabweichung: 34.84% ±35.88%

Abbildung: Mittelwerte der Abscheideraten ± Standardabweichung ermittelt in der Zellkultur mit den Probenentnahmemethoden Gelatinefilter und Impinger



4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mineralwollefilter-EAV
Die Prüfung des EAV-Abscheidevermögens des Mineralwollefilters ergab in den PCR-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 97.14% ±0.95% (Gelatine-Filter: 97.38% ±1.20%; Impinger: 96.90% ±0.48%) und in den Zellkultur-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 98.02% ±1.92% (Gelatine-Filter: 98.31% ±0.52%; Impinger: 97.73% ±2.63%). Insgesamt erreicht der Mineralwollfilter folglich einen Abscheidegrad von über 97%.

Airguard-Filters [redacted] EAV
Die Prüfung des EAV-Abscheidevermögens des Airguard-Filters [redacted] ergab in den PCR-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 98.80% ±0.32% (Gelatine-Filter: 98.86% ±0.37%; Impinger: 98.75% ±0.26%) und in den Zellkultur-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 97.56% ±1.93% (Gelatine-Filter: 97.94% ±2.25%; Impinger: 97.18% ±1.45%). Insgesamt erreicht der Airguard-Filter folglich einen Abscheidegrad von über 97%.

Beide Filter erreichen gegenüber EA-Viren fast identische Abscheidegrade von über 97%.

Airguard-Filters [redacted] EAV
Die Prüfung des EAV-Abscheidevermögens des Airguard-Filters [redacted] ergab in den PCR-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 97.61% ±1.92% (Gelatine-Filter: 97.86% ±1.85%; Impinger: 97.37% ±1.97%) und in den Zellkultur-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 91.67% ±11.75% (Gelatine-Filter: 97.36% ±2.21%; Impinger: 85.98% ±14.36%). Insgesamt erreicht der Airguard-Filter [redacted] folglich einen Abscheidegrad von über 91%.

Mineralwollefilter-PRRSV
Die Prüfung des PRRSV-Abscheidevermögens des Mineralwollefilters ergab in den PCR-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 98.04% ±0.73% (Gelatine-Filter: 98.08% ±0.84%; Impinger: 97.99% ±0.81%). Insgesamt erreicht der Mineralwollfilter folglich einen PRRSV-Abscheidegrad von über 98%.

EVAP-Einheit-EAV
Die Prüfung des EAV-Abscheidevermögens der EVAP-Einheit (ohne Beeinflussung des pH-Wertes) ergab in den PCR-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 39.70% ±24.29% (Gelatine-Filter: 42.42% ±20.37%; Impinger: 36.97% ±27.38%) und in den Zellkultur-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 47.34% ±15.09% (Gelatine-Filter: 28.13% ±27.72%; Impinger: 66.55% ±15.09%). Insgesamt erreicht der EVAP-Einheit folglich einen Abscheidegrad von über 39%.

EVAP-Einheit (pH<5)-EAV
Die Prüfung des EAV-Abscheidevermögens der EVAP-Einheit (pH<5) ergab in den PCR-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 30.74% ±14.90% (Gelatine-Filter: 23.41% ±18.14%; Impinger: 38.07% ±2.73%) und in den Zellkultur-Untersuchungen einen mittleren Abscheidegrad von 36.56% ±33.39% (Gelatine-Filter: 38.27% ±30.61%; Impinger: 34.84% ±35.88%). Insgesamt erreicht der EVAP-Einheit (pH<5) folglich einen Abscheidegrad von über 30%.

5. Ausblick

Prüfung von weiteren viralen Erregern bzw. von Bakterien

Eine Prüfung des Abscheidevermögens des Mineralwollefilters bezüglich weitere viraler Erreger sowie Bakterien soll diskutiert und ggf. durchgeführt werden.

Leipzig, xx.12.2012

Dr. T. Homeier-Bachmann	Prof. Dr. U. Truyen
(Projektleiter)	(Institutsdirektor)