

**Aus dem Institut für Tier- und Umwelthygiene des Fachbereichs  
Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin**

**und**

**der Abteilung für experimentelle Tierhaltung und Biosicherheit  
des Friedrich-Loeffler-Instituts**

**Viruzider Wirksamkeitsvergleich der Oberflächendesinfektion  
mittels aerosolierter Peroxyessigsäure (aPES) sowie Bestrahlung  
mit UV C-LED oder Kaltplasma**

**Inaugural-Dissertation**

**zur Erlangung des Grades einer**

**Doktorin der Veterinärmedizin**

**an der**

**Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

Jessica Kohs

**Tierärztin**

geboren in Pritzwalk

**Berlin 2024**

**Journal-Nr.: 4445**

**Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs der Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

**Erster Gutachter:** Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

**Zweiter Gutachter:** Prof. Dr. Jens Peter Teifke

**Dritter Gutachter:** PD Dr. Nicolai Denzin

**Deskriptoren:** disinfectant, disinfectants, virucides, antiviral agents, irradiation,  
ultraviolet irradiation, peracetic acid

**Tag der Promotion:** 21.06.2024

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
2	Literatur.....	3
2.1	Auswahl geeigneter Testviren .....	3
2.2	Auswahl des geeigneten Desinfektionsmittels .....	5
2.3	Trockenvernebelung von Peroxyessigsäure (PES) .....	7
2.3.1	Peroxyessigsäure PES.....	8
2.4	Ultraviolett C (UV C)-Strahlung .....	10
2.5	Plasmastrahlung .....	12
3	Material .....	15
3.1	Technische Geräte und Materialien.....	15
3.2	Chemikalien und Reagenzien.....	19
3.3	Nährmedien und Rezepte .....	21
3.4	Zellen und Wirtserreger.....	24
3.5	Testviren .....	26
3.6	Keimträger .....	29
4	Methoden .....	30
4.1	Zellumsetzung.....	30
4.2	Zellzählung.....	31
4.3	Anlegen einer 3D-Kultur .....	31
4.4	Virusanzucht .....	32
4.5	Virustitration .....	32
4.6	Vermehrung des MS 2 Bakteriophagen.....	33
4.7	Vorbereitung der Keimträger .....	33
4.8	Trockenvernebelung von Peroxyessigsäure.....	34
4.9	Ultraviolett C-Bestrahlung .....	36

4.9.1	Behandlung von unbelebten Oberflächen.....	36
4.9.1	Behandlung von belebten Oberflächen .....	37
4.10	Plasmabestrahlung .....	37
4.10.1	Behandlung von unbelebten Oberflächen.....	38
4.10.2	Behandlung von belebten Oberflächen .....	38
4.11	Auswertung der unbelebten Oberflächen .....	39
4.11.1	Auswertung der Bakteriophagen-Keimträger.....	39
4.12	Auswertung der belebten Oberflächen .....	40
4.12.1	MTT-Test .....	40
4.13	Berechnungen und statistische Auswertung.....	42
5	Ergebnisse .....	46
5.1	Viruzide Wirksamkeit der Trockenvernebelung von aPES.....	46
5.2	Viruzide Wirksamkeit von UV C-Bestrahlung.....	48
5.2.1	Behandlung von unbelebten Oberflächen.....	48
5.2.2	Behandlung von belebten Oberflächen .....	55
5.3	Viruzide Wirksamkeit der Kaltplasmabestrahlung mittels PlasmaCare®.....	59
5.3.1	Behandlung von unbelebten Oberflächen.....	59
5.3.2	Behandlung von belebten Oberflächen .....	60
6	Diskussion.....	63
6.1	Beurteilung der Praktikabilität und Verwendbarkeit der getesteten alternativen Oberflächendesinfektionsverfahren.....	63
6.1.1	Breites antimikrobielles Wirkungsspektrum .....	63
6.1.2	Anwendungs- und Anwenderfreundlichkeit.....	69
6.1.3	Wirksamkeit über die Zeit und Stabilität .....	70
6.1.4	Umweltverträglichkeit, Nachhaltigkeit und Wirtschaftlichkeit.....	71
6.2	Untersuchung der Eignung lebender Oberflächen (Monolayerkulturen und 3D- Schleimhautmodell) zur Testung alternativer Oberflächendesinfektionsverfahren.....	73

6.3	MS 2 als Surrogaterreger für unbehüllte Viren.....	75
6.4	BCoV als Surrogaterreger für SARS CoV-2 .....	76
7	Zusammenfassung.....	77
8	Summary.....	79
9	Literaturverzeichnis .....	81
10	Anhang .....	91
11	Publikationsverzeichnis.....	108
12	Danksagung .....	110
13	Finanzierungsquelle.....	111
14	Eigenständigkeitserklärung.....	112

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Desinfektionsmittel-Resistenzen von Mikroorganismen (Schliesser, 1975).....	6
Abbildung 2: Chemisches Gleichgewicht der Peroxyessigsäure (Bützer, 2012) .....	8
Abbildung 3: Wirkungsspektrum von Desinfektionsmitteln (Tierseuchen, 2023) .....	9
Abbildung 4: Spektrale Wirkungskurve der Zellinaktivierung und Absorptionskurve der Nukleinsäure (Schubert, 2016e).....	10
Abbildung 5: Einflussfaktoren bei der UV-Desinfektion (Schubert, 2016e).....	12
Abbildung 6: Unterschied zwischen direktem Plasma (links) und indirektem Plasma (rechts) (Weiss et al., 2017) .....	13
Abbildung 7: Keimträger (Edelstahl, PVC und Glas).....	30
Abbildung 8: Luftfeuchtigkeit [% rH] und Temperatur [°C] während der aPES-Trockenvernebelung.....	35
Abbildung 9: Ablaufschema für die Herstellung, Behandlung und Auswertung der Keimträger, © Biorender.....	39
Abbildung 10: Pipettierschema des MS 2 Bakteriophagen auf einer Agarplatte.....	40
Abbildung 11: erforderliche aPES-Konzentration für $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml-Virusreduktion (Edelstahl und PVC), Einteilung in behüllte und unbehüllte Viren, n=3 .....	46
Abbildung 12: Reduktion des MS 2 Bakteriophagen [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml] nach aPES-Trockenvernebelung verschiedener Konzentration (Edelstahl und PVC), n=3.....	47
Abbildung 13: erforderliche Strahlungsdosis des 254 nm-Strahlers für $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml-Virusreduktion (Edelstahl), Einteilung in behüllte und unbehüllte Viren, n=3.....	48
Abbildung 14: erforderliche Strahlungsdosis des 270 nm-Strahlers für $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml-Virusreduktion (Edelstahl, Glas, PVC), Einteilung in behüllte und unbehüllte Viren, n=3 .....	49
Abbildung 15: Virusreduktion [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml] nach 270 nm-Bestrahlung von SuHV-1, FCV, ORV-1 und MNV (Edelstahl, Glas und PVC), n=3 .....	51
Abbildung 16: Vergleich der erforderlichen Strahlungsdosis für eine $4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml-Virusreduktion des 254 nm- und 270 nm-Strahlers (Edelstahl), n=3 .....	53
Abbildung 17: Virusreduktion [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml] nach 233 nm-Bestrahlung bei einer Strahlungsdosis von 80 mJ/cm <sup>2</sup> , (Edelstahl, Glas und PVC), n=3.....	54
Abbildung 18: Virusreduktion [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml] nach 233 nm-Bestrahlung des 3D-Schleimhautmodells, n=3 .....	57

Abbildung 19: Vergleich der MTT-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) in schwarz und der 2D-Monolayerkultur in weiß nach UV C-Bestrahlung (233 nm), NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3 .....	58
Abbildung 20: Virusreduktion [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml] nach Plasmabestrahlung von MNV, FCV, VSIV und SuHV-1 (Edelstahl), n=3.....	59
Abbildung 21: Ergebnisse nach Plasmabestrahlung der 2D-Monolayerkultur, Tox. Toxizitätskontrolle, cpE zytopathischer Effekt (Terraplasma, 2023).....	60
Abbildung 22: Virusreduktion [ $\log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml] nach Plasmabestrahlung des 3D-Schleimhautmodells, n=3 .....	61
Abbildung 23: Vergleich der MTT-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) in schwarz und der 2D-Monolayerkultur in weiß nach Plasmabestrahlung, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3.....	62

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich DVV/RKI-Leitlinie, DVG und DIN EN 17272:2020 (CEN, 2020; DVG, 2017; Rabenau et al., 2012) .....	4
Tabelle 2: Zuordnung der verwendeten viralen Testorganismen anhand morphologischer Merkmale (Baltimore, 1971) .....	5
Tabelle 3: Vergleich direktes Plasma, indirektes Plasma und „Hybrid“-Plasma (Wiegand und Elsner, 2017).....	14
Tabelle 4: Gerät/ Material .....	15
Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien .....	19
Tabelle 6: Nährmedien und Rezepte .....	21
Tabelle 7: Zellen und Zelllinien .....	24
Tabelle 8: Viruseigenschaften .....	26
Tabelle 9: Mikroskopische Aufnahmen (10x Vergrößerung) der 2D-Monolayerkultur (TR146) nach UV C-Bestrahlung (233 nm), NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle.....	56
Tabelle 10: Einteilung der Viren nach Grad der Lipophilie bzw. Hydrophilie (Rheinbaben und Wolff, 2002d).....	67
Tabelle 11: Ergebnisse der Trockenvernebelung mit aPES, Edelstahl, n=3, * komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml, n.d. nicht durchgeführt.....	91
Tabelle 12: Ergebnisse der Trockenvernebelung mit aPES, PVC, n=3, * komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml, n.d. nicht durchgeführt.....	91
Tabelle 13: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 254 nm (Quecksilber), Edelstahl, n=3, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml, n.d. nicht durchgeführt .....	92
Tabelle 14: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 270 nm, Edelstahl, n=3, * komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml, n.d. nicht durchgeführt.....	94
Tabelle 15: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 270 nm, PVC, n=3, * komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml, n.d. nicht durchgeführt.....	96

Tabelle 16: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 270 nm, Glas, n=3, * komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml, n.d. nicht durchgeführt.....	99
Tabelle 17: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 233 nm, Edelstahl, n=3, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml .....	101
Tabelle 18: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 233 nm, PVC, n=3 .....	102
Tabelle 19: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 233 nm, Glas, n=3 .....	102
Tabelle 20: Ergebnisse der 233 nm-Bestrahlung des 3D-Mundschleimhautmodells, Inkubationszeit (IKZ) = 60 min, n=3, * komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz $\geq 4 \log_{10}$ TCID <sub>50</sub> /ml, PK=Positivkontrolle .....	103
Tabelle 21: MTT-Test-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) und der 2D-Monolayerkultur (TR146) nach 233 nm Bestrahlung, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3 .....	103
Tabelle 22: Ergebnisse der Kaltplasmabestrahlung, Edelstahl, n=2 .....	104
Tabelle 23: mikroskopische Aufnahmen der 2D-Monolayerkulturen (10x Vergrößerung), Plasmabestrahlung, eingesetztes Virus: VSIV, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle.....	105
Tabelle 24: Ergebnisse der Kaltplasmabestrahlung des 3D-Mundschleimhautmodells, Inkubationszeit (IKZ) = 60 min, n=3.....	106
Tabelle 25: MTT-Test-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) und der 2D-Monolayerkultur nach Kaltplasmabestrahlung, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, SD Standardabweichung, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3.....	107

## Abkürzungen und Zeichenerklärung

2D	zweidimensional	ATV-D	Alsever's Trypsin-Versen- Lösung
3D	dreidimensional	BCoV	Bovines Coronavirus
°	Grad	BHK-21	Zelllinie Goldhamster, <i>Mesocricetus</i> <i>auratus</i> , Niere
%	Prozent	BHM	Zelllinie westliche grüne Meerkatze, <i>Chlorocebus</i> <i>sabaeus</i> , Niere
°C	Grad Celsius	bzw.	beziehungsweise
≈	ungefähr	c	Konzentration
=	Gleichheitszeichen	CAP	Cold Atmospheric Plasma
±	Plusminuszeichen	CCLV-RIE	Collection of Cell Lines in Veterinary Medicine
≥	größer-gleich-Zeichen	CE	Conformité Européenne
x	Multiplikationszeichen	CEN	Comité Européen de Normalisation (European Committee for Standardization)
©	Copyright	cm	Zentimeter
®	registrierte Marke	cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
™	Trade mark	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
µl	Mikroliter	CP	Conditioning phase
A549	Zelllinie Mensch, <i>Homo sapiens</i> , Lunge	cpE	zytopathischer Effekt
Abb.	Abbildung	CRFK	Zelllinie Hauskatze, <i>Felis</i> <i>catus</i> , Niere
AG	Arbeitsgruppe		
AP	Aeration Phase		
aPAA	siehe aPES		
aPES	aerosolisierte Peroxyessigsäure		
Aqua dest	destilliertes Wasser		
ATK	Antrocknungskontrolle		

DBD	Dielectric Barrier Discharge	FKS	Fetales Kälberserum
DIN EN	Deutsche Industrie-Norm und Europäische Norm	g	G-Zahl der Zentrifuge
DM	Desinfektionsmittel	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	h	Stunde/n
DNA	Desoxyribonukleinsäure	HAdV-5	Humanes Mastadenovirus C Typ 5
dpi	days post infection	HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement
ds	double-stranded	HPV-1	Human Poliovirus Typ 1
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft	IP	Incubation phase
DVV	Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V.	kb	Kilobase
ECBO	enteric cyto- pathogenic bovine orphan-Virus	KE-R	Zelllinie Hauskatze, <i>Felis catus</i> , Fetus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	KOP-R	Zelllinie Hausrind, <i>Bos primigenius taurus</i> , Oesophagus, Pharynx
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	kV	Kilovolt
et al.	<i>et alii</i> (und andere)	l	Liter
etc.	<i>et cetera</i> (und so weiter)	LB	lysogeny broth
EU	Europäische Union	LED	Light Emitting Diode
FCoV	Felines Coronavirus	l/min	Liter pro Minute
FCV	Felines Calicivirus	log <sub>10</sub>	dekadischer Logarithmus
		m <sup>3</sup>	Kubikmeter

MAK	maximale Arbeitsplatz-Konzentration	NADPH	Nicotinamid-adenindinukleotidphosphat
max.	maximal	NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
MEM	minimal essential medium	NEA	non-essential amino acids
min	Minute	NK	Negativkontrolle
mJ/cm <sup>2</sup>	Millijoule pro Quadratzentimeter	nm	Nanometer
ml	Milliliter	o.ä.	oder ähnliches
mm	Millimeter	ORV-1	Mammalian Orthoreovirus 1
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter	PAA	siehe PES
MNV	Murines Norovirus	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
MPa	Megapascal	PES	Peroxyessigsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	pH	Pondus Hydrogenii
MS 2	Emesvirus zinderi	PK	Positivkontrolle
MSSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	PSA	Persönliche Schutzausrüstungen
MSW	mikrobiologische Sicherheitswerkbank	PT	Zelllinie Hausschaf, <i>Ovis orientalis aries</i> , Hoden
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid	PVC	Polyvinylchlorid
MVA	modifiziertes Vaccinia Ankara Virus	RAW 264.7	Zelllinie Maus, <i>Mus musculus</i> , Ascites
mW/cm <sup>2</sup>	Milliwatt pro Quadratzentimeter	rH	Relative Humidity
NADH	Nicotinamid-adenindinukleotid	RNA	Ribonukleinsäure
		RNS	Reaktive Stickstoffspezies
		ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
		RT	Raumtemperatur

RVB	Riemser Virusbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)	v/v	volume per volume
s	Sekunden	Vero E6	Zelllinie westliche grüne Meerkatze, <i>Chlorocebus sabaeus</i>
SARS CoV-2	Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2	VSIV	Vesiculovirus Indiana
SD	Standardabweichung	w/w	weight by weight
SMD	Surface Micro-Discharge	z.B.	zum Beispiel
ss	single-stranded	ZB	Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)
ST	Zelllinie Hausschwein, <i>Sus scrofa domestica</i> , Hoden		
SuHV-1	Varicellovirus suidalpha 1		
T75	Zellkulturflasche mit einer Fläche von 75 cm <sup>2</sup>		
Tab.	Tabelle		
TCID <sub>50</sub>	Tissue Culture Infection Dose 50		
Tox.	Zytotoxizitätskontrolle		
TR146	Zelllinie, Mensch, <i>Homo sapiens</i> , bukkale Keratinozyten eines spinozellulären Karzinomes		
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
u.a.	unter anderem		
UV	Ultraviolett		

## 1 Einleitung

Um die Übertragung von Krankheitserregern zu verhindern und damit Infektionskrankheiten zu bekämpfen, sind Reinigung und Desinfektion unabdingbar. Dabei dient die Reinigung der Beseitigung von Kontaminanten wie z.B. Staub, Schmutz oder organischen Substanzen. Während des Reinigungsprozesses können bereits Mikroorganismen mechanisch beseitigt werden, ohne dass eine Abtötung oder Inaktivierung erfolgt (KRINKO, 2022). Des Weiteren stellt die ordnungsgemäße Reinigung auch die Voraussetzung für eine wirksame Desinfektion dar (Müller *et al.*, 2017). Bei der Desinfektion handelt es sich um die Reduktion von Krankheitserregern. Sie verhindert damit ihre Übertragung, sodass eine Infektion nicht zu befürchten ist (Bodenschatz, 2006a; Schubert, 2016a, 2016b). Die Definition bezieht sich hiernach nur auf pathogene bzw. fakultativ-pathogene Keime. Nicht infektionsrelevante Umweltkeime sind demzufolge ausgeschlossen (Schubert, 2016b). Die Prüfrichtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) unterscheiden zwischen einer vorbeugenden sowie anlassbezogenen Desinfektion. Bei Erstgenannter werden hygienische Maßnahmen zur allgemeinen Verminderung des Keimgehaltes angewendet. Dies kann sowohl in belegten als auch in unbelegten Ställen erfolgen. Die anlassbezogene Desinfektion umfasst dabei gegen spezifische Erreger gerichtete Maßnahmen, welche in nicht belegten Ställen bzw. ohne Tierkontakt durchgeführt werden (DVG, 2017). Darüber hinaus wird bei der Desinfektion auch in Routine- und Schlussdesinfektion unterschieden. Die dafür angewendeten Desinfektionsmethoden können unterschiedlicher Art, z.B. Flächendesinfektion, Handdesinfektion, etc. sein (Bodenschatz, 2006a; Schubert, 2016b). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Desinfektion von Oberflächen, ohne Einsatz von Wisch- oder Feuchtdesinfektionsmethoden. Verglichen werden dabei die viruzide Wirksamkeit aerosolisierter (trockenvernebelter) Peroxyessigsäure (aPES) mit der Bestrahlung durch UV C (233 nm und 270 nm) bzw. der Einwirkung von Kaltplasma. Aus den erzielten Ergebnissen soll die Effektivität der untersuchten Desinfektionsmethoden verglichen und Aussagen zur Eignung als Oberflächendesinfektionsverfahren getroffen werden. Die Eignung als qualitatives Desinfektionsverfahren wurde anhand folgender Kategorien evaluiert: Wirksamkeit, Anwendungsfreundlichkeit, Stabilität, Nachhaltigkeit und Wirtschaftlichkeit. Als Testoberflächen wurden sowohl unbelebte Keimträger aus Edelstahl, PVC und Glas als auch belebte Oberflächen, in Form von 2D-Monolayerkulturen und 3D-Airliftkulturen, eingesetzt.

Für die Untersuchungen wurde ein breites Spektrum verschiedener Viren ausgewählt, welches sich aus unterschiedlichen Testviren der Anforderungen der DVV/RKI, DVG-Richtlinien und

der DIN EN 17272:2020 zusammensetzte. Darüber hinaus fanden weitere veterinärmedizinisch relevante Erreger Berücksichtigung. Unter anderem wurde die Tenazität verschiedener Coronaviren, wie bovine und feline Coronaviren mit dem im Jahre 2020 pandemieauslösenden SARS CoV-2 verglichen. Ziel dieser Arbeit war es u.a. mögliche Surrogate zu identifizieren, die eine geringere Pathogenität aufweisen, als das in die Risikogruppe 3 eingestufte SARS CoV-2. Des Weiteren wurde auch die Eignung vom MS 2 Bakteriophagen als Surrogat für unbehüllte Viren untersucht.

## 2 Literatur

### 2.1 Auswahl geeigneter Testviren

Derzeit gibt es weder für die UV C- noch Plasmabehandlung spezifische Richtlinien bzw. DIN-Normen zur standardisierten Testung geeigneter Biozidprodukte. Einzig für die Trockenvernebelung als Verfahren zur luftübertragenen Raumdesinfektion existiert eine spezifische Prüfvorschrift (DIN EN 17272:2020). Des Weiteren wurde sich an den DVV/RKI- sowie DVG-Leitlinien angelehnt, welche Vorgaben für die nass-chemische Desinfektion beinhalten. Nach der Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin werden bestimmte Viren als Testorganismen gefordert. Bei der Wirksamkeitsbestimmung der einzelnen bioziden Substanzen bzw. Gemische wird in „begrenzt viruzid“ und „viruzid“ unterteilt. Die Bezeichnung „begrenzt viruzid“ bezieht sich dabei auf eine ausschließliche Wirksamkeit gegenüber behüllten Viren und stellt somit lediglich die Mindestanforderungen an geeignete Desinfektionsmittel (DM) dar. Als Testorganismen werden dabei das Vacciniavirus und das Virus der bovinen Virusdiarrhoe (BVDV) eingesetzt (Rabenau *et al.*, 2015). Da in mehreren Publikationen gezeigt werden konnte, dass bei der Verwendung des attenuierten modifizierten Vaccinia Ankara Virus (MVA) vergleichbare Ergebnisse zum Vacciniavirus erzielt werden, wird in diesen Testungen das MVA untersucht (Hartnack *et al.*, 2008; Rabenau *et al.*, 2010). Als höchste Teststufe für Biozidprodukte gilt die Bezeichnung „viruzid“, welche zusätzlich die Wirksamkeitsprüfung gegenüber unbehüllten und lipophilen Viren einbezieht. Die dafür gelisteten Testorganismen beinhalten den Poliovirus-Impfstamm Typ I (HPV-1), das Adenovirus Typ 5 (HAdV-5), das murine Norovirus (MNV) sowie das Simian-Virus 40 (SV 40) (Rabenau *et al.*, 2015). Alle Viren mit Ausnahme des Simian-Virus 40 kamen in den Versuchen dieser Arbeit zum Einsatz. Vergleichbar zur humanmedizinischen Leitlinie hat die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) Richtlinien über die Anwendung von Flächendesinfektionen im Bereich der Lebensmittelhygiene und der Tierhaltung erstellt. Nach den DVG-Richtlinien zur Prüfung von chemischen DM für die Tierhaltung sind als Testorganismen das unbehüllte Bovine Enteritis-Virus (ECBO-Virus) sowie das Reo-Virus und das behüllte Newcastle Disease-Virus (NDV) sowie das Vaccinia-Virus (Orthopoxvirus commune) gelistet. Entsprechende Biozidprodukte müssen dabei für die Qualifikation „viruzid“ eine Wirksamkeit gegenüber allen vier genannten Viren nachweisen. Die Qualifikationsprüfung „begrenzt viruzid“ wird dagegen nur mit NDV und dem Vaccinia-Virus durchgeführt (DVG, 2017). In dieser Arbeit wurden mit dem Mammalian Orthoreovirus 1, als ein Vertreter der unbehüllten Reo-Viren, und dem MVA, als ein Vertreter der behüllten Viren,

zwei der gelisteten Testorganismen mit einbezogen. Die DIN EN 17272:2020 ist das Prüfverfahren zur Bestimmung der desinfizierenden Wirkung von automatisierten Verfahren, die zur Verteilung von DM in der Luft eingesetzt werden. Als mögliche Testviren wurden das murine Norovirus, das Adenovirus Typ 5 sowie das porcine Parvovirus vorgeschlagen. Bis auf Letzteres wurden alle Viren in dieser Arbeit untersucht. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Normen beinhaltet die DIN EN 17272:2020 neben Viren und Bakteriophagen auch vegetative Bakterien, Mykobakterien, Hefen, bakterielle Sporen sowie Schimmelpilzsporen, die als Testorganismen in Betracht gezogen werden können. Hinsichtlich der Viren erfolgt keine Einteilung in begrenzt viruzid oder viruzid (CEN, 2020). Tabelle 1 stellt eine Zusammenfassung der Anwendungsgebiete und der empfohlenen viralen Testorganismen der jeweiligen Richtlinie dar.

Tabelle 1: Vergleich DVV/RKI-Leitlinie, DVG und DIN EN 17272:2020 (CEN, 2020; DVG, 2017; Rabenau et al., 2012)

	<b>DVV/RKI-Leitlinie</b>	<b>DVG</b>	<b>DIN EN 17272:2020</b>
Anwendungsgebiet	Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln für die Humanmedizin	Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln für die Tiermedizin	Verfahren zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren
Wirkungsbereich begrenzt viruzid	Vacciniavirus bzw. Modified Vacciniavirus (MVA), Bovines Virusdiarrhoe (BVDV)	Newcastle Disease Virus (NDV), Vacciniavirus	Keine Einteilung in begrenzt viruzid und viruzid
Wirkungsbereich viruzid	Polio-Impfstamm (HPV-1), Adenovirus Typ 5 (HAdV-5), Simian Virus 40 (SV 40)	Enteric cytopathic bovine orphan virus (ECBO), Reo-Virus (ORV-1), Newcastle Disease Virus (NDV), Vacciniavirus	Murines Norovirus (MNV), Adenovirus Typ 5 (HAdV-5), Porcines Parvovirus (PPV)

Bei der Zusammenstellung eines aussagekräftigen und breiten Spektrums von Testviren wurden zusätzlich zu den bereits genannten offiziellen viralen Testorganismen weitere, insbesondere veterinärmedizinisch relevante, Vertreter ausgewählt. Insgesamt sollten die ausgewählten Erreger Vertreter möglichst vieler Gruppen der Baltimore-Klassifikation einschließen. Dabei wurden Viren ausgehend vom viralen Genom (DNA, RNA, einzel- oder doppelsträngig) ausgewählt (Baltimore, 1971). Die Testorganismen sollen dabei kein bzw. nur ein geringes humanpathogenes Potenzial aufweisen und sich einfach in Zellkultur vermehren lassen (Weinhold und Köhler, 1971). Dies schließt einen eindeutigen Virusnachweis mittels cpE und die Anzucht in hohen Virustitern ein (Weinhold und Köhler, 1971). Von diesen

Vorgaben wich lediglich das SARS CoV-2 ab, welches mit einer Ablesezeit von 7 dpi, die längste Inkubationsdauer der getesteten Viren aufwies sowie aufgrund seines hohen zoonotischen Potenzials in die Risikogruppe 3 eingestuft ist und daher ausschließlich in der Schutzstufe 3 bearbeitet werden konnte (BAuA, 2023a).

Tabelle 2: Zuordnung der verwendeten viralen Testorganismen anhand morphologischer Merkmale (Baltimore, 1971)

Baltimore-Klassifikation	Eigenschaften	Vertreter	
		unbehüllt	behüllt
Gruppe 1	dsDNA	HAdV-5	SuHV-1 MVA
Gruppe 2	+ssDNA	-	-
Gruppe 3	dsRNA	ORV-1	-
Gruppe 4	+ssRNA	MNV FCV HPV-1 MS 2	FCoV BCoV SARS CoV-2
Gruppe 5	-ssRNA	-	VSIV
Gruppe 6	+ssRNA-RT	-	-
Gruppe 7	dsDNA-RT	-	-

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, ist die Mehrheit der ausgewählten Testorganismen der Gruppe 4 zuzuordnen. Für die Gruppe 2 der einzelsträngigen DNA-Viren wurde in den Vorversuchen das porcine Parvovirus getestet. Bei der Auswertung der Virustitration konnte der cpE nicht eindeutig festgestellt werden. Darüber hinaus erwiesen sich kommerzielle Antikörper als nicht geeignet für einen deutlichen Nachweis durch Immunfluoreszenz, weswegen auf den Einsatz des Virus als Testorganismus verzichtet wurde. Ebenfalls wurden, aufgrund der schwierigen Kultivier- und Nachweisbarkeit, keine Vertreter aus den Gruppen 6 und 7 der Retroviren eingesetzt.

## 2.2 Auswahl des geeigneten Desinfektionsmittels

Bevor ein DM in Europa auf den Markt gelangt, muss dieses nach der Biozidverordnung vorher zugelassen werden (Europäisches Parlament und Europäische Union, 2012). Jenes Zulassungsverfahren umfasst zwei Stufen. In der ersten Stufe wird der Wirkstoff des Biozidproduktes in einem EU-weiten Verfahren hinsichtlich schädigender Auswirkungen auf Mensch, Tier und Umwelt analysiert. Besteht das Biozid die Stufe, gelangt der Wirkstoff in die Unionsliste der genehmigten Wirkstoffe. Diese Genehmigung gilt für einen Zeitraum von höchstens zehn Jahren und kann durch die Europäische Kommission jederzeit wieder aufgehoben werden, sofern es Hinweise darauf gibt, dass die Genehmigungsvoraussetzungen nicht mehr gegeben sind. Die zweite Stufe bezieht sich auf die Zulassung des Biozidproduktes.

Um jene zu erhalten, müssen entsprechende Voraussetzungen erfüllt werden. Insbesondere muss das Biozidprodukt wirksam sein. Darüber hinaus darf es keine unerwünschten Wirkungen bzw. Resistenzen auf die Zielorganismen haben. Das Biozid bzw. dessen Rückstände dürfen zudem keine unerwünschten Wirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier sowie auf die Umwelt mit sich bringen. Diese Zulassung gilt für eine Dauer von höchstens zehn Jahren (Europäisches Parlament und Europäische Union, 2012). Da das Biozid in der Lage sein muss, die gewünschten Mikroorganismen zu inaktivieren, muss geprüft werden, ob das DM für den entsprechenden Einsatz wirksam ist (Fux und Sexl, 2016; Schubert, 2016c). Neben ihrer Größe und ihrem Aufbau unterscheiden sich Mikroorganismen auch durch ihre Tenazität, d.h. ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen Wirkstoffen oder Umwelteinflüssen (Abb. 1).

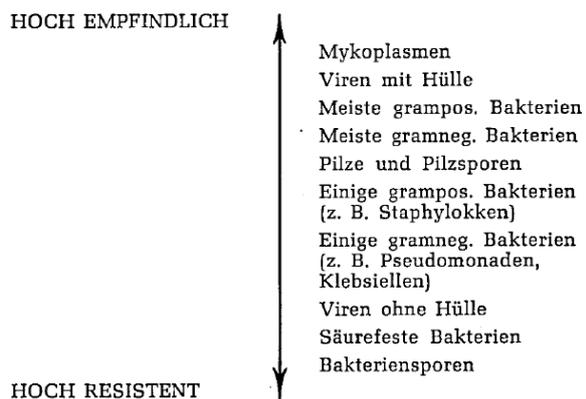


Abbildung 1: Desinfektionsmittel-Resistenzen von Mikroorganismen (Schliesser, 1975)

Nach Schliesser (1975) sind Mykoplasmen und behüllte Viren generell hochempfindlich gegenüber DM. Behüllte Viren werden von einer Lipidhülle umgeben, die durch lipidlösliche DM beschädigt werden und somit ihre Infektiosität verlieren. Bakterien und auch Pilze sind ebenfalls hoch bis mittel empfindlich und zeigen nur eine geringe Resistenz. Eiweißdenaturierung, Schädigung der Zytoplasmamembran, Blockierung essenzieller Enzymsysteme im Zellstoffwechsel oder bei der Zellwandsynthese sind dabei mögliche Inaktivierungswege. Erreger mit einer hohen Resistenz sind dagegen unbehüllte Viren, säurefeste Bakterien und Bakteriensporen. Bei Viren ohne Lipidhülle wird die Nukleinsäure lediglich durch das Kapsid geschützt, wodurch lipidlösliche DM keine Wirkung zeigen. Diese Viren sind daher wesentlich schwieriger zu desinfizieren als behüllte Viren (Schliesser, 1975). Darüber hinaus stellte Kramer (2006) weitere Anforderungen an das DM. So soll es beispielsweise einfach in der Handhabung sein, eine möglichst geringe Toxizität aufweisen sowie eine gute Hautverträglichkeit zeigen. Trotz rauer und poriger Oberfläche von Gegenständen muss es in der Lage sein, in die Tiefe einzudringen. Zudem sollte es verträglich

mit unterschiedlichen Materialien sein und keine Rückstände hinterlassen (Kramer, 2006). Die Liste der Anforderungen wurde durch andere Autoren erweitert. Dabei soll das DM eine schnell eintretende Wirkung und eine lange Wirksamkeit zeigen (Fux und Sexl, 2016; Schubert, 2016c). Zusätzlich muss es über eine ausreichend hohe Stabilität verfügen, sodass es beim Stehen über längere Zeit nicht zersetzt oder inaktiviert wird (Fux und Sexl, 2016; Schubert, 2016c). Das DM sollte gegen physikalische, biologische und chemische Einflüsse möglichst stabil sein (Kramer, 2006). Des Weiteren soll es möglichst keinen oder nur einen geringen Eiweiß-, Seifen- oder Temperaturfehler aufweisen sowie licht- und sauerstoffbeständig sein (Fux und Sexl, 2016; Schubert, 2016c). Das DM soll zudem biologisch abbaubar und ungiftig sein (Schubert, 2016c). Mit Blick auf die derzeit geltende Biozidverordnung (Europäisches Parlament und Europäische Union, 2012) hat dieser Aspekt entscheidend an Bedeutung gewonnen. So müssen alle Desinfektionsmittel einen aufwendigen Zulassungsprozess durchlaufen, bei dem insbesondere die Umweltverträglichkeit und die Toxizität, der in den einzelnen DM enthaltenen bioziden Substanzen, begutachtet werden (Europäisches Parlament und Europäische Union, 2012). Letztendlich soll das DM darüber hinaus in der Verwendung auch wirtschaftlich sein (Kramer, 2006).

### 2.3 Trockenvernebelung von Peroxyessigsäure (PES)

Das Verfahren der Trockenvernebelung beruht auf dem physikalischen Phänomen des Venturi-Effekts. Dabei wird Flüssigkeit, in diesem Fall die Peroxyessigsäure, mittels Druckluft durch eine schmale Düse geleitet. Aufgrund der Verengung steigt die Strömungsgeschwindigkeit, wobei gleichzeitig der Druck sinkt (TecScience, 2023). Durch dieses Prinzip wird das DM in ultrafeine Tropfen ( $< 7.5 \mu\text{m}$ ) verteilt, die lange in der Schwebephase verbleiben und somit in der Lage sind, einen „trockenen Nebel“ zu erzeugen. Aufgrund der verlängerten Schwebephase ist auch die Kontaktzeit der Oberflächen mit dem DM erhöht (Krishnan *et al.*, 2012; Teifke *et al.*, 2021). Im Gegensatz zu nass-chemischen Desinfektionsmethoden werden die behandelten Oberflächen bei der Trockenvernebelung nicht mit einem Feuchtigkeitsfilm überzogen, sodass das Verfahren eine hervorragende Materialverträglichkeit zeigt. Aufgrund der feinen Vernebelung des Desinfektionsmittels breiten sich die gebildeten Aerosole wie Gase im Raum aus und gelangen bei ausreichender Einwirkzeit somit auch an schwer zugängliche Stellen (Krishnan *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Peroxyessigsäure (PES)

Peroxyessigsäure (PES,  $C_2H_4O_3$ ), ist eine farblose und nach Essig riechende Flüssigkeit, die in konzentrierter Form als explosiv und ätzend gilt (Mücke, 1970). Wie in Abbildung 2 dargestellt, liegt PES nicht in Reinform vor, sondern als Gleichgewicht mit Wasserstoffperoxid, Essigsäure und Wasser vor (Schubert, 2016d).

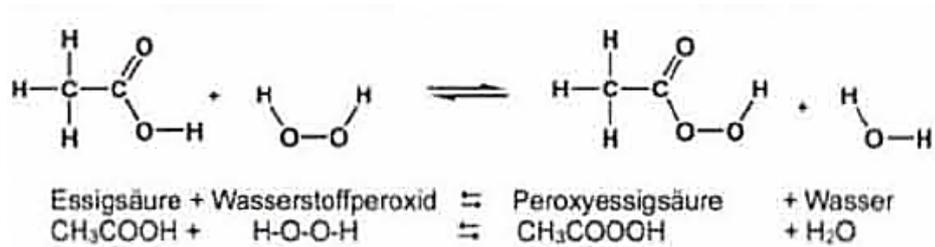


Abbildung 2: Chemisches Gleichgewicht der Peroxyessigsäure (Bützer, 2012)

Aufgrund seiner Hydroperoxidgruppe handelt es sich um eine stark oxidierende Verbindung, wodurch eine irreversible bakterizide, sporozide, viruzide und fungizide Wirkung hervorgerufen werden kann (Kramer *et al.*, 2008; Mücke, 1970). Die Wirksamkeit ist dabei stärker als die von Wasserstoffperoxid und anderen Persäuren (Kramer *et al.*, 2008). Die schnell einsetzende und hohe antimikrobielle Wirkung entsteht durch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Essigsäure, wodurch anorganische und organische Verbindungen, wie Phenole, Aldehyde, Ketone sowie Disulfite und Sulfhydrylgruppen, oxidiert werden (Fux und Sexl, 2016; Kramer *et al.*, 2008; Sprössig, 1989). Darüber hinaus kommt es zu molekularen Veränderungen an Epitopen und am Genom, die die Infektiosität einschränken (Jursch *et al.*, 2002). Viren werden bereits bei Konzentrationen von 0,0001 % bis 0,01 % inaktiviert (Flemming, 1984). Bei unbehüllten Viren werden vorwiegend Kapsidproteine oxidiert, wohingegen bei behüllten Viren Glykoproteine angegriffen werden (Rheinbaben und Wolff, 2002a). Dabei ist PES in der Lage Enzyme, wie Katalase oder Peroxidase, zu inaktivieren und wird dabei selbst nur sehr langsam zersetzt (Flemming, 1984; Jones und Middlemiss, 1972). Verwendet wird diese für die Desinfektion von Flächen, Wäsche, Instrumenten oder in der Lebensmittelindustrie (Schubert, 2016d). Eine Resistenz von Mikroorganismen gegenüber PES wurde bislang noch nicht festgestellt (Flemming, 1984).

Desinfektionsmittel	Reaktionsgeschwindigkeit	optimaler pH-Bereich									Wirkungsspektrum						Beeinflussung durch das Milieu			
											Bakterien			Pilze						
											gram-pos.		gram-negative	Hefen		Schimmelpilze		Viren		
											Sporen	vegetative Formen		Mykobakterien						
2 3 4 5 6 7 8 9 10																				
Peressigsäure	S	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Chlor (Na-Hypochlorit)	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Chlorabspalter	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Jod	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Formaldehyd	L			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Formaldehyd-abspalter	LL			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Glutaraldehyd	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Phenol und Derivate	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	gering
Alkohole*	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	gering
quartäre Verbindungen	L			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
Guanidine	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark
amphotere Verbindungen	L			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	mäßig
Organische Säuren	S			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	stark

S = schnell wirksam, L = langsam wirksam, LL = sehr langsam wirksam

\* Alkohole sind nach BiozidV für den Veterinärbereich bei Drucklegung nicht zugelassen.

Abbildung 3: Wirkungsspektrum von Desinfektionsmitteln (Richtlinie über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei bestimmten Tierseuchen, 2023)

Die Wirkung von PES ist weitgehend temperaturunabhängig (Schubert, 2016d; Sprössig, 1989). Ebenfalls spielt der pH-Wert nur eine untergeordnete Rolle. Sowohl im sauren als auch im alkalischen Bereich zeigt PES eine antimikrobielle Wirkung, wobei sie im alkalischen Bereich schneller zerfällt (Abb. 3). Die verdünnte Lösung zersetzt sich innerhalb von 24 h durch hydrolytische Spaltung in Essigsäure und Wasserstoffperoxid. Letztere baut sich weiter ab in Wasser und Sauerstoff. Somit gilt PES als ein sehr umweltverträgliches DM (Kramer *et al.*, 2008; Rheinbaben und Wolff, 2002a; Schubert, 2016d; Sprössig, 1989). Vorteilhaft ist ebenso, dass es sich bei PES nicht um ein Allergen handelt (Sprössig, 1989). Da nur geringe Anwendungskonzentrationen nötig sind und der Preis relativ niedrig ist, erweist sich PES darüber hinaus als ein wirtschaftlich positives DM (Sprössig, 1989).

Nachteilig ist dagegen das Auftreten von Korrosionen auf Eisen, Kupfer, Messing und Zink bei der Verwendung höherer Konzentrationen (Flemming, 1984; Mücke, 1970; Schubert, 2016d). Bei Mensch und Tier wirkt PES toxisch. Dämpfe mit einem PES-Gehalt von  $\geq 1\%$  führen zu Reizungen der Augenschleimhaut und Tränenfluss. In Tierexperimenten kam es zur Vermehrung der Erythrozyten und Granulozyten, was auf eine Lungenschädigung mit Verschlechterung des  $O_2/CO_2$ -Verhältnisses zurückzuführen ist (Flemming, 1984).

## 2.4 Ultraviolett C (UV C)-Strahlung

Das ultraviolette Licht befindet sich im elektromagnetischen Spektrum nahe dem sichtbaren Licht und erstreckt sich über einen Wellenlängenbereich von 280-400 nm (Bodenschatz, 2006b; Perdiz *et al.*, 2000). Es ist unterteilt in UV A, UV B und UV C (Bodenschatz, 2006b). UV-Licht ist in der Lage, Lichtquanten zu emittieren und dadurch eine Instabilität innerhalb der Bindung von Molekülen zu erzeugen, was zu einer desinfizierenden Wirkung führt (Rheinbaben und Wolff, 2002b). Der vor allem für die Virusinaktivierung relevante Bereich des UV C-Spektrums liegt zwischen 230-280 nm (Rheinbaben und Wolff, 2002b). In diesem Bereich kommt es zu Absorptionen durch Proteine und Nucleinsäuren (Rheinbaben und Wolff, 2002b). Abbildung 4 stellt das Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren bei 260 nm dar, was die höchste Wirksamkeit der Inaktivierung zeigt (Rheinbaben F., 2006; Schubert, 2016e). Dem gegenüber absorbieren Peptide sowie Proteine zwischen 185-240 nm und aromatische Aminosäuren bei 280 nm UV-Strahlung (Rager, 2013; Rosenheck und Doty, 1961).

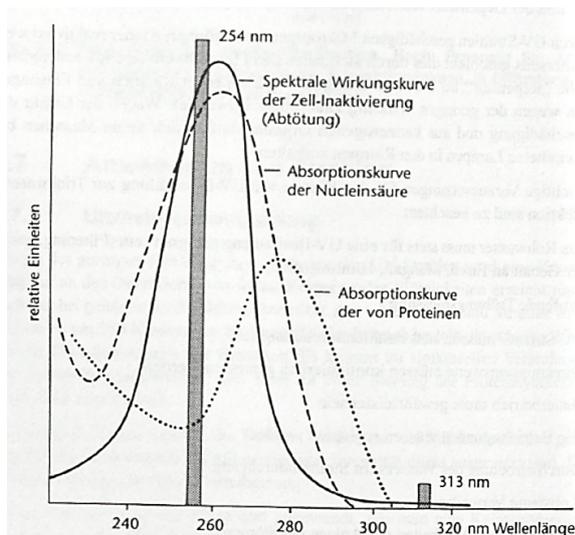


Abbildung 4: Spektrale Wirkungskurve der Zellinaktivierung und Absorptionskurve der Nucleinsäure (Schubert, 2016e)

Rheinbaben und Wolff (2002c) beschreiben den Effekt von UV-Licht durch unterschiedliche Wirkungsweisen. So werden zum einen Proteine beschädigt, indem Protein-Protein-Verbindungen sich zu Kapsomer-Di- oder Polymeren umwandeln. Zusätzlich kann es auch zur Zerstörung von Protein-Protein-Verbindungen kommen, die zu Perforationen im Kapsid führen können. Darüber hinaus kann auch die Nukleinsäure angegriffen werden. Dabei können sich einzelne Basen verändern oder es kann zu Quervernetzungen von Nukleinsäuren kommen, wodurch Strangbrüche entstehen. Ebenso können irreversible Verbindungen zwischen Kapsid und Nukleinsäure auftreten und zur Fragmentierung jener führen (Rheinbaben und Wolff, 2002c).

Auch der Virusaufbau spielt eine Rolle hinsichtlich der Inaktivierungseffizienz. So können Viren mit einzelsträngiger Nukleinsäure schneller inaktiviert werden als Viren mit doppelsträngiger Nukleinsäure (Rheinbaben und Wolff, 2002c). Das Gleiche trifft auch auf die komplexen und behüllten Viren zu, welche eine höhere Empfindlichkeit aufweisen (Kramer *et al.*, 2008). Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Material, in dem sich der Erreger befindet. Hier spielen Schichtdicke, Eindringtiefe oder mögliche Begleitproteine eine wichtige Rolle. Viren, die von einem Medium mit einer geringen Schichtdicke umgeben sind, werden dabei schneller inaktiviert. Auch die Art des Mediums ist entscheidend. Beispielweise zeigt UV-Licht bei einer Eindringtiefe von 11 cm in destilliertem Wasser einen Wirksamkeitsverlust von lediglich 9 %. Im Gegensatz dazu kommt es zu 50 % Wirksamkeitsverlust bei unverdünntem Serum mit einer Eindringtiefe von 0,0063 mm. Das bedeutet, je reiner das Medium ist und je weniger Begleitsubstanzen darin gelöst sind, desto höher ist die Eindringtiefe und die biozide Wirksamkeit der UV-Strahlung (Rheinbaben und Wolff, 2002c).

In Abbildung 5 sind die verschiedenen Aspekte dargestellt, die die biozide Effizienz der UV-Bestrahlung beeinflussen. Als wesentliche Faktoren stehen die Wellenlänge und die Dosis im Vordergrund. Ebenso ist der Virusbau (Hülle, Nukleinsäuren, Kapsidproteine) eine wichtige Einflussvariable hinsichtlich des Bestrahlungserfolges. Neben dem eingesetzten Strahler und den Testorganismen sind die Umgebungsfaktoren auch von entscheidender Bedeutung. Hierbei kommt es auf die Art des Trägermaterials, die Absorptionseigenschaften von Begleitsubstanzen (z.B. Medium oder Belastungssubstanzen) oder die Präsenz von stabilisierend wirkenden Substanzen an (Kramer *et al.*, 2008; Schubert, 2016e).

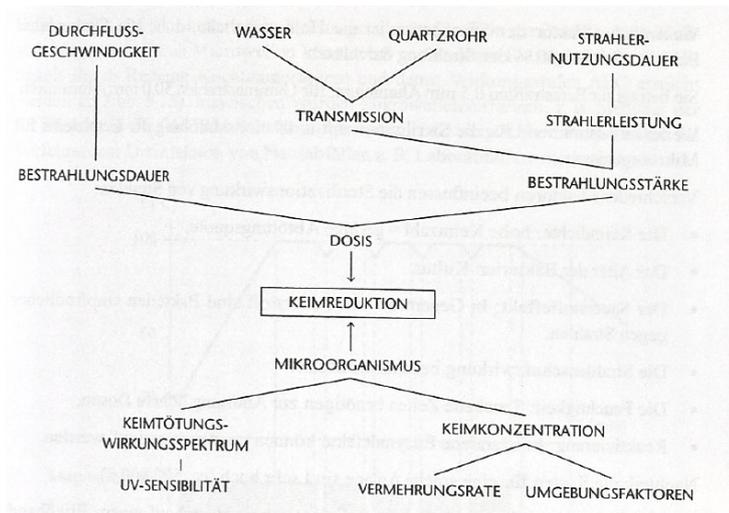


Abbildung 5: Einflussfaktoren bei der UV-Desinfektion (Schubert, 2016e)

Die Desinfektion durch UV-Strahlung wird vor allem bei der Herstellung von Impfstoffen, von Blutprodukten, zur Aufbereitung von Trinkwasser oder in Klimaanlage bzw. Abwasseranlagen genutzt (Rheinbaben und Wolff, 2002b; Schubert, 2016e). UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 233 nm wird darüber hinaus auch für die Bestrahlung von Haut in der Dermatologie eingesetzt. Dabei können bei einer Bestrahlungsdosis von 40 mJ/cm<sup>2</sup> MRSA- und MSSA-Erreger um  $\geq 5 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml reduziert werden, ohne dass dermatopathologische Befunde erhoben werden (Zwicker *et al.*, 2022). Dies spielt vor allem bei bakteriellen Infektionen im Nasen-Rachen-Raum oder in Hautwunden eine große Rolle (Zwicker *et al.*, 2022).

## 2.5 Plasmastrahlung

Bei der verwendeten Plasmastrahlung handelt es sich um kaltes physikalisches Plasma (Cold Atmospheric Pressure Plasma, CAP), welches durch Medizinprodukte erzeugt wird. Durch Stromzufuhr werden manche Gase angeregt und ionisiert. Die angeregten Gase können über Wechselwirkungen sowohl miteinander als auch mit angrenzenden Medien reagieren, wobei reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS und RNS), Elektronen, elektrische Felder, sichtbares Licht, UV-Licht und Wärme entstehen. Da bei der Bildung des Plasmas nur so viel Energie zugeführt wird, dass lediglich ein Teilchen aus 10<sup>9</sup> ionisiert wird, hat das entstandene Kaltplasma eine Maximaltemperatur von 40°C und zählt somit noch zu den Niedertemperaturplasmen (Deutsche Gesellschaft für Mundchirurgie; Kieferchirurgie und Gesichtschirurgie (DGMKG), 2022; Karrer und Arndt, 2015; Weiss *et al.*, 2017). In der Literatur unterscheidet man bei der Erzeugung von Kaltplasma zwischen direktem und indirektem Plasma sowie einer Hybridform aus beidem (Wiegand und Elsner, 2017). Bei der direkten Form wird Plasma zwischen einer dielektrischen Barrierschicht an der Elektrode und der

biologischen Probe aufgebaut, wodurch das Plasma direkt in Kontakt mit der Probe tritt (Abb. 6). Als häufig genutzte Form des direkten Plasmas wird die dielektrische Barriereentladung (DBD, Dielectric Barrier Discharge) eingesetzt, welche in der Lage ist, Plasma direkt in der Luft zu erzeugen, ohne ein Trägergas (z.B. Helium oder Argon) verwenden zu müssen (Weiss *et al.*, 2017; Wiegand und Elsner, 2017). Dieses Verfahren generiert eine starke Plasmaentladung und eine breite Kontaktfläche. Als limitierender Faktor der Plasmaentladung ist dabei der elektrische Strom zu nennen, der lediglich so stark sein darf, dass keine Hitze entsteht (Gay-Mimbrera *et al.*, 2016; Mai-Prochnow *et al.*, 2014; Wiegand und Elsner, 2017). Demgegenüber steht das indirekte System, bei dem Plasma in einem Hohlraum zwischen zwei Elektroden erzeugt wird (Abb. 6). Die reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies werden mit dem Gasstrom als „Plasmajet“ transportiert, wodurch es keinen direkten Kontakt zwischen Plasma und Oberfläche gibt, sondern nur einen Kontakt der aktiven Spezies mit der zu behandelnden Oberfläche (Wiegand und Elsner, 2017).

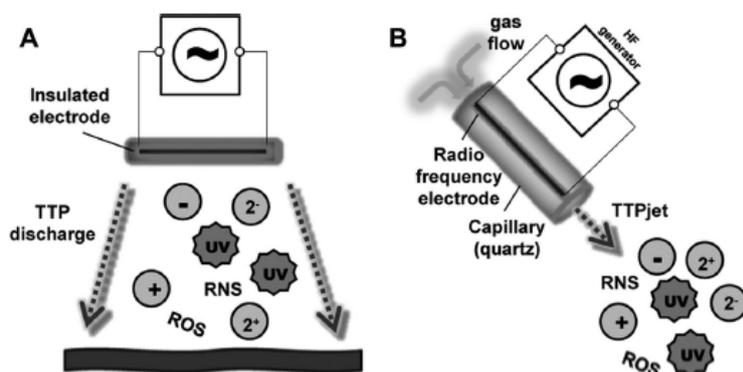


Abbildung 6: Unterschied zwischen direktem Plasma (links) und indirektem Plasma (rechts) (Weiss *et al.*, 2017)

Die Kombination als „Hybrid“-Plasma oder auch Oberflächenentladung (SMD, Surface Micro-Discharge) macht sich die Vorteile aus beiden Formen zunutze (Tab. 3). Dabei wird die Plasmaentstehung von der direkten Form abgeleitet, bei der durch die eingebaute geerdete maschendrahtförmige Elektrode der elektrische Widerstand im Vergleich zum Gewebe deutlich verringert wird (Wiegand und Elsner, 2017). Da der Strom sich den Weg des geringsten Widerstands sucht, fließt dieser durch das Drahtgeflecht und nicht durch die Probe. Sowohl beim indirekten Plasma als auch beim „Hybrid“-Plasma fließt somit kein Strom durch die Probe bzw. den behandelten Körper (Gay-Mimbrera *et al.*, 2016; Wiegand und Elsner, 2017).

Tabelle 3: Vergleich direktes Plasma, indirektes Plasma und „Hybrid“-Plasma (Wiegand und Elsner, 2017)

	Direktes Plasma	Indirektes Plasma	„Hybrid“-Plasma
technische Beispiele	Dielektrische Berriereentladung (DBD)	Plasmanadel, Plasmajet	Stille Koronarentladung
Herstellung und Merkmale	Haut oder Gewebe dienen als Elektrode, Strom fließt durch den Körper	Plasmaproduktion zwischen zwei Elektroden, Transport über den Gasstrom zur Probe	Herstellung ähnlich der direkten Plasmen mit Merkmalen der indirekten Plasmen. Da als Gegenelektrode ein Drahtnetz mit geringem elektrischen Widerstand verwendet wird, fließt kein Strom durch den Körper.
Gas	Luft	Edelgase/ Luft	Luft
Abstand zwischen Gerät und Probe	~ mm	~ mm – cm	~ mm
reaktive Spezies	Produktion im Plasma	Produktion durch Mischung von Plasma und Luft	hauptsächlich Produktion im Plasma
UV Strahlung	relativ schwach	relativ stark	relativ schwach
Gastemperatur	~ Raumtemperatur	heiß am Produktionsort	~ Raumtemperatur
Plasmadichte an der Probe	hoch	niedrig	relativ hoch

Die Behandlung mit Kaltplasma ist kontakt- und schmerzfrei. Sie ist rein physikalisch und setzt keine Allergene frei (Heinlin *et al.*, 2011; Heinlin *et al.*, 2013). Die Anwendung von kaltem atmosphärischen Plasma wirkt gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen und führte bislang noch nicht zu einer Resistenzentwicklung (Daeschlein *et al.*, 2012; Karrer und Arndt, 2015; Maisch *et al.*, 2012). Plasma ist in der Lage, Biofilme zu inaktivieren sowie Bakterien, deren Sporen und auch antibiotikaresistente Mikroorganismen abzutöten (Hähnel *et al.*, 2010; Maisch *et al.*, 2012). Des Weiteren können Viren und Bakteriophagen ebenso inaktiviert werden (Bunz *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020; Filipic *et al.*, 2020). Auch eine Behandlung von bereits virusinfiziertem Gewebe ist mittels CAP möglich (Weiss *et al.*, 2017). Die biozide Wirkung des Plasmas wird unterschiedlich erklärt. Durch das Auftreten von ROS und RNS entstehen sowohl Membran- als auch DNA-Schäden (Sharma *et al.*, 2009). Zusätzlich können Proteine und Enzyme denaturiert und somit inaktiviert werden. Mittels UV-Strahlung entstehen Photoschäden, die ebenfalls die RNA bzw. DNA zerstören können (Rheinbaben F., 2006). In den letzten 10 Jahren erschienen immer mehr CE-zertifizierte Plasmageräte als Medizinprodukte auf den Markt. Oft liegen allerdings keine *in vitro*- und *in vivo*-Studien vor, die die Sicherheit und Inaktivierungseffizienz des Strahlers belegen (Karrer und Arndt, 2015).

### 3 Material

#### 3.1 Technische Geräte und Materialien

Tabelle 4: Gerät/ Material

Gerät/ Material	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Abzug Secuflow	Waldner (Wangen, Deutschland)
Brutschrank BBD 6220 Brutschrank Sanyo MCO-19AIC	Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finnland) Marshall Scientific (Hampton, Vereinigte Staaten von Amerika)
Deckgläschen 24 mm x 24 mm	Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finnland)
Einmalpinzette (Plastik)	Vivomed GmbH (Geislingen, Deutschland)
Einmalpipetten Corning® Costar® Stripette® serological pipettes plastic (5 ml/ 10 ml/ 25 ml/ 50 ml)	Corning Incorporated (New York, Vereinigte Staaten von Amerika)
Einmalspritze Braun Omnifix® Luer Lock 20 ml	B. Braun SE (Melsungen, Deutschland)
Erlenmeyerkolben (500 ml)	Marienfeld Superior (Lauda – Königshofen, Deutschland)
Gefrierschrank (-20°C) Liebherr CNP 4013	Liebherr (Bulle, Deutschland)
Gefrierschrank (-80°C) Ultra Low temperature freezer Innova C760	New Brunswick Scientific (Nürtingen, Deutschland)
Glaspipetten (5 ml/ 10 ml)	Marienfeld Superior (Lauda – Königshofen, Deutschland)

Handschuhe ecoShield™, Eco Nitrile PF 250, Category III	Shield Scientific (Bennekom, Niederlande)
Handzähler	infactory (Buggingen, Deutschland)
Inversmikroskop Nikon Eclipse TS 100	Nikon (Tokio, Japan)
Keimträger Glas, Edelstahl, PVC KömaDur® ES (15 x 15 mm/ 16 x 60 mm)	GK Formblech GmbH (Berlin, Deutschland).
Kompressor Gentilin C330/03	Gentilin (Trissino, Italien),
Kryo-Röhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Kühlschrank Liebherr CNP 4013	Liebherr (Bulle, Deutschland)
Laborwecker	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnetrührer MR Hei-Standard	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnetrührstäbchen	Brand (Wertheim, Deutschland)
Mehrkanalpipette Transferpipette ® S Brand	Brand (Wertheim, Deutschland)
Mikropipetten (10 µl/ 100 µl/ 200 µl/ 1000 µl)	Eppendorf Reference (Hamburg, Deutschland)
Mikroskopkamera Nikon Digital Sight DS – L3	Nikon (Tokio, Japan)
Mini Dry Fog-Gerät	MAR COR (Heerlen, Niederlande)
Neubauer-Zählkammer (0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>3</sup> )	Laboroptik (Lancing, Groß Britannien)

Petrischale, quadratisch, 120 x 120 x 17 mm (Plastik)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Petrischalen, rund 92 x 16 mm (Plastik)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen SafeSeal Tips Professional 1250 µl Filterspitze, 0-100 µl, 0-200 µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland) nerbe plus GmbH & Co. KG (Winsen/ Luhe, Deutschland)
Pipettierhilfe Eppendorf Easypet 3	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Plasmagerät Plasmacare ®	Terraplasma medical GmbH (Garching, Deutschland)
Plattenreader Tecan Infinite M200 Pro	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Reaktionsgefäße (1,5 ml/ 2 ml) Eppendorf Tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Scott Proflow 2SC	Scott Safety (Skelmersdale, Vereinigtes Königreich)
Sicherheitswerkbank Berner-MaxPro2-130	Berner International GmbH (Elmshorn, Deutschland)
Spatel (T-Form)	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Spritzenfilter Merck Millex™ 0,22 µm/ 0,45 µm	Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finnland)
Temperatur- und Feuchtemessgerät testo 635	Testo SE & Co. KGaA (Titisee-Neustadt, Deutschland)

Tesa Power-Strip	Tesa (Norderstedt, Deutschland)
Umlaufkühler Minichiller 280 OLÉ	Peter Huber Kältemaschinenbau SE (Offenburg, Deutschland)
UV C-LED-Strahler (233 nm, 270 nm)	sflux GmbH (Berlin, Deutschland)
UV C-Quecksilber-Strahler (254 nm)	sflux GmbH (Berlin, Deutschland)
UV C-Sensor	sflux GmbH (Berlin, Deutschland)
Vakuumpumpe Vacuubrand BVC 21	VACUUBRAND GMBH + CO KG (Wertheim, Deutschland)
Wasserbad Dinkelberg Minitherm 2	Dinkelberg analytics (Gablingen, Deutschland)
Zellkultureinsatz Millicell 12 mm, Polykarbonat, 0,4 µm	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Zellkulturflasche (75 cm <sup>2</sup> / 175 cm <sup>2</sup> ) sealed cap	Corning Incorporated (New York, Vereinigte Staaten von Amerika)
Zellkulturflasche (75 cm <sup>2</sup> ) vented cap	Corning Incorporated (New York, Vereinigte Staaten von Amerika)
Zellkulturplatten (6/ 12/ 24/ 96-Wells bzw. Kavitäten, Flachboden) Costar®	Corning Incorporated (New York, Vereinigte Staaten von Amerika)
Zellkulturplatten (96-Wells bzw. Kavitäten, Rundboden)	Greiner Bio-One Cellstar ® (Frickenhausen, Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen (15 ml/ 50 ml-Röhrchen)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland) / Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
---	--

### 3.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien / Reagenzien	Hersteller bzw. Bezugsquelle
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Decon™ 90	Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finnland)
DermaLife Medium	CellSystems GmbH (Troisdorf, Deutschland)
Difco™ Agar	Becton, Dickinson and Company (New Jersey, Vereinigte Staaten von Amerika)
DMEM/ F12	c.c. pro GmbH, Gesellschaft für Herstellung und Vertrieb von Produkten für Cellculturen mbH (Oberdorla, Deutschland)
Dulbecco's PBS	c.c. pro GmbH, Gesellschaft für Herstellung und Vertrieb von Produkten für Cellculturen mbH (Oberdorla, Deutschland)
Ethanol (vergällt, 96 %)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
fetales Kälberserum (FKS)	Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)
HKGS	Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finnland)

Isopropanol/ 2-Propanol	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
LB-Medium (Luria/Miller)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lerasept® Spezial	Stockmeier Chemie GmbH & Co.KG (Bielefeld, Deutschland)
L-Glutamin (200 mM)	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Gentamycinsulfat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B	Gibco™ Life Technologies (Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Thiazolylblau Tetrazoliumbromid	Thermo Fisher Scientific (Vantaa, Finnland)
Tris-Hydrochlorid	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Trypanblau 0,4 %	Gibco™ Life Technologies (Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika)

## 3.3 Nährmedien und Rezepte

Tabelle 6: Nährmedien und Rezepte

Medium	Zusammensetzung
3D-Medium A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 485 ml DermaLife Medium</li> <li>- 5 ml HKGS</li> <li>- 250 µl Gentamycin</li> <li>- 5 ml Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
3D-Medium B	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 100 ml Medium A</li> <li>- 90 µl 1 M Calciumchlorid-Lösung</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
3D-Zellkulturmedium (Zellerhaltung)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 500 ml DMEM/ F12</li> <li>- 5 ml 200 mM L-Glutamin</li> <li>- 50 ml FKS</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
LB-Agar	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 g LB Medium</li> <li>- 15 g Difco™ Agar</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen bei 80°C</li> </ul>
LB-Medium	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 g LB Medium</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>

LB-Weichagar	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 25 g LB Medium</li> <li>- 8 g Difco™ Agar</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen bei 80°C</li> </ul>
MTT-Gebrauchslösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- MTT-Stammlösung 1:10 in 3D-Zellkulturmedium verdünnen</li> </ul>
MTT-Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 150 mg Thiazolylblau Tetrazoliumbromid</li> <li>- 30 ml PBS</li> <li>- Lagerung bei -20°C</li> </ul>
MTT-Solubilisierungslösung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 96 ml Isopropanol</li> <li>- 4 ml Salzsäure</li> <li>- Lagerung in Dunkelheit bei RT</li> </ul>
SM-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 5,8 g Natriumchlorid</li> <li>- 2,0 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat</li> <li>- 50 ml 1 M Tris Salzsäure</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
Trypsin (ATV-D)	<p>Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 8,5 g Natriumchlorid</li> <li>- 0,4 g Kaliumchlorid</li> <li>- 1,0 g Dextrose</li> <li>- 0,58 g Natriumhydrogencarbonat</li> <li>- 1,0 g Trypsin 1:250</li> <li>- 0,2 g EDTA</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- pH 7,2</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
ZB 5d	<p>Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5,32 g MEM Eagle (Hank's Salze)</li> <li>- 4,76 g MEM (Earles' Salze)</li> <li>- 1,25 g Natriumhydrogencarbonat</li> <li>- 10 ml nichtessentielle Aminosäuren (NEA, 100x)</li> <li>- 120 mg Natriumpyruvat</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- pH 7,2</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
ZB 12d	<p>Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3,5 g Leibovitz's L-15 Medium</li> <li>- 2,7 g Laktalbuminhydrolysat</li> <li>- 1,26 g Natriumhydrogencarbonat</li> <li>- 37,5 ml Hanks A – Stammlösung</li> <li>- 37,5 ml Hanks B – Stammlösung</li> <li>- 0,4 % Phenolrot</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- pH 7,1</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
ZB 21d	<p>Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 10,63 g MEM Eagle (Hank's Salze)</li> <li>- 0,85 g Natriumhydrogencarbonat</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- pH 7,2</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>
ZB 28d	<p>Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 5,32 g F-12</li> <li>- 8,80 g IMDM</li> <li>- 2,45 g Natriumhydrogencarbonat</li> <li>- auf 1 l A. dest auffüllen</li> <li>- pH 7,1</li> <li>- Lagerung für max. 4 Wochen im Kühlschrank</li> </ul>

### 3.4 Zellen und Wirtserreger

Tabelle 7: Zellen und Zelllinien

Zelllinie	Medium zum Erhalt der Zellen	Umsatzhäufigkeit und Umsatzverhältnis	benötigte Zellzahl für das Aussäen (Zellen/ml)
RAW 264.7, Maus, <i>Mus musculus</i> Ascites CCLV-RIE 0996	ZB 5 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:4	$1,66 \times 10^6$
KE-R, Hauskatze, <i>Felis catus</i> Fetus CCLV-RIE 0138	ZB 21 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:4	$3,75 \times 10^5$
BHM, westliche grüne Meerkatze, <i>Chlorocebus sabaues</i>	ZB 28 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:4	$5,00 \times 10^5$

Niere CCLV-RIE 0136			
A549, Mensch, <i>Homo sapiens</i> Lunge CCLV-RIE 1035	ZB 28 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:3	7,50 x 10 <sup>5</sup>
ST, Hausschwein, <i>Sus scrofa domestica</i> Hoden CCLV-RIE 0606	ZB 28 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:4	3,70 x 10 <sup>5</sup>
<i>Escherichia coli</i> Lederberg W1485	LB-Medium	-	-
CRFK, Hauskatze, <i>Felis catus</i> Niere CCLV-RIE 0115	ZB 5 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:4	2,75 x 10 <sup>5</sup>
PT, Hausschaf, <i>Ovis orientalis aries</i> CCLV-RIE 0011	ZB 5 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:6	3,00 x 10 <sup>5</sup>
Vero E6, westliche grüne Meerkatze, <i>Chlorocebus sabaues</i> RVB 0929	ZB 5 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:4	3,50 x 10 <sup>5</sup>
KOP-R, Hausrind, <i>Bos primigenius taurus</i> Oesophagus, Pharynx CCLV-RIE 0244	ZB 21 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:2	1,30 x 10 <sup>5</sup>

BHK-21, Goldhamster, <i>Mesocricetus auratus</i> Niere CCLV-RIE 0179	ZB 5 + 10 % FKS	2 x wöchentlich 1:6	1,85 x 10 <sup>5</sup>
TR146, Mensch, <i>Homo sapiens</i> bukale Keratinozyten eines spinozellulären Karzinomes	DMEM + 10 % FKS + 5 ml L-Glutamin	2 x wöchentlich 1:3	2,70 x 10 <sup>5</sup> (2D – Kultur) 1,00 x 10 <sup>6</sup> (3D – Kultur)

*Escherichia coli* (DSM-Nummer: 5695) wurde vom Leibniz Institut, DSMZ GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Zelllinie TR146 wurde durch die Universitätsmedizin Greifswald, Institut für Hygiene und Umweltmedizin, Labor für Biokompatibilitätstestung und Pathogeninaktivierung zur Verfügung gestellt (Greifswald, Deutschland).

Die weiteren Zelllinien stammen aus der Riemser Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland).

### 3.5 Testviren

Tabelle 8: Viruseigenschaften

Virus	Eigenschaften	Zelllinie/ Wirt	Anzuchtmedium und Anzuchtverdünnung	Titer (log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml) und Ablesetag (dpi)
Murines Norovirus 1 (MNV) Norwalk Virus Stamm "S99" RVB 0651	Caliciviridae unbehüllt ss RNA 35-40 nm 7,4-8,3 kb (King <i>et al.</i> , 2011a)	RAW 264.7	ZB 5 + 2 % FKS 1:10	9,25±0,18 5 dpi

## Material

Felines Calicivirus (FCV) Stamm "F-9" RVB 0208	Caliciviridae unbehüllt ss RNA 35-40 nm 7,4-8,3 kb (King <i>et al.</i> , 2011a)	KE-R	ZB 21 + 2 % FKS 1:10	8,63±0,27 4 dpi
Humanes Poliovirus Typ 1 (HPV-1) Sabin, Enterovirus C, Stamm "LSc-2ab" RVB 1260	Picornaviridae unbehüllt ss RNA 30 nm 7-8,8 kb (King <i>et al.</i> , 2011b)	BHM	ZB 28 + 2 % FKS 1:10	6,47±0,17 4 dpi
Human adenovirus 5 (HAdV-5) Stamm "Adenovirus Type 5 Reference Material" ATCC VR-1516	Adenoviridae unbehüllt ds DNA 70-90 nm 26,2-48,4 kb (King <i>et al.</i> , 2011c)	A549	ZB 28 + 2 % FKS 1:10	7,58±0,15 7 dpi
Mammalian Orthoreovirus 1 (ORV-1) Stamm "Erik" RVB 0391	Reoviridae unbehüllt ds RNA 48 nm 23 kb (King <i>et al.</i> , 2011d)	ST	ZB 28 + 2 % FKS 1:10	7,69±0,18 6 dpi
Emesvirus zinderi MS 2	Fiersviridae unbehüllt ss RNA 25 nm 3,57 kb (DSMZ, 2023)	<i>E. coli</i>	LB-Medium	8,47±0,17 1 dpi

Felines Coronavirus (FCoV) Stamm "München" RVB 1259	Coronaviridae behüllt ss RNA Alphacoronavirus 120-160 nm 26,4-31,7 kb (King <i>et al.</i> , 2011e)	CRFK	ZB 5 + 2 % FKS 1:10	7,47±0,27 4 dpi
Bovines Coronavirus (BCoV) Stamm "Nebraska" RVB 0003	Coronaviridae behüllt ss RNA Betacoronavirus 120-160 nm 26,4-31,7 kb (King <i>et al.</i> , 2011e; Zhu <i>et al.</i> , 2022)	PT	ZB 5 + 2 % FKS 1:10	7,47±0,21 4 dpi
Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS CoV-2) Stamm "BavPat1/2020"	Coronaviridae behüllt ss RNA Betacoronavirus 120-160 nm 26,4-31,7 kb (King <i>et al.</i> , 2011e; Zhu <i>et al.</i> , 2022)	Vero E6	ZB 5 + 2 % FKS 1:10	6,63±0,17 7 dpi
Vesiculovirus indiana (VSIV) RVB 0030	Rhabdoviridae behüllt ss RNA 45-100 nm Durchmesser 100-430 nm Länge 11-15 kb (King <i>et al.</i> , 2011f)	KOP-R	ZB 21 + 2 % FKS 1:50	7,51±0,16 4 dpi

modifiziertes Vaccinia Ankara Virus (MVA) RVB 1332	Poxviridae behüllt ds DNA 450 nm 178 kb (Antoine <i>et al.</i> , 1998; Granicher <i>et al.</i> , 2021)	BHK-21	ZB 5 + 2 % FKS 1:10	7,02±0,15 4 dpi
Varicellovirus suidalpha 1 (SuHV-1) Stamm "Kaplan" RVB 0574	Herpesviridae Alphaherpesvirinae behüllt ds DNA 200 nm 123kb (Mettenleiter <i>et al.</i> , 2019)	ST	ZB 28 + 2 % FKS 1:10	7,30±0,22 4 dpi

Das SARS CoV-2 wurde vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (AG Prof. Dr. med. Roman Wölfel) zur Verfügung gestellt. Das Human adenovirus 5 (HAdV-5) wurde von The Global Bioresource Center | ATCC – VR-5™ bezogen. Der Bakteriophage Emesvirus zinderi (DSM-Nummer: 13767) stammt aus dem Leibniz Institut, DSMZ GmbH (Braunschweig, Deutschland). Die weiteren Erreger kamen aus der Riemser Virusbank (RVB) des Friedrich-Loeffler-Instituts (Greifswald-Insel Riems, Deutschland).

### 3.6 Keimträger

Bei den Keimträgerversuchen wurden verschiedene nicht-poröse Oberflächen getestet, u.a. Edelstahl, Glas und PVC.

Bei den Edelstahlkeimträgern handelt es sich um nicht rostenden Stahl der Werkstoffnummer 1.4301 (EN 10088-1). Die Keimträger weisen dabei eine Oberflächenbeschaffenheit von 2B (EN 10088-2) und eine Dicke von 1,2-1,5 mm auf (CEN, 2019).

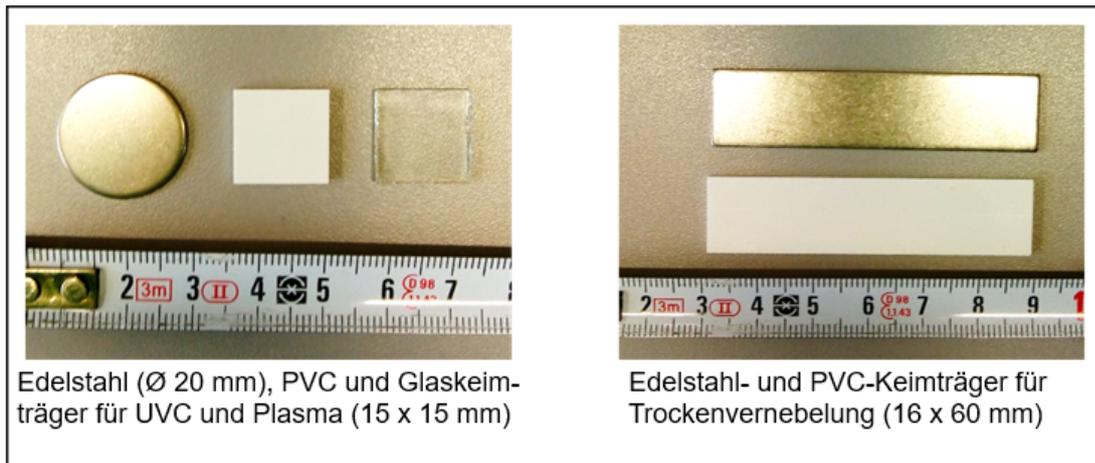


Abbildung 7: Keimträger (Edelstahl, PVC und Glas)

## 4 Methoden

Alle nachfolgend beschriebenen Versuche wurden in einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II mit einem Innenraum von 1 m<sup>3</sup> bei einer Raumtemperatur von 20°C ± 2°C durchgeführt.

### 4.1 Zellumsetzung

Die als Kryokonserven vorliegenden Zellkulturen wurden zunächst im Wasserbad aufgetaut. Darauffolgend wurde die Zellsuspension in 5 ml Medium (Tab. 6) aufgenommen und zentrifugiert (340 x g für 10 min). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, die Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und anschließend in einer T75 Zellkulturflasche überführt. Mithilfe des Umkehrmikroskops wurde das Wachstum und die Sterilität der Zelllinie täglich geprüft. Das Passagieren der Zellen erfolgte zwei Mal wöchentlich nach dem Erreichen eines konfluenten einschichtigen Zellrasens. Dabei wurde das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt und der Zellrasen mit einer Trypsinlösung gewaschen. Anschließend wurde die Kultur mit 3-4 ml der Trypsinlösung für bis zu 5 min im Brutschrank (37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde die Enzymreaktion durch Mediumzugabe gestoppt und die Zellsuspension zentrifugiert (340 x g für 10 min). Danach wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. In entsprechendem Verdünnungsverhältnis (Tab. 7) wurden die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt bzw. gezählt und in Mikrotiterplatten ausgesät. Die angelegten Kulturen wurden im Brutschrank (37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) inkubiert und täglich einer mikroskopischen Sterilitäts- und Wachstumskontrolle unterzogen.

## 4.2 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt (1:2 Verdünnung). Bei der Verwendung einer Neubauer-Zählkammer wurde das Deckgläschen auf die beiden Trägerstege aufgelegt, sodass Newtonsche Ringe erschienen. Erst dann war eine definierte Höhe von 0,1 mm vorausgesetzt (Freschney, 2016). Anschließend wurden 10 µl des Ansatzes zwischen Zählkammer und Deckgläschen pipettiert. Die intakten Zellen wurden mäanderförmig in den vier Eckquadraten gezählt. Aus dem ermittelten Wert wurde der Durchschnitt pro Quadrat gebildet und in folgender Formel eingesetzt.

$$\text{Zellkonzentration} \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) = \bar{x} * 10.000 : 2$$

$\bar{x}$  = Durchschnittswert der gezählten Zellen pro Quadrat

2 = Verdünnungsfaktor (10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau)

Als Resultat lag die Zellzahl/ml vor (All Cells®, 2023). Mithilfe des Mischungskreuzes wurde die gewünschte Zellzahl (Tab. 7) berechnet und anschließend ausgesät.

## 4.3 Anlegen einer 3D-Kultur

Als ein Versuchsmodell einer mehrschichtigen und belebten Oberfläche wurde eine 3D-Mundschleimhautkultur aus TR146-Zellen angelegt. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein humanes Plattenepithelkarzinom der bukkalen Mukosa. Dafür wurden die Zellen zunächst als Monolayer vermehrt (4.1 Zellumsetzung). An Tag 0, der als erster Anzuchttag der 3D-Kultur festgelegt wurde, wurden die Monolayerkulturen mit FKS-freiem Medium gewaschen und anschließend trypsinisiert. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (340 x g für 10 min). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 5 ml 3D-Medium A resuspendiert. Die Zellzahl wurde, wie in 4.2 Zellzählung beschrieben, ermittelt und in Inserts (300 µl Aussaat entsprechen 3,00 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml) als Airlift-Kultur ausgesät. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Inserts jeweils mittig in einer 6-Wellplatte platziert. 0,5 ml 3D-Medium A wurden dabei zusätzlich in die Kavitäten gegeben. An Tag 1 wurden sowohl 0,5 ml in die Inserts als auch 1 ml in die Kavitäten des 3D-Mediums A pipettiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt. Dafür wurde mithilfe einer Vakuumpumpe, das Medium aus den Inserts und der Mikrotiterplatte abgesaugt und anschließend mit 0,5 ml pro Insert und 1,5 ml 3D-Medium A pro Kavität ersetzt. An Tag 3 wurde wiederholt der Überstand aus den Inserts und der 6-Wellplatte abgesaugt. Danach wurden die Inserts auf einer sterilen Unterlage für 10 min an der Luft exponiert. Währenddessen wurden 1,5 ml 3D-Medium B in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte überführt

und die Inserts wurden erneut in die Kavitäten gesetzt. Ab diesem Schritt wurde der Mediumwechsel von 1,5 ml 3D-Medium B pro Kavität alle 48 h für 6 Wiederholungsschritte durchgeführt (Tag 5, 7, 9, 11, 13 und 15). An Tag 17 wurden die Kulturen in Experimenten eingesetzt (Zwicker *et al.*, 2023).

#### 4.4 Virusanzucht

Für jedes Virus wurde zunächst die passende Zelllinie etabliert und in regelmäßigen Abständen mit den dazugehörigen Medien passagiert (Tab. 6, 7 und 8).

In einer T75 Zellkulturflasche wurden Zellen entsprechend ihrer benötigten Zellzahl (4.2 Zellzählung und Tab. 7) ausgesät und am folgenden Tag mit Virus infiziert. Dafür wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden mit  $\approx$  4-5 ml FKS-freiem Medium gewaschen. Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Viren wurden zunächst im Wasserbad aufgetaut. Danach wurde die Zellkulturflasche mit 6 ml der jeweiligen Virusverdünnung (Tab. 8) infiziert. Nach 60 min Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) wurden 24 ml Medium mit 2 % FKS hinzugefügt. In den nächsten 24-48 h wurde unter mikroskopischer Kontrolle das Viruswachstum bezüglich des jeweils sichtbaren zytopathischen Effekts beurteilt. Als mögliche Effekte werden morphologische Veränderungen der Zellkultur beschrieben, die durch eine Infektion hervorgerufen wurden. Typische Merkmale sind Zellabkugelungen, Riesenzellbildung, Einschlusskörperchen oder Apoptose (Ziesing *et al.*, 2020). Bei einem cpE von etwa 75 % wurde die Kultur über Nacht bei -80°C eingefroren. Durch das Einfrieren wurden die Zellen zerstört und Virus konnte freigesetzt werden. Darauf folgend wurde die Zellkulturflasche aufgetaut und der Überstand zentrifugiert (340 x *g* für 10 min). Der virushaltige Zellkulturüberstand wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### 4.5 Virustitration

Zunächst wurde in einer 96-Wellplatte, mit Ausnahme der ersten Reihe, jede Vertiefung mit 180  $\mu$ l Medium und 2 % FKS befüllt. Zur nachfolgenden Titerbestimmung wurde ein Virusaliquot aufgetaut und 200  $\mu$ l des Virus in die erste Reihe der 96-Wellplatte als Triplikat pipettiert. Bis zu einer Verdünnungsstufe von 10<sup>-8</sup> (bzw. 10<sup>-6</sup> für den MS 2 Phagen) wurden stets 20  $\mu$ l von einer Reihe in die nächste pipettiert. Dabei wurden nach jedem Übertragungsschritt die Spitzen gewechselt. Eine konfluent bewachsene 96-Wellplatte wurde mit jeweils 100  $\mu$ l FKS-freiem Medium pro Kavität gewaschen. Nachfolgend wurde die bewachsene Platte mit 100  $\mu$ l des Titrationsansatzes beladen. Die Mikrotiterplatte wurde unter täglicher mikroskopischer Kontrolle im Brutschrank (37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) inkubiert.

Der finale Titer wurde abhängig vom Virus nach 3-7 Tagen (Tab. 8) abgelesen und mittels TCID<sub>50</sub>/ml nach Spearman und Kärber bestimmt (Kärber, 1931; Spearman, 1908).

#### 4.6 Vermehrung des MS 2 Bakteriophagen

Für die Vermehrung des MS 2 Phagen wurden 300 µl *E. coli* mit 300 µl MS 2 Phagen-Suspension in einem Reaktionsgefäß für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden drei Zentrifugenröhrchen mit ≈ 7 ml Weichagar befüllt und mit 200 µl der *E. coli*-Phagen-Suspension versetzt. Die Röhrchen wurden kurz geschwenkt und auf drei Agarplatten gegossen. Nach dem Erstarren des Weichagars wurden die Platten über Nacht im Brutschrank (37 °C, 95,0 % rH) inkubiert. Am Folgetag wurde der Agar mit der lysierten Kultur mittels Spatel in einen 500 ml Erlenmeyerkolben überführt. Durch die Zugabe von 30 ml SM Puffer entstand zuerst eine zähe Suspension, die nach 4 stündigem Rühren auf dem Magnetrührer zu einer homogenen flüssigen Kultur wurde. Die flüssige Masse wurde in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (3200 x g für 30 min). Mithilfe einer Spritze wurde der Überstand zunächst durch einen 0,45 µm- und anschließend durch einen 0,22 µm-Zellulosefilter sterilfiltriert. Die Phagensuspension konnte im Kühlschrank für maximal acht Wochen gelagert und in Versuchen eingesetzt werden.

#### 4.7 Vorbereitung der Keimträger

Die Keimträger wurden vor der Bearbeitung zunächst gereinigt und sterilisiert. Dafür wurden sie in 5 % (v/v) Decon 90® für mindestens 60 min bei RT eingelegt und anschließend drei Mal unter fließendem Aqua dest gespült. Nachfolgend wurden sie für mindestens 15 min in 70 % Ethanol eingelegt. Im Anschluss wurden sie erneut drei Mal unter Aqua dest gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Edelstahl- und Glaskeimträger autoklaviert (CEN, 2019) bzw. die PVC-Keimträger steril verpackt. Für die Versuche wurden 50 µl der Virussuspension auf die Keimträger ausgestrichen und für 30 min in der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (MSW) getrocknet (Rabenau *et al.*, 2012).

### *Anlegen der Antrocknungs- und Zytotoxizitätskontrollen*

Parallel zu den Prüfansätzen wurden Antrocknungs- und Zytotoxizitätskontrollen angelegt. Auf jeweils drei Keimträgern pro Versuchslauf wurden 50 µl der Virussuspension aufgetragen, ausgestrichen und in der MSW bis zur vollständigen Trocknung aufbewahrt. Daraufhin wurden diese nicht mit der Desinfektionsmethode behandelt, sondern blieben unbehandelt als Antrocknungskontrolle (ATK) zurück. Nach Abspülen der ATK konnte der Restvirustiter festgestellt werden. ATK wurden bei jedem Versuch mitgeführt, um den Einfluss der Trocknung auf die Infektiosität des Virus festzustellen und um die Berechnung der Reduktion zu ermöglichen (CEN, 2019; Rabenau *et al.*, 2012). Zusätzlich wurden Zytotoxizitätskontrollen (Tox.) angelegt, bei denen anstelle des Virus, 50 µl FKS-freies Medium aufgetragen wurden. Die Zytotoxizitätskontrolle dient der Überprüfung einer möglichen Toxizität der Desinfektionsmethode gegenüber der Zellkultur. Nach der DIN EN 14675:2015-06 für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika ist die Zytotoxizität eine durch das Desinfektionsmittel hervorgerufene morphologische Veränderung und/oder Zerstörung von Zellen oder eine Reduktion ihrer Empfindlichkeit (CEN, 2015). Durch das Mitführen der Kontrolle kann ausgeschlossen werden, dass mögliche Zellschäden als vermeintlich virusspezifischer cpE identifiziert werden (Rabenau *et al.*, 2015).

Belastungssubstanzen (z.B. bovines Serumalbumin oder Hefe) wurden im Versuchsansatz nicht verwendet.

#### 4.8 Trockenvernebelung von Peroxyessigsäure (PES)

Für das Trockenvernebelungsverfahren wurde ein Dry Fog-System verwendet, welches u.a. aus dem Mini Dry Fog-Gerät und einem sich außerhalb der MSW befindlichen Kompressors besteht. Dieser ist über einen Druckluftschlauch mit dem Mini Dry Fog-Gerät verbunden.

Der Prozess wird generell in drei Phasen untergliedert (Schinköthe *et al.*, 2021):

1. Konditionierungsphase (Conditioning phase, CP): Die mit Virus bzw. Medium bestrichenen und getrockneten Keimträger wurden im 90° Winkel zum Dry Fog Gerät an den Werkbankwänden befestigt. Zusätzlich wurden Sensoren zum Messen der relativen Luftfeuchtigkeit und der Temperatur in der MSW positioniert. Während der nachfolgenden Trockenvernebelung blieb die MSW ausgeschaltet. Mithilfe des Kompressors wurde das Desinfektionsmittelgemisch mit 0,3 MPa Überdruck bei einer Luftförderleistung von 70 l/min in dem zu behandelnden Raum ausgebracht. Der Ausgangswert der relativen Luftfeuchtigkeit lag zwischen 50-60 rH %. Anschließend

wurde für 30-40 s PES in unterschiedlichen Konzentrationen vernebelt. Um eine Oberflächenkondensation zu verhindern, wurde die Ausbringung beim Erreichen einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % gestoppt (Schinköthe *et al.*, 2021).

2. Dekontaminationsphase (Incubation phase, IP): Nach Erreichen der 95 % rH startete die Inkubationszeit von 3 h. Fiel in dieser Zeit die Luftfeuchtigkeit auf 85 % rH, wie in Abbildung 8 (grüner Graph) dargestellt, wurde der Kompressor erneut für etwa 10-15 s gestartet, bis die Luftfeuchtigkeit wieder 95 % rH erreicht (Schinköthe *et al.*, 2021).
3. Belüftungsphase (Aeration Phase, AP): Nach 3 h wurde zunächst die Lüftung der Werkbank angeschaltet und für 30 min im Betrieb gelassen, um einen vollständigen Luftaustausch zu bewirken. Da je nach Ausbringvolumen und eingesetzter Konzentration noch PES-Rückstände in der Luft wahrzunehmen waren, war das Tragen eines Atemschutzes notwendig. Im Anschluss konnten die Keimträger und Sensoren zur Auswertung entnommen werden. Die Keimträger wurden, wie in 4.8 Nachbehandlung der Keimträger beschrieben, weiterbearbeitet (Schinköthe *et al.*, 2021).

Als PES-Quelle wurde das gelistete Biozidprodukt Lerasept® Spezial eingesetzt, welches eine aPES-Konzentration von 4,84 % (w/w) beinhaltet (BAuA, 2023b; Stockmeier, 2023). Als Arbeitslösungen wurde Lerasept® Spezial in demineralisiertem Wasser verdünnt und in den Konzentrationen 0,0078 %; 0,0156 %; 0,0313 %; 0,0625 % und 0,125 % eingesetzt.

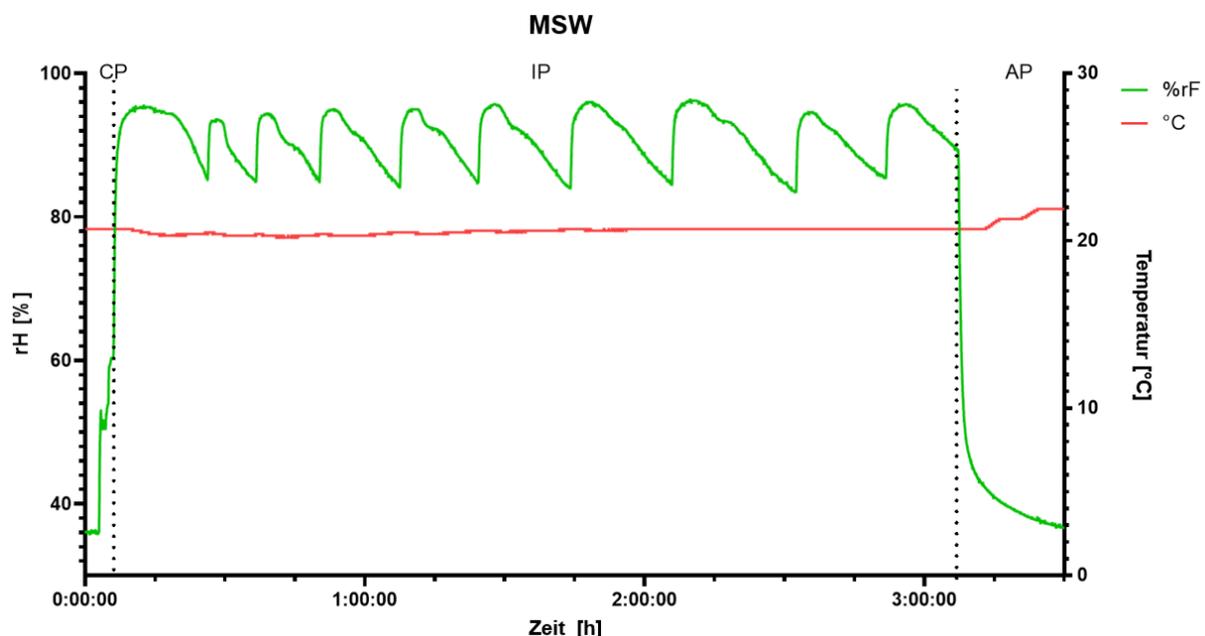


Abbildung 8: Luftfeuchtigkeit [% rH] und Temperatur [°C] während der aPES-Trockenvernebelung

## 4.9 Ultraviolett C (UV C)-Bestrahlung

Zur Untersuchung der viruziden Wirkung von UV C wurden innerhalb des CorsaVir-Projektes von verschiedenen Projektpartnern (Osram Opto Semiconductors GmbH, Deutschland; Ferdinand-Braun-Institut, Deutschland; Technische Universität Berlin, Deutschland; MANN + HUMMEL GmbH, Deutschland; UVphotonics NT GmbH, Deutschland) UV C-LED-Strahler mit einer Wellenlänge von 233 nm bzw. 270 nm entwickelt. Die 270 nm-Strahler liegen nahe dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm. Da LED mit längeren Wellenlängen eine höhere optische Leistung sowie eine längere Lebensdauer als LED mit einer Wellenlänge von 260 nm oder gar 254 nm zeigen, wurden die Untersuchungen bei 270 nm durchgeführt (ams-OSRAM International GmbH, 2023; Gerchman *et al.*, 2020). Darüber hinaus wurde als Positivkontrolle eine Quecksilberlampe mit der Wellenlänge von 254 nm sowie ein UV C-Sensor und mehrere Kühlgeräte für die LED-Strahler eingesetzt.

### 4.9.1 Behandlung von unbelebten Oberflächen

Beim Strahler mit der Wellenlänge von 270 nm wurde als Dimmereinstellung 20 und als emittierende Stärke  $240 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  definiert. Die in den Experimenten festgelegte Maximaldosis betrug  $600 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ . Im Hinblick auf die Bestrahlung mit dem 233 nm-Strahler wurde eine Dimmereinstellung von 50 verwendet, wodurch eine Bestrahlungsstärke von  $110 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  resultierte. Als eingesetzte Maximaldosis wurde eine Strahlungsdosis von  $80 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  gewählt.

Im Rahmen der Vergleichsuntersuchung wurde die Quecksilberlampe zur Bestrahlung der Viren eingesetzt. Diese hatte eine Bestrahlungsstärke von  $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  bei einer Dimmereinstellung von 30. Nach vollständigem Trocknen der mit Virus bzw. Medium bestrichenen Keimträger wurden diese mit einer sterilen Pinzette in einem festgelegten Abstand von 5 cm unter den jeweiligen Strahler platziert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit dem 270 nm-, 254 nm- bzw. 233 nm-Strahler. Die UV-Bestrahlungsdosis ist definiert als die Strahlungsleistung pro Fläche multipliziert mit der Zeit (Calenberg, 2009). Sie wird berechnet als:

$$\text{Dosis} \left( \frac{\text{mJ}}{\text{cm}^2} \right) = \text{Strahlungsleistung} \left( \frac{\text{mW}}{\text{cm}^2} \right) \times \text{Zeit} (s)$$

Nach Umstellung dieser Formel erhält man die benötigte Bestrahlungszeit. Beispiel: Bei den Untersuchungen mit dem 270 nm-Strahler wurde mit einer Bestrahlungsstärke von  $0,24 \text{ mW}/\text{cm}^2$  gearbeitet. Für die gewünschte Dosis von  $600 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  dividiert man die Dosis durch die Stärke und erhält folglich eine Bestrahlungszeit von 2500 s ( $\approx 42 \text{ min}$ ).

Danach wurden die Keimträger weiter, wie in 4.11 Auswertung der unbelebten Oberflächen beschrieben, behandelt.

#### 4.9.1 Behandlung von belebten Oberflächen

Für die UV C-Bestrahlung von belebten Oberflächen wurde eine 2D-Monolayerkultur und ein 3D-Mundschleimhautmodell aus TR146-Zellen angelegt. Als einziges Testvirus zeigte lediglich VSIV einen cpE auf der genannten Zelllinie, weswegen dieses Virus für die Experimente mit belebten Oberflächen in einer 1:10 Verdünnung ( $6,51 \pm 0,16 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) eingesetzt wurde. Zu Beginn wurden die Inserts mit einer Pinzette aus ihren Kavitäten entnommen und auf einer sterilen Unterlage platziert. Etwa 50  $\mu\text{l}$  PBS wurde unter die Inserts gegeben, um eine Austrocknung zu verhindern. Die zu untersuchenden Inserts sowie die Positivkontrolle (PK) wurden mit 50  $\mu\text{l}$  der Virussuspension befüllt, wohingegen die Toxizitätskontrollen und die Negativkontrolle (NK) mit 50  $\mu\text{l}$  PBS beladen wurden. Im Folgenden wurden die Inserts für 60 min im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95,0 % rH) inkubiert. Die Inserts, mit Ausnahme der PK und NK, wurden nach der Inkubationszeit mit dem 233 nm-Strahler für 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 60  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  behandelt und anschließend wieder in ihre Kavitäten zurückgesetzt.

Als Vergleich wurde in einem Vorversuch die TR146-Zelllinie zusätzlich als 2D-Monolayerkultur in einer 24-Wellplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank ( $37,0^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95,0 % rH) inkubiert. Diese wurden am nächsten Tag gewaschen und danach mit 300  $\mu\text{l}$  einer 1:10 Verdünnung des VSIV ( $6,51 \pm 0,16 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) bzw. 300  $\mu\text{l}$  PBS für 60 min im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ , 95,0 % rH) inkubiert. Ähnlich wie bei der 3D-Kultur wurden auch hier PK, NK und Toxizitätskontrollen mitgeführt. Nach der Inkubation wurden die zu untersuchenden Inserts und die Toxizitätskontrollen mit den Strahlungsdosen 20  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 60  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  behandelt. Im Folgenden wurden 700  $\mu\text{l}$  Medium 2 % FKS hinzugefügt und die Zellen wurden wieder bei  $37,0^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und 95,0 % rH inkubiert.

Die Weiterbehandlung der 3D- und 2D-Kulturen erfolgte wie in 4.12 Auswertung der belebten Oberflächen beschrieben.

#### 4.10 Plasmabestrahlung

Als Plasmaquelle diente der Plasmastrahler „PlasmaCare®“ inklusive Abstandshalter. Es handelt sich dabei um ein CE-zertifiziertes Medizinprodukt mit einer Surface Micro-Discharge (SMD)-Technologie. Das Gerät verfügt über eine Frequenz von 4 kHz, einer Spannung von 3,5 kV und einer Leistung von 0,4-1,5 Watt.

#### 4.10.1 Behandlung von unbelebten Oberflächen

Für die Bestrahlung mit dem Kaltplasmastrahler wurden Edelstrahlkeimträger verwendet, die mit Virus bzw. Medium beschichtet und unter der MSW getrocknet wurden (4.7 Vorbereitung der Keimträger). Als zu testende Viren wurden das murine Norovirus, das feline Calicivirus, das Vesiculovirus indiana und das suide Herpesvirus 1 verwendet. Die Viren wurden 1:10 mit FKS-freien Medium verdünnt und hatten folgenden Infektionstiter MNV  $8,25 \pm 0,18 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, FCV  $7,63 \pm 0,27 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, VSIV  $6,51 \pm 0,16 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml und SuHV-1  $6,30 \pm 0,22 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Durch den Abstandshalter war eine definierte Entfernung von 8 mm zur Keimträgeroberfläche vorgegeben. Bei den Arbeiten mit dem Kaltplasmagerät wurden stets ATK und Tox. mitgeführt. Als Bestrahlungszeiten wurden 1 min, 5 min, 10 min und 20 min getestet. Nach der Bestrahlung wurden die Edelstahlkeimträger, wie in 4.11 Auswertung der unbelebten Oberflächen beschrieben, weiterverarbeitet.

#### 4.10.2 Behandlung von belebten Oberflächen

Als belebte Oberflächen wurden 2D- und 3D-Kulturen für die Bestrahlung mit Kaltplasma vorgesehen. Die für VSIV empfängliche TR146-Zelllinie wurde als 2D-Monolayerzellkultur sowie als 3D-Schleimhautmodell angezogen und untersucht. Für die Plasmabehandlung des Schleimhautmodells wurden zunächst 3D-Airliftkulturen über 16 Tage angelegt (4.3 Anlegen einer 3D-Kultur). An Tag 17 erfolgte die Virusinfektion (Probe, PK) bzw. die Beladung mit PBS (Tox., NK) und anschließende 60 minütige Inkubation im Brutschrank (37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95,0 % rH). Daraufhin wurden die Toxizitätskontrollen und die zu untersuchenden Inserts für 1 min, 5 min, 10 min und 20 min bestrahlt.

Im Rahmen der Untersuchungen der 2D-Kultur wurden die Zellen in einer 24-Wellplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) inkubiert. Bei jedem Versuch wurde das Medium aus den Kavitäten abgesaugt und durch 300 µl PBS (Tox., NK) bzw. durch 300 µl der 1:10 Virusverdünnung (Probe, PK) ersetzt. Anschließend wurden die Kulturen 60 min im Brutschrank inkubiert (37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95,0 % rH). Danach erfolgte die Bestrahlung, mit Ausnahme der PK und NK, mit Zeiten von 1 min, 5 min, 10 min und 20 min. Nach jeder Behandlung wurden 700 µl Medium 2 % FKS hinzugefügt und die Zellen wurden wieder bei 37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95,0 % rH inkubiert.

Die Weiterbehandlung erfolgte wie in 4.12 Auswertung der belebten Oberflächen beschrieben.

#### 4.11 Auswertung der unbelebten Oberflächen

Nach der Durchführung der Desinfektionsmethode (aPES-Trockenvernebelung oder Bestrahlung mittels UV C bzw. Kaltplasma) wurden die Keimträger in 1 ml FKS-freien Medium abgespült. Aus dem abgespülten Überstand wurden 200 µl als Triplikat für die folgende Virustitration eingesetzt. Der Virustiter wurde wie in 4.5 Virustitration bestimmt.

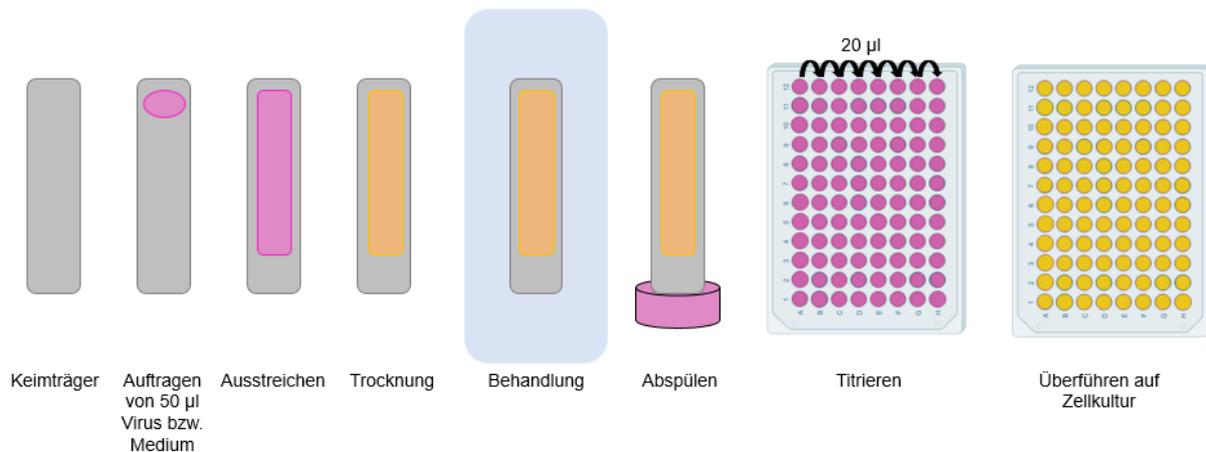


Abbildung 9: Ablaufschema für die Herstellung, Behandlung und Auswertung der Keimträger, © Biorender

##### 4.11.1 Auswertung der Bakteriophagen-Keimträger

Für die Auswertung der mit Phagensuspension beschichteten Keimträger wurden diese in 1 ml LB-Medium abgespült und anschließend titriert. Der Titrationsansatz wurde auf vorbereitete Agarplatten übertragen. Dafür wurden zunächst die Agarplatten mit einer Suspension aus *E. coli* und Weichagar (1:10) beschichtet. Sobald der Weichagar erstarrte, wurden 10 µl aus dem Titrationsansatz auf die Agarplatte nach dem Pipettierschema in Abbildung 10 transferiert. Zwischen jeder Verdünnungsstufe wurden dabei die Spitzen gewechselt. Das Vorhandensein infektiöser Bakteriophagen konnte nach 24 h Inkubation im Brutschrank (37 °C, 95,0 % rH) über die Bildung von Plaques innerhalb des Bakterienrasens nachgewiesen werden. Anschließend konnte der Virustiter, wie in 4.5 Virustitration beschrieben, bestimmt werden.

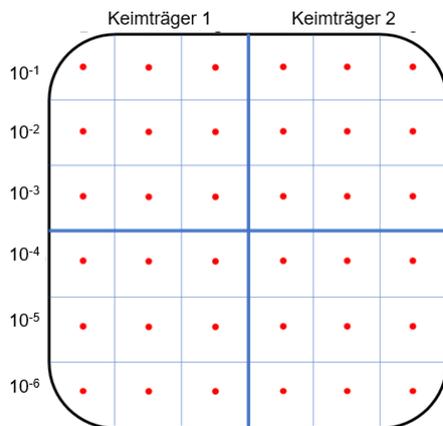


Abbildung 10: Pipettierschema des MS 2 Bakteriophagen auf einer Agarplatte

Die herkömmlich verwendete Methode des Plattengussverfahrens wurde parallel in Vorversuchen getestet und mit dem Ergebnis des oben genannten Verfahrens verglichen. Da nur geringfügige Unterschiede auftraten, wurde aufgrund des höheren Materialverbrauchs und der zeitaufwendigeren Praktik auf das Plattengussverfahren verzichtet.

#### 4.12 Auswertung der belebten Oberflächen

Die 3D-Inserts wurden nach der UV C- bzw. Kaltplasmabestrahlung mit 150  $\mu$ l Zellkulturmedium vorsichtig abgespült. Vom gewonnenen Überstand wurden 20  $\mu$ l jeweils als Triplikat, wie in 4.5 Virustitration beschrieben, titriert. Die Inserts wurden anschließend zurück in die Kavitäten der 6-Wellplatte überführt. Hinsichtlich der 2D-Monolayerkulturen wurden diese 24 h nach der Behandlung mikroskopisch beurteilt und mögliche Veränderung wurden digital dokumentiert. Darüber hinaus wurde 24 h nach der UV C- bzw. Kaltplasmabestrahlung ein MTT-Test der 3D-Inserts und der 2D-Monolayerkultur durchgeführt.

##### 4.12.1 MTT-Test

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde ein MTT-Test des 3D-Schleimhautmodells absolviert. Dafür wurden 500  $\mu$ l MTT-Gebrauchslösung pro Kavität in einer 24-Wellplatte pipettiert. Dann wurden die Inserts vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in die Kavitäten der 24-Wellplatte gesetzt, sodass diese auf der Oberfläche schwammen. Nach einer zweistündigen Inkubation im Brutschrank (37,0 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) wurden die Inserts aus den Kavitäten entnommen und auf sterilen Zellstoff abgetupft. In einer neuen 24-Wellplatte wurden 2 ml MTT-Elutionslösung pro Kavität pipettiert. Die Inserts wurden in die vorbereitete 24-Wellplatte gesetzt und für 24 h im Kühlschrank abgedunkelt gelagert. Am nächsten Tag wurden die Inserts entfernt und 200  $\mu$ l der in den Kavitäten befindlichen Elutionslösung wurden in

Doppelbestimmung auf eine 96-Wellplatte übertragen. Die photometrische Auswertung der Platte erfolgte bei 560 nm (Mosmann, 1983).

Um die Zellaktivität der 2D-Monolayerkulturen zu bestimmen, wurde der Zellkulturüberstand aus der 24-Wellplatte abgesaugt. 500 µl MTT-Gebrauchslösung wurden anschließend in die einzelnen Kavitäten gefüllt. Die 24-Wellplatte wurden für zwei Stunden im Brutschrank (37,0 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) inkubiert. Darauffolgend wurde die MTT-Gebrauchslösung entfernt und durch 2 ml MTT-Elutionslösung ersetzt. Die Mikrotiterplatten wurden 24 h im Kühlschrank abgedunkelt aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden 200 µl der Elutionslösung in Doppelbestimmung auf eine 96-Wellplatte überführt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 560 ausgewertet (Mosmann, 1983).

#### 4.13 Berechnungen und statistische Auswertung

##### *Virustiterberechnung*

Nach dem virusspezifischen Inkubationszeitraum (Tab. 8) wurde der cpE unter dem Umkehrmikroskop abgelesen und danach der finale Titer mithilfe der folgenden Formel berechnet (Kärber, 1931; Rabenau *et al.*, 2015; Spearman, 1908):

$$m = x_k + \frac{d}{2} - d \sum p_i$$

$m$  = negativer dekadischer Logarithmus des Titers

$x_k$  = Logarithmus der kleinsten Verdünnungsstufe, bei der alle Zellkulturen positiv waren

$d$  = Logarithmus des Verdünnungsfaktors

$p_i$  = beobachtete Reaktionsrate

Die rechnerische Nachweisgrenze der verwendeten Methoden lag bei  $1,8 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, sodass die hergestellte Virusstockkultur über einen Virustiter von mindestens  $5,8 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml verfügen musste.

##### *Standardabweichung*

Bei der Auswertung jedes Keimträgers bzw. jeder Kultur wurde zusätzlich die Standardabweichung angegeben. Diese wurde nach folgender Formel ermittelt (Rabenau *et al.*, 2015):

$$s_m = d \sqrt{\sum (p_i(1 - p_i)/(n - 1))}$$

$s_m$  = Standardabweichung des logarithmierten Titers

$d$  = Logarithmus des Verdünnungsfaktors

$p_i$  = beobachtete Reaktionsrate

$n$  = Anzahl der pro Verdünnung eingesetzte Testobjekte

Jeder Test wurde als Triplikat an verschiedenen Tagen durchgeführt. Die ermittelten Reduktionstiters wurden als gewichteter Mittelwert mit der internen und externen Abweichung berechnet.

### Gewichteter Mittelwert

Bei der Verwendung des gewichteten Mittelwertes wichteten sich die Einzelwerte nach ihrer jeweiligen Standardabweichung. Demnach zeigten Einzelwerte mit einer höheren Standardabweichung einen kleineren Einfluss auf den Mittelwert (Gränicher, 1996).

Formel zur Berechnung des gewichteten Mittelwertes (Gränicher, 1996):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{1}{s_i^2} x_i}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{s_i^2}}$$

$\bar{x}$  = gewichteter Mittelwert

$n$  = Stichprobenzahl

$x_i$  = Mittelwert des Einzelwertes

$s_i^2$  = Quadrat der Standardabweichung des Einzelwertes

### Interne Konsistenz

Die interne Konsistenz beschreibt die Homogenität der Messwerte. Waren die Abweichungen der einzelnen Mittelwerte  $x_i$  vom „wahren Wert“ zufällig und nicht systematisch, handelte es sich um intern konsistente Mittelwerte (Gränicher, 1996).

Formel zur Berechnung der internen Konsistenz (Gränicher, 1996):

$$\frac{1}{s_{int}^2} = \sum_{i=1}^n \frac{1}{s_i^2}$$

$\frac{1}{s_{int}^2}$  = interne Konsistenz

$n$  = Stichprobenzahl

$s_i^2$  = Quadrat der Standardabweichung des Einzelwertes

### Externe Konsistenz

Die externe Konsistenz bezieht sich bei der Berechnung auf die Varianz der Daten. Dazu wurde das Streuungsmaß von den Einzelwerten (inklusive ihrer Standardabweichungen) um den gewichteten Mittelwert mit in Betracht gezogen (Gränicher, 1996).

Formel zur Berechnung der externen Konsistenz (Gränicher, 1996):

$$s_{ext}^2 = \frac{1}{n-1} \frac{\sum_{i=1}^n \frac{1}{s_i^2} (x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n \frac{1}{s_i^2}}$$

$s_{ext}^2$  = externe Konsistenz

$s_i^2$  = Quadrat der Standardabweichung des Einzelwertes

$\bar{x}$  = gewichteter Mittelwert

$x_i$  = Mittelwert des Einzelwertes

$n$  = Stichprobenzahl

Dabei wird empfohlen, immer den größeren der beiden Fehlerwerte anzugeben (Gränicher, 1996).

### Reduktionsfaktor

Die Wirksamkeit der Desinfektionsmethode wurde anhand der Reduktion durch die viruziden Wirkung dargestellt. Es handelt sich dabei um die Differenz des Infektiositätstiter, ohne Einwirken des DM (Antrocknungskontrolle, ATK) und dem Infektiositätstiter nach Einwirken der Desinfektion (CEN, 2019). Nach der Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) muss als erforderliche Reduktion eine Titerreduktion von  $4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml festgestellt werden (Gabriel und Brill, 2011; Rabenau *et al.*, 2012).

Formel zur Berechnung des Reduktionsfaktors (Rabenau *et al.*, 2015):

$$RF = \log_{10}TCID_{50}/ml(ATK) - \log_{10}TCID_{50}/ml(KT)$$

$RF$  = Reduktionsfaktor

$\log_{10}TCID_{50}/ml(ATK)$  = gewichteter Mittelwert

des Infektiositätstiter der Antrocknungskontrolle

$\log_{10}TCID_{50}/ml(KT)$  = gewichteter Mittelwert

des Restinfektiositätstiter der Keimträger

*Graphische Darstellung und Statistik*

Die statistischen Darstellungen wurden mit der Software Graphpad Prism (Version 9.3.1) ausgeführt. Dabei wurde stets mit logarithmierten Daten gearbeitet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Der statistische Vergleich der Virusreduktionen erfolgte mit einem Two way ANOVA-Test und dem nachfolgenden Tukey's multiple comparisons Test. Hinsichtlich der Beurteilung der Zellaktivität wurden die ermittelten Extinktionen des MTT-Tests mit der photometrischen Messung der NK ins Verhältnis gesetzt. Die statistische Prüfung erfolgte hierbei durch den Two way ANOVA-Test und anschließenden Dunnett's multiple comparisons Test.

## 5 Ergebnisse

Nachfolgend sind die ermittelten viruziden Wirksamkeiten für die Trockenvernebelung von aerosolisierte Peressigsäure sowie die Bestrahlungen mit UV C und Kaltplasma dargestellt. In den folgenden Abbildungen sind die getesteten Viren in behüllt und behüllt unterteilt. Die horizontale Achse stellt zusätzlich die Eigenschaften der Nukleinsäure dar. Dabei wurde zwischen dsDNA-Viren (grün), ssRNA-Viren (gelb) und dsRNA-Viren (blau) unterschieden. Eine vollständige Aufstellung der einzelnen Messergebnisse ist im Anhang (Tab. 11-25) ersichtlich.

### 5.1 Viruzide Wirksamkeit der Trockenvernebelung von aPES

Zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit des aPES-Trockenvernebelungsverfahrens wurden die Viren auf zwei verschiedenen Keimträgerarten angetrocknet und unterschiedlichen aerosolisierten Wirkstoffkonzentrationen ausgesetzt. Dabei wurde eine relative Luftfeuchtigkeit zwischen 85 und 95 % rH eingestellt und über eine Einwirkzeit von 180 min gehalten.

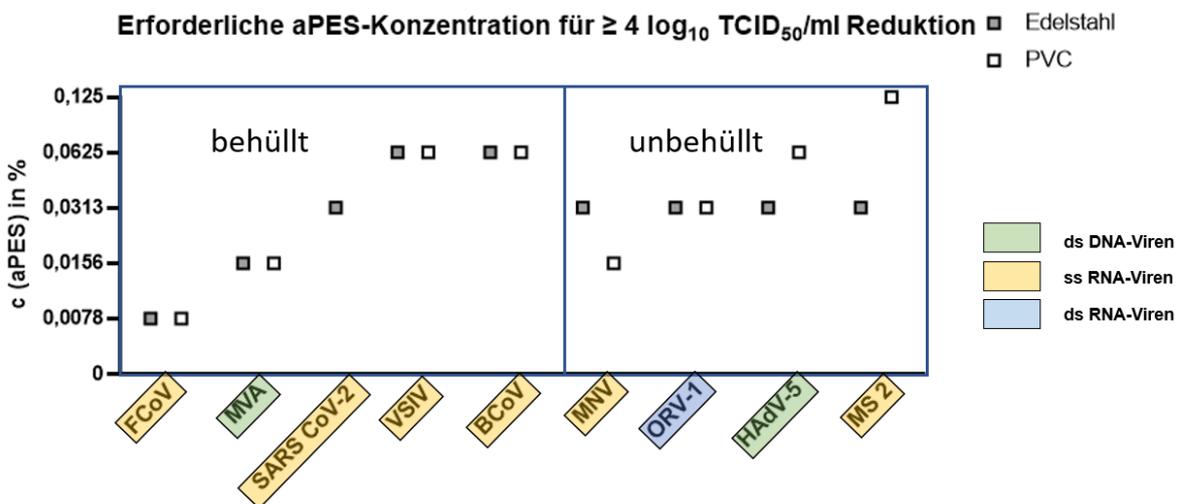


Abbildung 11: Erforderliche aPES-Konzentration für  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml-Virusreduktion (Edelstahl und PVC), Einteilung in behüllte und unbehüllte Viren, n=3

In der Abbildung 11 ist die für die einzelnen viralen Erreger notwendige aPES-Konzentration [%] dargestellt, die für eine Reduktion von  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml erforderlich war. Eingesetzt wurden dabei Keimträger aus Edelstahl (grau) und PVC (weiß). Die vollständigen Reduktionsergebnisse der Trockenvernebelung sind für alle getesteten aPES-Konzentrationen in den Tabellen 11 und 12 des Anhangs zusammengefasst.

Um die geforderte  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml-Reduktion zu erreichen, waren für FCoV (0,0078 %), MVA (0,0156 %), ORV-1 (0,0313 %) und BCoV (0,0625 %) auf Edelstahl- und PVC-Keimträgern die gleiche aPES-Konzentration notwendig.

Auf den PVC-Keimträger erreichte MNV bei einer aPES-Konzentration von 0,0156 % die erforderliche Reduktion ( $4,44 \pm 0,10 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Dagegen wiesen die Edelstahlkeimträger eine Reduktion von  $4,36 \pm 0,41 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml auf. Aufgrund der erhöhten externen Konsistenz wurde die benötigte Reduktion bei dieser Konzentration nicht erreicht. Erst die aPES-Konzentration von 0,0313 % erzielte die zuverlässige Wirksamkeit ( $4,50 \pm 0,32 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Hier zeigten die Arbeiten auf Edelstahl eine vollständige Inaktivierung von  $5,51 \pm 0,31 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Beim statistischen Vergleich der ermittelten Titerverluste für MNV ergaben die Ergebnisse auf den verschiedenen Materialien jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Testungen mit HAdV-5 waren 0,0313 % aPES für die Reduktion von  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml auf Edelstahl nötig ( $4,32 \pm 0,26 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Dagegen wurde das Virus auf PVC lediglich um  $3,96 \pm 0,40 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml reduziert. Die Inaktivierung auf Plastikkeimträgern konnte erst bei 0,0625 % aPES gezeigt werden ( $5,14 \pm 0,26 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Entsprechend wurde dabei auf den Edelstahlkeimträgern eine Reduktion von  $5,40 \pm 0,12 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml ermittelt (Tab. 11). Bei der statistischen Analyse der Einzelwerte zeigten sich sowohl bei 0,0313 % als auch bei 0,0625 % aPES keine signifikanten Unterschiede.

### Virusreduktion nach aPES-Trockenvernebelung von MS2

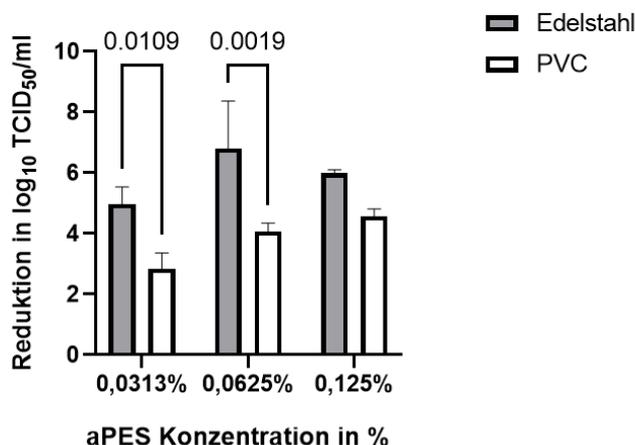


Abbildung 12: Reduktion des MS 2 Bakteriophagen [ $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml] nach aPES-Trockenvernebelung verschiedener Konzentration (Edelstahl und PVC), n=3

Der einzig signifikante Unterschied bezüglich der beiden eingesetzten Keimträgermaterialien stellte sich bei den Inaktivierungsversuchen des MS 2 Bakteriophagen dar (Abb. 12). Hier konnte die gewünschte Reduktion auf Edelstahl bereits bei einer aPES-Konzentration von

0,0313 % gezeigt werden ( $4,57 \pm 0,18 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ). Auf PVC konnte dagegen nur eine Titerreduktion von  $2,61 \pm 0,13 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  nachgewiesen werden. Diese Beobachtung konnte auch bei nächsthöheren getesteten Konzentration von 0,0625 % aPES bestätigt werden (Edelstahl: Reduktion von  $6,58 \pm 0,74 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  und PVC: Reduktion von  $3,97 \pm 0,15 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ). Dagegen konnte bei der höchsten getesteten aPES-Konzentration von 0,125 %, welche zur Erreichung der geforderten Reduktion auf den PVC-Keimträgern notwendig war, kein signifikanter Unterschied zwischen den Materialien nachgewiesen werden (PVC: Reduktion  $4,51 \pm 0,15 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  und Edelstahl: Reduktion:  $6,10 \pm 0,10 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ).

Die Toxizitätskontrollen zeigten bis zu höchsten eingesetzten PES-Konzentration von 0,125 % keinen zytopathischen Effekt.

## 5.2 Viruzide Wirksamkeit der UV C-Bestrahlung

### 5.2.1 Behandlung von unbelebten Oberflächen

#### 5.2.1.1 254 nm-Behandlung mittels UV C-Quecksilberstrahler

Als Goldstandard wurde die viruzide Strahlungsdosis für das Erzielen einer wirksamen Desinfektion durch einen Quecksilberstrahler mit einer Wellenlänge von 254 nm auf Edelstahlkeimträgern ermittelt.

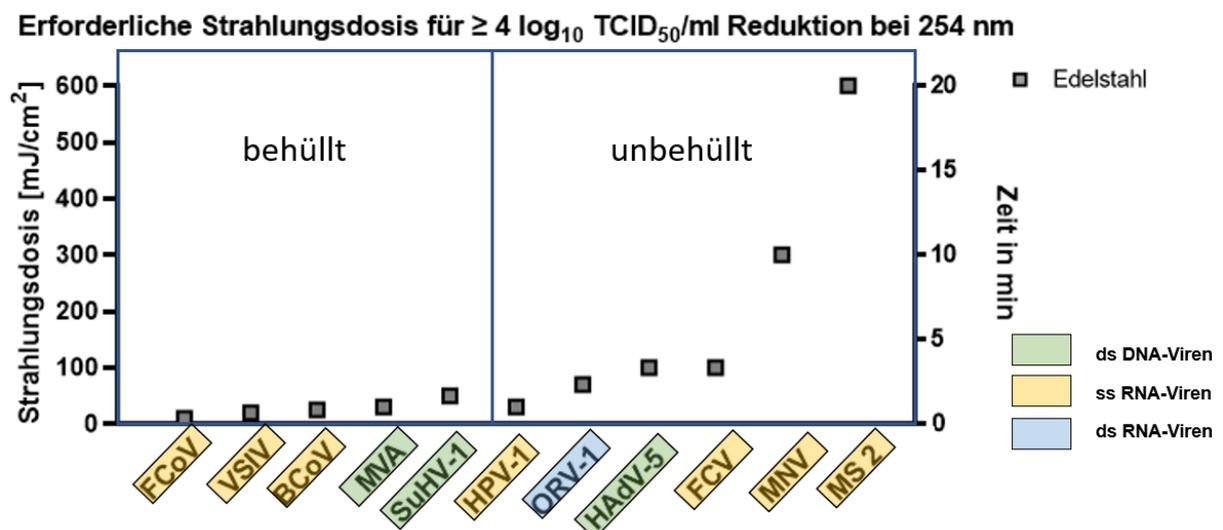


Abbildung 13: Erforderliche Strahlungsdosis des 254 nm-Strahlers für  $\geq 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ -Virusreduktion (Edelstahl), Einteilung in behüllte und unbehüllte Viren, n=3

Abbildung 13 zeigt die für eine  $\geq 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ -Reduktion erforderliche Strahlungsdosis [ $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ] des 254 nm-Strahlers auf Edelstahl. Die Sekundärachse stellt dabei die dafür

benötigte Zeit [min] dar. So war z. B. für das feline Coronavirus eine Bestrahlungszeit von 20 s notwendig, was einer Strahlungsdosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> entspricht, während beim MS 2 Phagen für das Erreichen einer Reduktion von  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml eine Strahlungsdosis von mindestens 600 mJ/cm<sup>2</sup> erforderlich war und einer Bestrahlungszeit von 20 min entspricht. Hinsichtlich der Tenazität wurden alle getesteten behüllten Viren bereits zwischen 10-50 mJ/cm<sup>2</sup> inaktiviert. Im Unterschied dazu waren für die untersuchten unbehüllten Viren Strahlungsdosen zwischen 70-600 mJ/cm<sup>2</sup> für die erforderliche Reduktion notwendig. Eine Ausnahme stellte dabei das HPV-1 dar, für dessen Inaktivierung bereits 30 mJ/cm<sup>2</sup> ausreichend waren. In Bezug auf die virale Genomorganisation (einzel- oder doppelsträngig) konnte lediglich bei den behüllten Viren eine Tendenz dargestellt werden. Hier zeigten sich doppelsträngige Viren gegenüber UV C mit einer Wellenlänge von 254 nm resistenter als einzelsträngige Viren. Diese Aussage ließ sich bei den unbehüllten Viren jedoch nicht bestätigen. Eine vollständige Aufstellung der Ergebnisse befindet sich in Tabelle 13 im Anhang.

#### 5.2.1.2 270 nm-Behandlung mittels UV C-LED-Strahler

Neben dem als Referenz eingesetzten Quecksilberstrahler sollte nunmehr die viruzide Eigenschaft eines UV C-LED-Strahlers bei 270 nm ermittelt werden. Der vorgesehene Anwendungsbereich für diesen Strahler liegt, wie bei dem 254 nm-Strahler, ebenfalls in der Desinfektion von unbelebten Oberflächen, sodass auch hier höhere Strahlungsdosen getestet werden konnten.

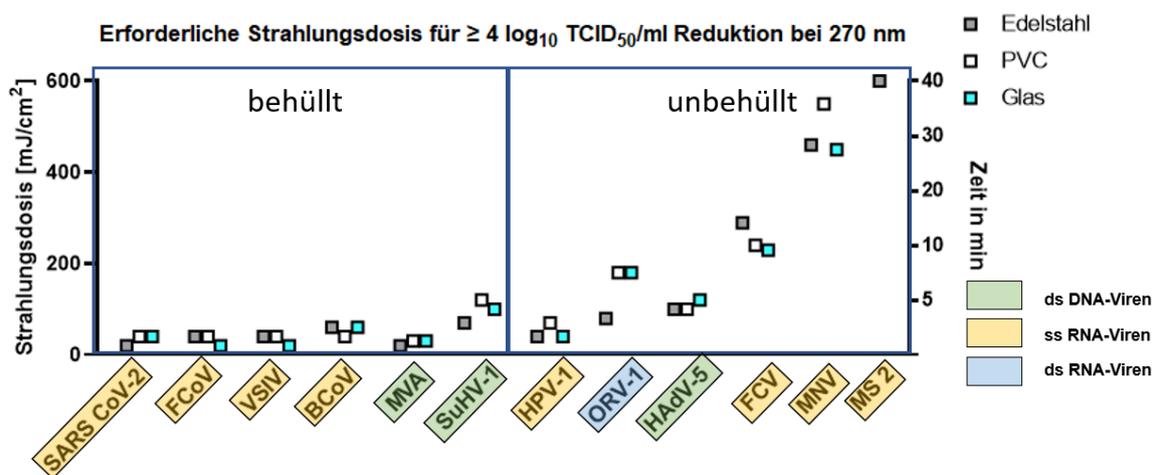


Abbildung 14: Erforderliche Strahlungsdosis des 270 nm-Strahlers für  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> /ml-Virusreduktion (Edelstahl, Glas, PVC), Einteilung in behüllte und unbehüllte Viren, n=3

Die Grafik zeigt eine zusammenfassende Darstellung der ermittelten Tenazitäten von behüllten und unbehüllten Viren gegenüber der UV C-LED-Bestrahlung bei 270 nm. Links ist

die notwendige Bestrahlungsdosis [ $\text{mJ}/\text{cm}^2$ ] dargestellt, die für eine Virusreduktion von  $\geq 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  erforderlich ist. Auf der rechten Achse ist demgegenüber die dafür benötigte Bestrahlungszeit [min] aufgetragen. Eingesetzt wurden hierbei Keimträger aus Edelstahl (grau), PVC (weiß) und Glas (blau). Die Auflistung aller ermittelten Messwerte sind in den Tabellen 14-16 im Anhang zusammengefasst. Insgesamt zeigte sich, dass die Gruppe der behüllten ssRNA Viren (BCoV, FCoV, SARS CoV-2, VSIV) bereits bei einer Dosisspanne zwischen 20-60  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  und einer Bestrahlungszeit von unter 10 min um  $\geq 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  auf den drei verwendeten Materialien reduziert werden konnte. Im Falle der getesteten behüllten dsDNA Viren (MVA und SuHV-1), konnte das MVA schon bei einer Strahlungsdosis zwischen 30-40  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  um die erforderliche Viruslast reduziert werden. Bezüglich SuHV-1 und den untersuchten unbehüllten Viren (FCV, ORV und MNV) zeigten sich größere Unterschiede zwischen den drei eingesetzten Materialien. Daher wurden diese detaillierter betrachtet (Abb. 15).

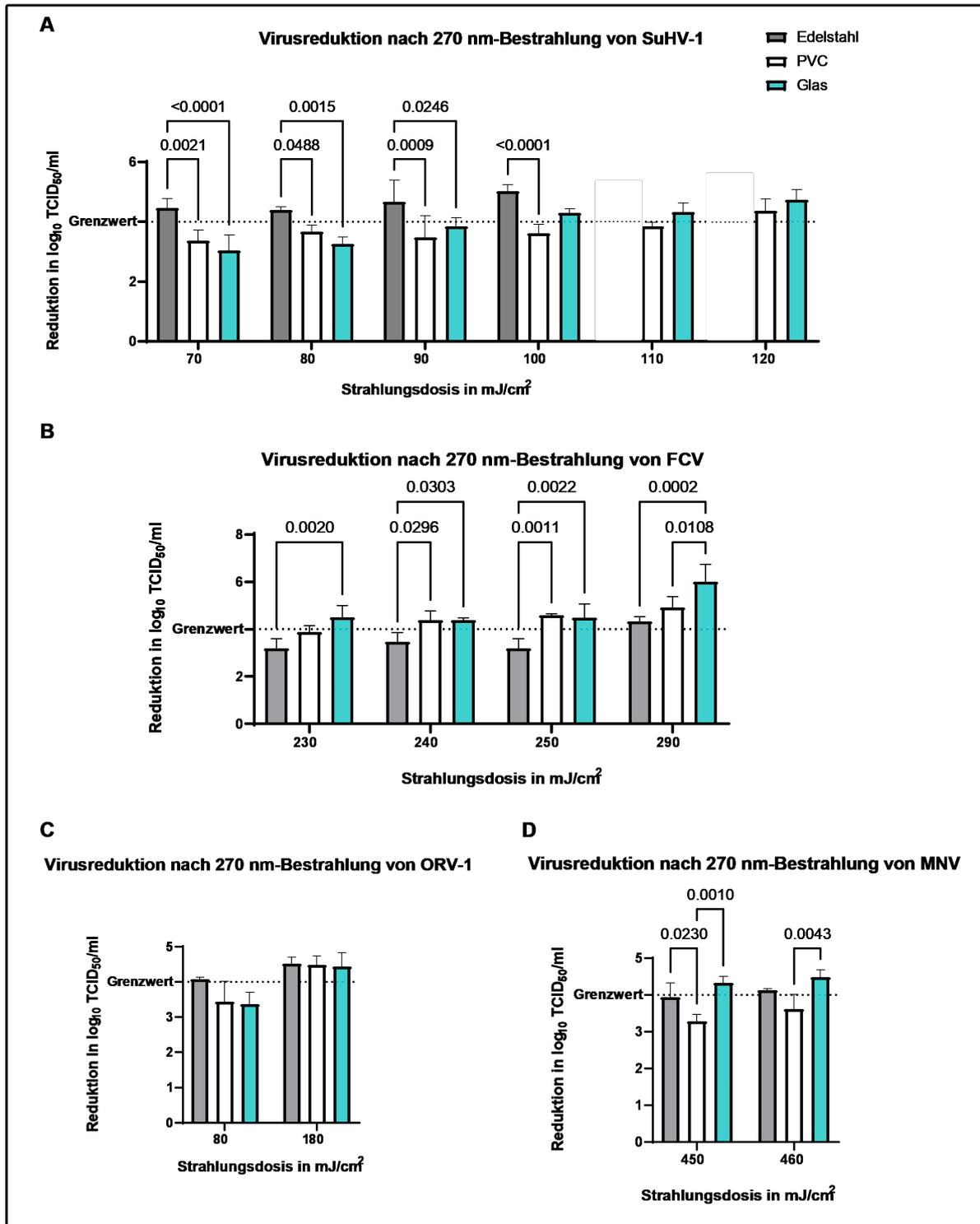


Abbildung 15: Virusreduktion [ $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml] nach 270 nm-Bestrahlung von SuHV-1, FCV, ORV-1 und MNV (Edelstahl, Glas und PVC), n=3

Im Falle des suiden Herpesvirus 1 (A) war eine Strahlungs-dosis zwischen 70-120 mJ/cm<sup>2</sup> notwendig. So wurde SuHV-1 auf Edelstahl bei 70 mJ/cm<sup>2</sup> (4,51±0,20 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml), auf Glas bei 100 mJ/cm<sup>2</sup> (4,27±0,08 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) und auf PVC erst bei 120 mJ/cm<sup>2</sup> (4,45±0,21 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) um ≥ 4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml reduziert. Bei einem Vergleich der Einzelwerte bei 70 mJ/cm<sup>2</sup>, 80 mJ/cm<sup>2</sup> und 90 mJ/cm<sup>2</sup> wurde eine statistisch signifikant höhere Reduktion auf den Edelstahlkeimträgern ersichtlich. Zwischen den Glas- und PVC-Keimträgern konnte dagegen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Für die wirksame Reduktion des feline Calicivirus (B) erforderte es eine Strahlungs-dosis zwischen 230-290 mJ/cm<sup>2</sup> für die ≥ 4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml-Reduktion. Dabei wurden 230 mJ/cm<sup>2</sup> für die Inaktivierung auf Glas benötigt (4,26±0,28 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml), 240 mJ/cm<sup>2</sup> auf PVC (4,39±0,22 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) und 290 mJ/cm<sup>2</sup> auf den Edelstahlkeimträgern (4,36±0,09 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) benötigt. Bei der Analyse der Einzelwerte bestätigte sich, dass die Virusreduktion auf den Edelstahlkeimträgern bei allen Strahlendosen signifikant geringer war als auf den Glaskeimträgern. Die Inaktivierung auf den PVC- und Glaskeimträger zeigte, bis auf die Ergebnisse bei einer Strahlungs-dosis von 290 mJ/cm<sup>2</sup>, keinen signifikanten Unterschied.

Im Hinblick auf die Inaktivierung des ORV-1 (C) wurden in Abbildung 15 Unterschiede zwischen den Materialien dargestellt, die jedoch bei der statistischen Analyse der Einzelwerte nicht belegt werden konnten.

Auch das murine Norovirus (D) zeigte eine große Spanne der Strahlungs-dosis für eine wirksame Inaktivierung. So wurden 450 mJ/cm<sup>2</sup> für die geforderte Reduktion auf Glas (4,29±0,11 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml), 460 mJ/cm<sup>2</sup> (4,14±0,12 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) auf Edelstahl und 550 mJ/cm<sup>2</sup> (4,36±0,14 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml) auf PVC ermittelt. Bei den in der Abbildung 16 verglichenen Einzelwerten wurden die geringeren Reduktionswerte auf den PVC-Keimträgern auch statistisch belegt.

Die notwendige hohe Strahlungs-dosis von 600 mJ/cm<sup>2</sup> entsprach einer Bestrahlungszeit von 40 min und war gerade ausreichend, um die geforderte Reduktion des MS 2 Bakteriophagen auf den Edelstahlkeimträgern zu zeigen (4,12±0,11 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml). Die gleiche Bestrahlungs-dosis erzielte auf Glas nur eine Reduktion von 4,04±0,11 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml und auf Plastik eine Reduktion von 4,00±0,07 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml. Durch die interne Konsistenz wurde der Grenzwert von 4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml auf Plastik nicht erreicht, wodurch diese Strahlungs-dosis als nicht ausreichend bewertet wurde. Da das im Vorfeld festgelegte Maximum der

Strahlungsdosis bei 600 mJ/cm<sup>2</sup> lag, wurden keine weiteren Messungen diesbezüglich vorgenommen.

Auch bei den Arbeiten mit dem 270 nm-Strahler wurde festgestellt, dass behüllte Viren einfacher zu inaktivieren sind als unbehüllte Viren. Im Vergleich zu den Ergebnissen des 254 nm-Strahlers war nun eine Tendenz der Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Tenazität sichtbar. So zeigten einzelsträngige RNA-Viren, mit Ausnahme des Humanen Poliotyps 1, eine geringere Tenazität als doppelsträngigen Viren. Entsprechend kann schlussgefolgert werden, dass die Mehrheit der behüllten RNA-Viren eine niedrige Tenazität aufweisen.

#### Vergleich der Strahlungsdosis für eine $\geq 4$ log TCID<sub>50</sub>/ml-Reduktion bei 254 nm und 270 nm

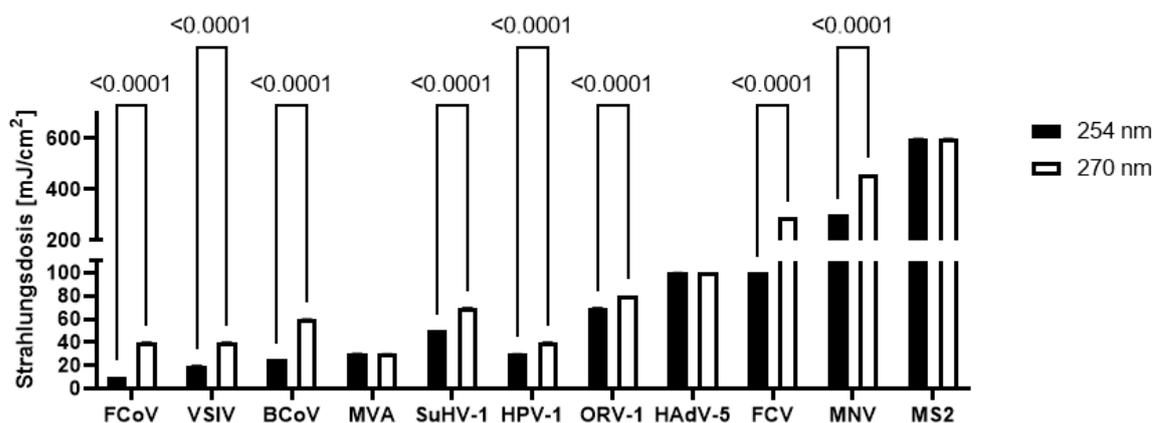


Abbildung 16: Vergleich der erforderlichen Strahlungsdosis für eine 4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml-Virusreduktion des 254 nm- und 270 nm-Strahlers (Edelstahl), n=3

Wie in Abbildung 16 verdeutlicht, waren für das Erreichen einer erfolgreichen Reduktion durch den 270 nm-Strahler signifikant höhere Strahlungsdosen notwendig als beim 254 nm-Quecksilberstrahler. Lediglich MVA, HAAdV-5 und MS 2 benötigten die gleichen Strahlungsdosen für die Inaktivierung. Hinsichtlich der unbehüllten Viren ist jedoch die enorme Dosisspanne zwischen 40 mJ/cm<sup>2</sup> für HPV-1 und 600 mJ/cm<sup>2</sup> für MS 2 bei beiden Wellenlängen vergleichbar groß.

#### 5.2.1.3 233 nm-Behandlung mittels UV C-LED-Strahler

Im Rahmen der Inaktivierungsversuche mit dem 233 nm-Strahler wurden die Keimträger bei einer Strahlungsdosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup>, 50 mJ/cm<sup>2</sup> und 80 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Für die getesteten Bestrahlungsdosen waren folgende Zeiten nötig: 1,5 min für 10 mJ/cm<sup>2</sup>; 7,5 min für 50 mJ/cm<sup>2</sup> und ≈12 min für 80 mJ/cm<sup>2</sup>. Da der Einsatz des 233 nm-Strahlers für eine *in vivo*-Behandlung vorgesehen ist, wurde in diesen Versuchen aufgrund von vorliegenden Verträglichkeitsuntersuchungen eine Maximaldosis von 80 mJ/cm<sup>2</sup> nicht überschritten (Glaab

*et al.*, 2021; Zwicker *et al.*, 2022). Erwartungsgemäß sind die erzielten Reduktionen bei 80 mJ/cm<sup>2</sup> am höchsten, weswegen in Abbildung 17 lediglich die Ergebnisse bei dieser Strahlungsdosis auf den Edelstahl-, Glas- und PVC-Keimträgern dargestellt sind. Eine Übersicht aller ermittelten Ergebnisse ist in den Tabellen 17-19 im Anhang zusammengestellt.

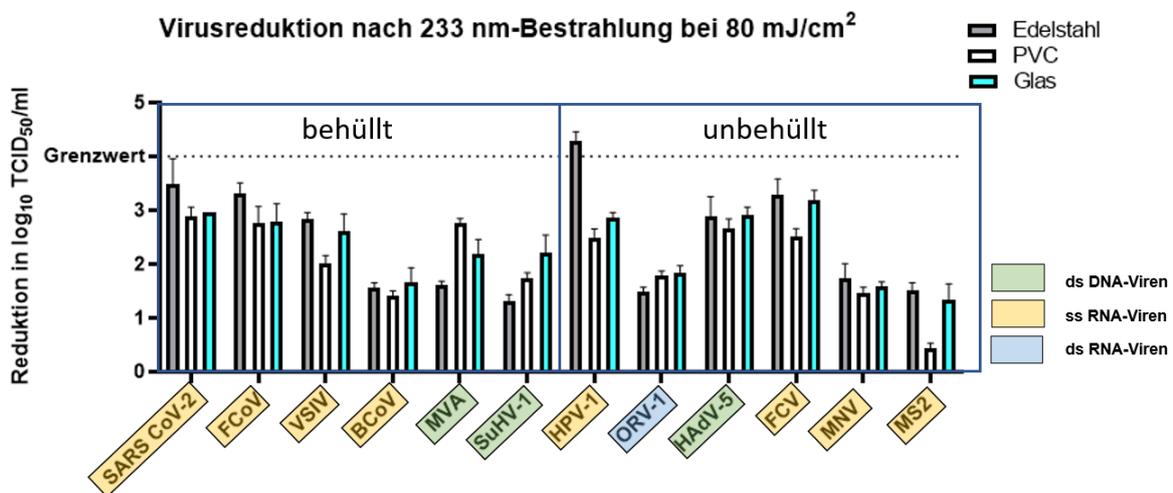


Abbildung 17: Virusreduktion [ $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml] nach 233 nm-Bestrahlung bei einer Strahlungsdosis von 80 mJ/cm<sup>2</sup>, (Edelstahl, Glas und PVC), n=3

Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde in der Abbildung 17 auf die graphische Darstellung der Signifikanzunterschiede verzichtet. Bis auf den Vergleich der drei Materialien bei BCoV, ORV- 1, HAdV-5 und MNV waren alle Vergleiche der ermittelten Reduktionen bei 80 mJ/cm<sup>2</sup> signifikant unterschiedlich. Während der Bestrahlung der Edelstahlkeimträger konnte lediglich für das Humane Poliovirus Typ 1 die erforderlichen  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub> bei 80 mJ/cm<sup>2</sup> erzielt werden ( $4,28 \pm 0,18 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Daneben konnten auf den Edelstahlkeimträgern für FCoV ( $3,32 \pm 0,19 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml), SARS CoV-2 ( $3,48 \pm 0,43 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml) und FCV ( $3,28 \pm 0,30 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml) noch die höchsten Reduktionen nachgewiesen werden. Bei der Beurteilung der Virustenazitäten auf Glas- und PVC-Keimträgern fiel auf, dass keiner der Testviren eine wirksame Inaktivierung zeigen konnte. Lediglich für FCV konnte auf den Glaskeimträgern eine Reduktion von  $\geq 3 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml ( $3,18 \pm 0,19 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml) erreicht werden. Im Falle von FCoV, SARS CoV-2, MVA, HPV-1 und HAdV-5 wurden auf beiden Keimträgerarten vergleichbare Reduktionen zwischen 2-3  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml erzielt. Bei einem Vergleich der Ergebnisse mit den zuvor dargestellten Daten für den 254 nm- und den 270 nm-Strahler stellte sich heraus, dass die getesteten behüllten Viren, im Gegensatz zu den unbehüllten Viren, generell eine geringere Tenazität gegenüber der UV-Strahlung aufwiesen. Insbesondere zeigten die beiden RNA-Viren SARS CoV-2 und FCoV bei allen drei getesteten Wellenlängen eine sehr ähnliche Tenazität. Deutlich höhere Strahlungsdosen waren dagegen für den Großteil der getesteten unbehüllten Viren notwendig. Zusätzlich wiesen diese eine größere

Heterogenität der ermittelten Tenazitäten auf, wobei das HPV-1 generell einfach und MNV sowie MS 2 schwierig zu inaktivieren waren. Die größte Schwankung in der ermittelten Tenazität zeigte FCV, für das bei der Bestrahlung mit dem 233 nm-Strahler die zweithöchste Reduktion bei den unbehüllten Viren nachgewiesen werden konnte, wohingegen es bei den vorherigen Testungen bei 254 nm und 270 nm zusammen mit MNV und MS 2 zu den stabilsten Testorganismen gehörte.

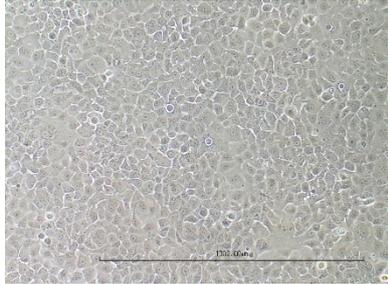
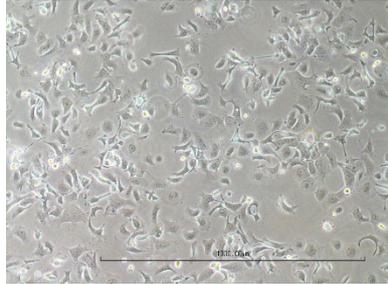
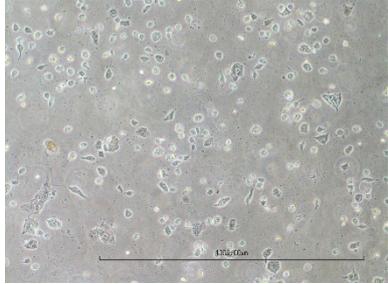
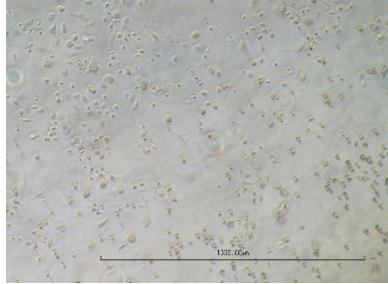
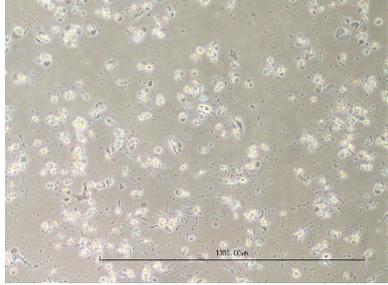
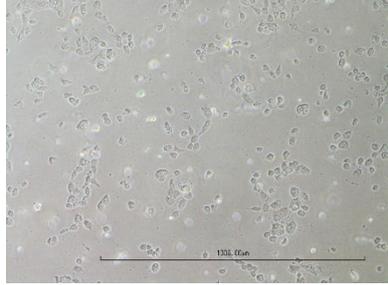
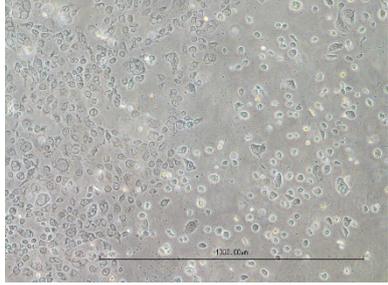
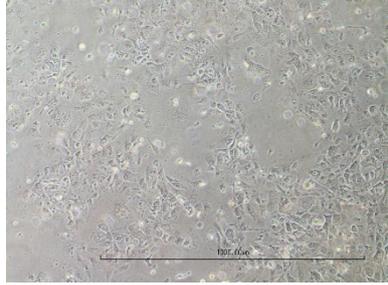
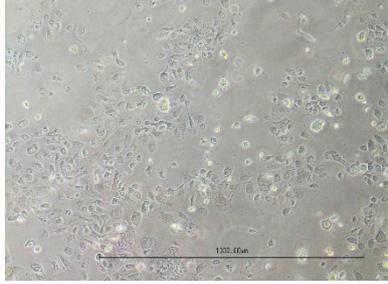
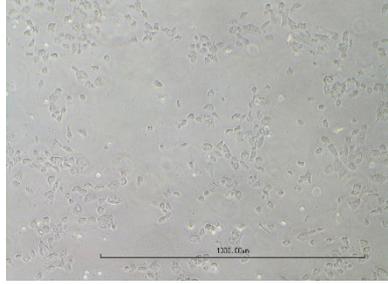
## 5.2.2 Behandlung von belebten Oberflächen

### 5.2.2.1 233 nm-Bestrahlung des 3D-Schleimhautmodells und der 2D-Monolayerkultur

Neben der Prüfung der viruziden Eigenschaften des eingesetzten 233 nm-Strahlers auf unbelebten Oberflächen sollte, im Hinblick auf *in vivo*-Behandlungen, auch dessen Wirksamkeit auf belebte Flächen getestet werden. Dazu wurde neben einer 2D-Monolayerkultur auch ein 3D-Schleimhautmodell mittels TR146-Zellen etabliert. Für diese Viruzidietestung kam nur das Vesiculovirus Indiana (VSIV) infrage, welches als einziges Testvirus, in der Lage war, die Zellen zu infizieren. Um die Wirksamkeit der Bestrahlung so realitätsnah wie möglich nachzuweisen, wurden die Zellkulturen für 60 min im Brutschrank mit dem virushaltigen Zellkulturüberstand inkubiert und anschließend bestrahlt (20 mJ/cm<sup>2</sup>, 40 mJ/cm<sup>2</sup>, 60 mJ/cm<sup>2</sup> und 80 mJ/cm<sup>2</sup>).

Als Vorversuch und zum Nachweis möglicher zytotoxischer Eigenschaften der Behandlung durch den 233 nm-Strahler wurde zusätzlich eine 2D-Monolayerkultur mit VSIV infiziert und anschließend bestrahlt. Zur Dokumentation der beobachteten Effekte wurden die behandelten und unbehandelten Kulturen mikroskopisch ausgewertet und digital fotografiert (Tab. 9). Die Abbildungen zeigen die nicht behandelte Negativkontrolle, die mit Virus infizierte aber nicht bestrahlte Positivkontrolle, die bestrahlten aber nicht infizierten Toxizitätskontrollen und die mit Virus infizierten und bestrahlten Proben. In Folge der Behandlung mit dem 233 nm-Strahler zeigten sowohl die Toxizitätskontrollen als auch die mit virusinfizierten Kulturen einen stark ausgeprägten cpE, sodass ursächlich nicht eindeutig zwischen virusspezifischen cpE oder Bestrahlungseffekten unterschieden werden konnte.

Tabelle 9: Mikroskopische Aufnahmen (10x Vergrößerung) der 2D-Monolayerkultur (TR146) nach UV C-Bestrahlung (233 nm), NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle

NK		PK	
Tox. 20 mJ/cm <sup>2</sup>		Tox. 40 mJ/cm <sup>2</sup>	
Tox. 60 mJ/cm <sup>2</sup>		Tox. 80 mJ/cm <sup>2</sup>	
20 mJ/cm <sup>2</sup>		40 mJ/cm <sup>2</sup>	
60 mJ/cm <sup>2</sup>		80 mJ/cm <sup>2</sup>	

In Abbildung 18 sind die erzielten Reduktionen des Vesiculovirus Indiana (VSIV) dargestellt, welche nach der 233 nm-Bestrahlung der 3D-Mundschleimhautkultur ermittelt wurden.

#### Virusreduktion nach 233 nm-Bestrahlung des 3D-Schleimhautmodell

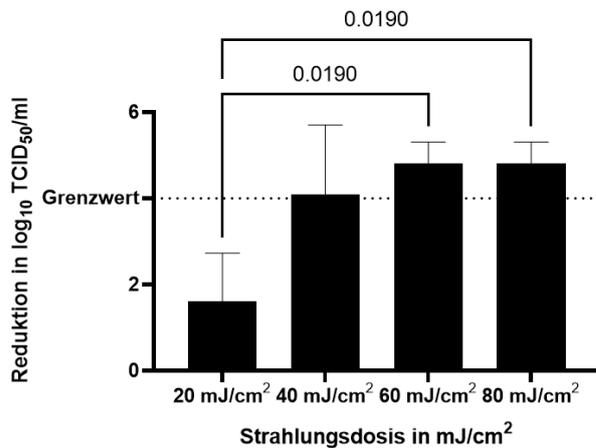


Abbildung 18: Virusreduktion [ $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml] nach 233 nm-Bestrahlung des 3D-Schleimhautmodells, n=3

Im Falle der bestrahlten 3D-Kulturen konnte VSIV bereits bei einer Bestrahlungsdosis von 60 mJ/cm<sup>2</sup> um mindestens 4  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, unter Beachtung der Abweichungen durch die interne und externe Konsistenz, reduziert werden (Tab. 20). Da die Erhöhung der Strahlungsdosis auf 80 mJ/cm<sup>2</sup> keine gesteigerte Reduktion erzielte, ist davon auszugehen, dass die Virussuspension komplett inaktiviert werden konnte. Darüber hinaus wurde geprüft, ob nach dieser Behandlung noch Restvirus auf den Inserts verblieb bzw. die Zellen durch VSIV infiziert wurden und neue Viren freisetzen. Dafür wurden die Inserts nach dem Abspülen erneut mit 150  $\mu$ l Zellkulturmedium beladen und für maximal 4 Tage im Brutschrank inkubiert (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH). Der Überstand wurde anschließend abgenommen und titriert. Nach weiteren vier Tagen konnte der finale Titer abgelesen werden (Kärber, 1931; Spearman, 1908). Bei der zweiten Abspülung der Inserts konnte ebenfalls kein infektiöses Virus mehr nachgewiesen werden.

Aufgrund der zuvor beschriebenen zytotoxischen Bestrahlungseffekte auf den 2D-Monolayerkulturen stellte sich die Frage, inwieweit diese auch zu einer Schädigung des 3D-Schleimhautmodells führen. Die 3D-Kulturen können dabei jedoch nicht mittels Umkehrmikroskop hinsichtlich zytopathogener Veränderungen untersucht werden. Daher wurde zum besseren Vergleich der Zellvitalität der objektive reproduzierbare kolorimetrische MTT Test 24 h nach der Bestrahlung für beide Kultursysteme durchgeführt. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, welcher in der Lage ist, durch die Zellmembran zu dringen. Dort wird dieses, bei Anwesenheit von lebensfähigen Zellen durch NADH- und NADPH-abhängige Enzyme, reduziert (Berridge

und Tan, 1993; Mosmann, 1983). Als Resultat entsteht dabei ein violettes, wasserunlösliches Formazan, welches nicht membrangängig ist und sich daher in intakten Zellen ansammelt. Nach Zugabe der Solubilisierungslösung wird das unlösliche Formazan anschließend wieder gelöst und kann photometrisch bei 560 nm gemessen werden. Bei der Auswertung wurden die Extinktionen jeder Probe mit der jeweils unbehandelten Negativkontrolle (100 % Aktivität) ins Verhältnis gesetzt.

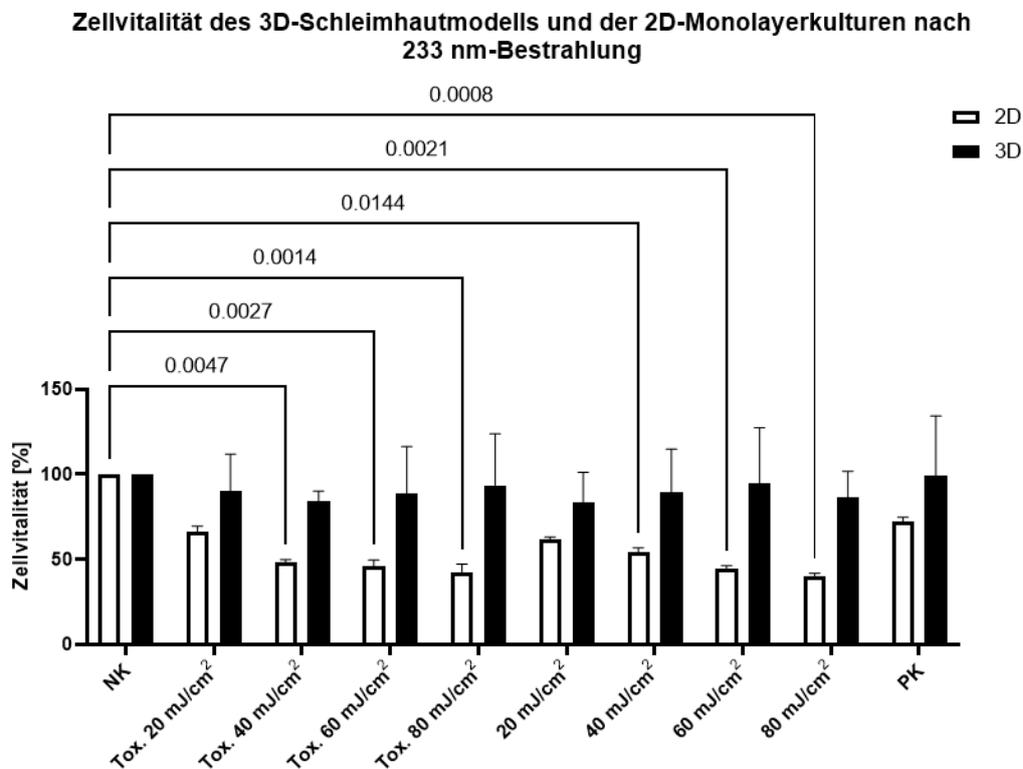


Abbildung 19: Vergleich der MTT-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) in schwarz und der 2D-Monolayerkultur in weiß nach UV C-Bestrahlung (233 nm), NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3

Wie in Abbildung 19 dargestellt wurde die Zellvitalität der 3D-Kultur sowie der 2D-Monolayerkultur nach der UV C-Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 233 nm getestet. Hinsichtlich der Verträglichkeit des 3D-Schleimhautmodells wurden weder durch die UV C-Bestrahlung noch durch die Virusinfektion signifikante Unterschiede zur unbehandelten und nicht-infizierten Negativkontrolle festgestellt. Im Gegensatz dazu konnte ein signifikanter Verlust der Vitalität nach der Bestrahlung der 2D-Monolayerkultur nachgewiesen werden (p-Werte: 0,0008-0,0047). Hervorzuheben ist dabei, dass der zytotoxische Effekt durch UV C-

Bestrahlung eine signifikant höhere Abnahme der Zellvitalität zeigte als die nicht bestrahlte aber infizierte PK. Die Übersicht der Ergebnisse ist in der Tabelle 21 im Anhang dargestellt.

### 5.3 Viruzide Wirksamkeit der Kaltplasmabestrahlung mittels PlasmaCare®

#### 5.3.1 Behandlung von unbelebten Oberflächen

Bei den Desinfektionsversuchen von unbelebter Oberfläche mittels Kaltplasma wurden FCV, MNV, VSIV und SuHV-1 getestet. FCV und MNV zeigten sich in den vorigen Desinfektionsmethoden als sehr robuste Viren, wohingegen VSIV bislang vergleichbar einfach zu inaktivieren war. Das SuHV-1 wies in den vorhergehenden Versuchen eine mittlere Tenazität auf. In Abbildung 20 sind die Virusreduktionen auf Edelstahl für die vier getesteten Bestrahlungszeiten (1 min, 5 min, 10 min und 20 min) dargestellt.

#### Virusreduktion nach Plasmabestrahlung von Edelstahlkeimträgern

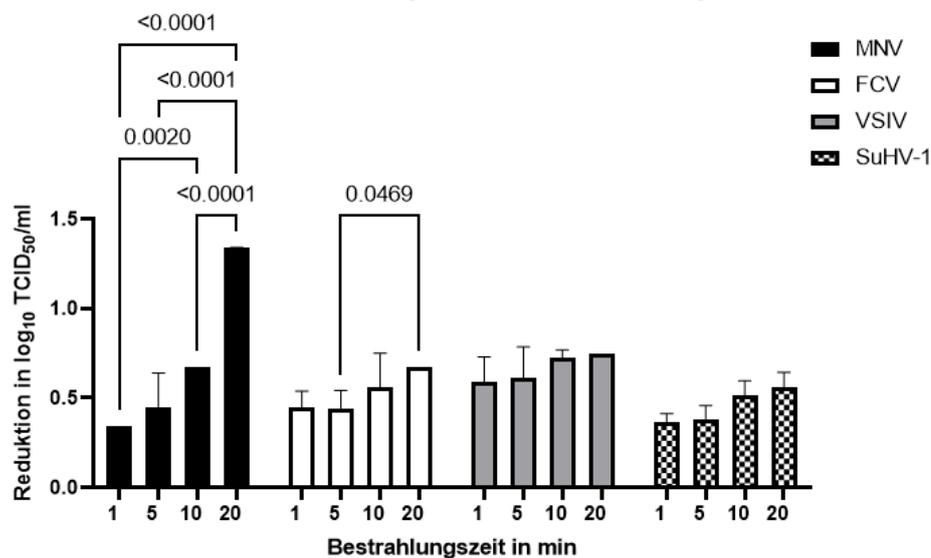


Abbildung 20: Virusreduktion [ $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml] nach Plasmabestrahlung von MNV, FCV, VSIV und SuHV-1 (Edelstahl), n=3

Bei der Behandlung mit dem Plasmagerät konnte bei keinem der ausgewählten Testviren eine Reduktion von  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml erzielt werden. Die höchste gemessene Reduktion wurde für MNV mit lediglich  $1,34 \pm 0,23 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml bei der längsten getesteten Behandlungsdauer von 1200 s (20 min) ermittelt. Die vollständige Auflistung der Ergebnisse ist in Tabelle 22 im Anhang zu finden.

### 5.3.2 Behandlung von belebten Oberflächen

#### 5.3.2.1 Plasmabestrahlung des 3D-Schleimhautmodells und der 2D-Monolayerkultur

Um zu testen, ob die viruzide Wirkung der Kaltplasmabestrahlung ähnlich wie die zuvor gezeigte UV C-Behandlung auf Zellkulturen in wässrigen Lösungen größer ist als in angetrockneten Proben, wurden identische Bestrahlungsversuche unter Nutzung des 2D-Monolayers sowie des 3D-Schleimhautmodells durchgeführt.

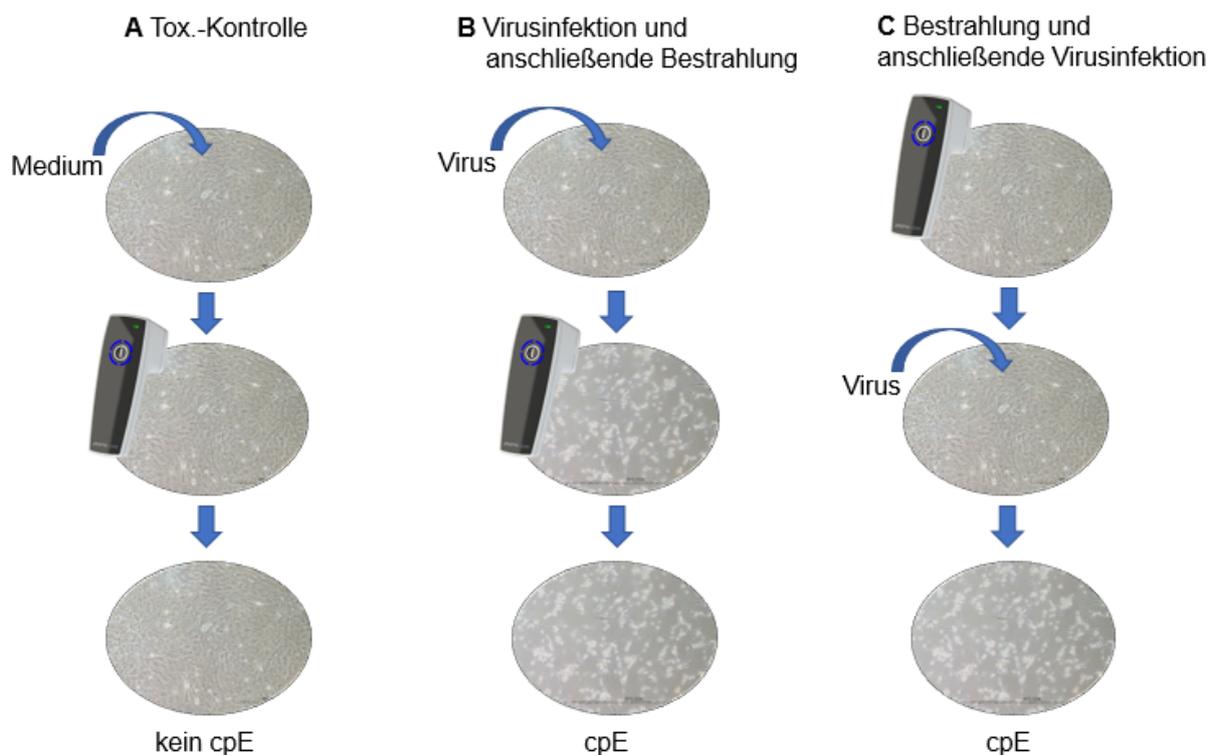


Abbildung 21: Ergebnisse nach Plasmabestrahlung der 2D-Monolayerkultur, Tox. Toxizitätskontrolle, cpE zytopathischer Effekt (Terraplasma, 2023)

In Abbildung 21 ist der Versuchsaufbau der Bestrahlung der Monolayerkulturen schematisch dargestellt. Bei der Plasmabestrahlung der 2D-Monolayerkultur wiesen die Toxizitätskontrollen (A) keine zytotoxischen und zytopathischen Schädigungen der Zellen auf. Auch zwei Tage nach der Behandlung zeigte der Zellrasen immer noch ein intaktes Bild. Demgegenüber stellten die mit Virus infizierten und bestrahlten Kulturen (B) einen deutlichen virusspezifischen cpE dar. In einem weiteren Versuch wurde überprüft, ob eine vorherige Stimulation der Zellen durch Plasmastrahlung die zelleigene Immunabwehr anregt und damit eine Infektion verringert werden kann (C). Dafür wurde das Medium vom Vortag abgenommen, 300 µl FKS-freies Medium hinzugefügt und die Zellkultur mittels PlasmaCare® für 1 min, 5 min, 10 min und 20 min behandelt. Anschließend wurde das Medium entfernt und 300 µl der Virusverdünnung

(1:10) zugegeben. Nach der Bestrahlung wurden 700 µl Medium mit 2 % FKS hinzugefügt. Der Versuchsansatz wurde über Nacht im Brutschrank (37,0°C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95,0 % rH) inkubiert und am nächsten Tag mikroskopisch beurteilt. Auch hier konnte wiederum ein deutlicher virusspezifischer cpE in den Proben nachgewiesen werden, welcher zwei Tage nach dem Versuchstag noch ausgeprägter war. Die Übersicht der Ergebnisse ist in der Tabelle 23 im Anhang dargestellt.

In Abbildung 22 ist die Reduktion von VSIV dargestellt, die nach 1 min, 5 min, 10 min und 20 min Plasmabestrahlungszeit auf den 3D-Inserts erreicht wurde. Da die zuvor dargestellten Ergebnisse einer vorherigen Stimulation der Monolayerkulturen keinen messbaren Effekt zeigten, wurde im Falle der 3D-Kulturen lediglich der Effekt der Plasmabestrahlung nach Virusinfektion geprüft.

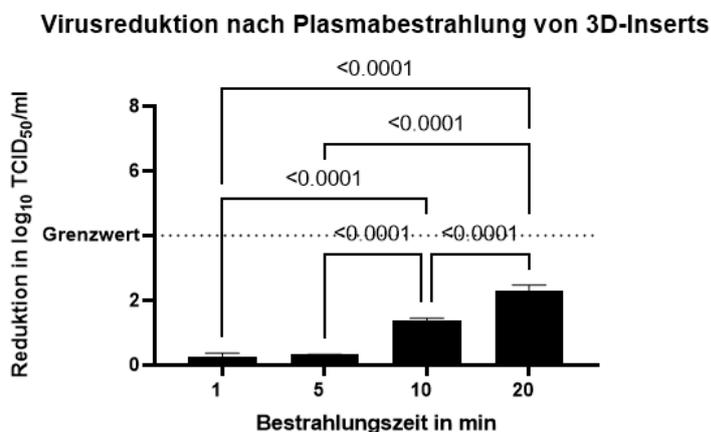


Abbildung 22: Virusreduktion [ $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml] nach Plasmabestrahlung des 3D-Schleimhautmodells, n=3

Die maximale nachgewiesene Reduktion von  $2,30 \pm 0,19 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml wurde nach 20 min Einwirkzeit erreicht. Dieser Wert ist mehr als fünfmal höher als der vergleichbare Reduktionswert der Keimträgerversuche. Eine vollständige Aufstellung der Ergebnisse befindet sich in Tabelle 24 im Anhang.

Nach der Plasmabehandlung wurde die Vitalität der 2D- und 3D-Kulturen mithilfe des MTT-Tests ermittelt.

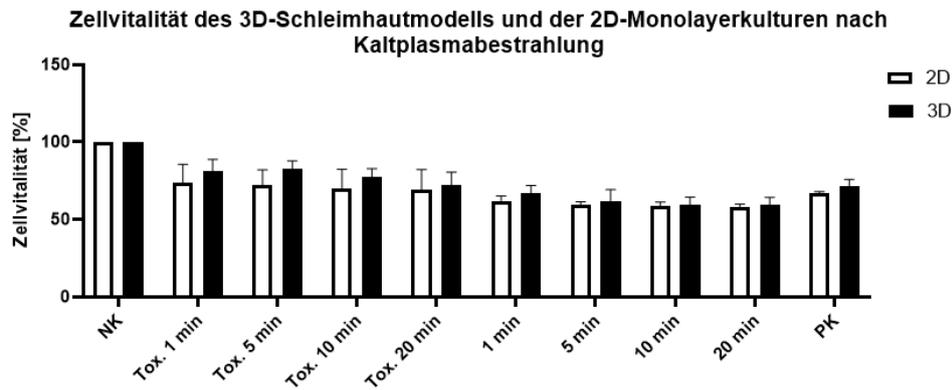


Abbildung 23: Vergleich der MTT-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) in schwarz und der 2D-Monolayerkultur in weiß nach Plasmabestrahlung, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3

In Abbildung 23 ist die Zellaktivität der 2D- und 3D-Kulturen nach der Plasmabestrahlung dargestellt. Sowohl die Toxizitätskontrollen beider Kulturen als auch die mit Virus infizierten und anschließend bestrahlten Kulturen zeigten eine signifikante Abnahme der Zellvitalität (p-Werte: >0,0001-0,0448). Im Dienste der Übersichtlichkeit wurden die p-Werte nicht im Diagramm dargestellt. Die vollständigen Ergebnisse sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

## 6 Diskussion

### 6.1 Beurteilung der Praktikabilität und Verwendbarkeit der getesteten alternativen Oberflächendesinfektionsverfahren

#### 6.1.1 Breites antimikrobielles Wirkungsspektrum

Wie in der Literatur beschrieben, konnte für das getestete Verfahren der Trockenvernebelung (Abb. 11) bereits bei aPES-Konzentrationen weit unterhalb von 1 % die viruzide Wirkung bestätigt werden (Krishnan *et al.*, 2012; Schinköthe *et al.*, 2021). In vergleichbaren Arbeiten konnten zusätzlich sowohl bakterizide als auch sporozide Effekte dargestellt werden, was das breite antimikrobielle Wirkungsspektrum unterstreicht (Gregersen und Roth, 2012; Schinköthe *et al.*, 2021). Wie erwartet, zeigten unbehüllte Viren durchschnittlich eine höhere Widerstandsfähigkeit als behüllte Viren. Jedoch war der nachweisbare Unterschied geringer als angenommen. Insbesondere SARS-CoV-2 und BCoV wiesen gegenüber aPES-Trockenvernebelung ähnliche Tenazitäten auf wie ein Großteil der unbehüllten Viren. Schinköthe *et al.* (2021) führten mit vergleichbaren eingesetzten aPES-Konzentrationen das Verfahren mit einer Inkubationszeit von 30 min durch. Dabei wurde die Wirksamkeit sowohl von Viren als auch von vegetativen Bakterien und bakteriellen Sporen auf Edelstahlkeimträgern untersucht. Im Falle der Bakterien und Sporen wurde zusätzlich auch eine Inkubation von 60 min getestet. Ausgehend von dem erbrachten Nachweis, dass eine Erhöhung der Inkubationszeit von 30 auf 60 min zu einer signifikanten Steigerung der Reduktion von bakteriellen Sporen und Mykobakterien führt, stellte sich für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche die Frage, ob dies für Viren ebenfalls darstellbar ist und folglich bei längeren Einwirkzeiten eine geringere aPES-Konzentration benötigt wird. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine sechsfach längere Inkubationszeit von 180 min (3 h) gegenüber dem Grundwert von 30 min vorgenannter Autoren festgelegt. Vergleicht man nunmehr die zwei in beiden Arbeiten gleichermaßen getesteten Erreger, so wurde bei SARS CoV-2 in beiden Fällen die  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml-Reduktion erst bei einer Konzentration von 0,0313 % aPES erreicht (30 min Protokoll: Reduktion um  $4,60 \pm 0,37 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml (Schinköthe *et al.*, 2021); 3 h Protokoll: Reduktion um  $5,17 \pm 0,10 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Auch bei MNV konnte kein signifikanter Reduktionsunterschied bei einer aPES-Konzentration von 0,0313 % nachgewiesen werden (30 min Protokoll: Reduktion um  $3,91 \pm 0,28 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml (Schinköthe *et al.*, 2021); 3 h Protokoll: Reduktion um  $4,36 \pm 0,09 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich somit sagen, dass bei der Trockenvernebelung von Viren primär die aPES-Konzentration entscheidend für den Inaktivierungserfolg ist und die Länge der Inkubationszeit nur eine untergeordnetere Rolle darstellt. Weiterhin lässt sich festhalten, dass zwischen den beiden getesteten Keimträgerarten aus Edelstahl oder PVC kein

Unterschied bezüglich der erzielten Reduktionen nachweisbar war. Der einzig statistisch signifikante Unterschied, im Falle des MS 2 Phagen, lässt sich darauf zurückführen, dass sich der Phage im Vergleich zu den Virussuspensionen hinsichtlich der Medienzusammensetzung unterscheidet. Während die Viren in Medien mit 2 % FKS angezogen wurden, wurde für den Phagen eine Bouillon aus Pepton und Hefe verwendet. Durch die erhöhte Proteinlast und die damit verbundene elektrischen Ladung auf Grundlage der Aminosäuren kommt es zur Kohäsion der Suspension, wodurch der Phage sich schwieriger ausstreichen ließ und demzufolge eher als Tropfen antrocknete. Wie bereits Schinköthe *et al.* (2021) zeigen konnten, lässt sich eine Antrocknung in Tropfenform deutlich schlechter durch aerosolisiertes Verfahren inaktivieren als in ausgestrichener Form. Aus diesem Grund kommt den stets im Vorfeld durchzuführenden Reinigungsschritten und dem damit verbundenen Entfernen von groben Verunreinigungen eine besondere Bedeutung zu.

Bei den Untersuchungen der getesteten UV-Strahler zeigte sich, dass der 254 nm-Quecksilberstrahler (Abb. 13) und der 270 nm LED-Strahler (Abb. 14) eine deutlich höhere viruzide Wirksamkeit aufwiesen als der UV C-LED-Strahler mit einer Wellenlänge von 233 nm (Abb. 17). Generell erwiesen sich auch hier die behüllten Viren als wesentlich einfacher zu inaktivieren als unbehüllte Viren, was in der Literatur bereits beschrieben wurde (Rheinbaben F., 2006). Bezüglich einzel- und doppelsträngiger Viren konnten allerdings keine eindeutigen Tendenzen nachgewiesen werden. Aus Abbildung 16 wird ersichtlich, dass im direkten Vergleich der 254 nm-Strahler (Strahlungsstärke: 0,50 mW/cm<sup>2</sup>), welcher die höchste Strahlungsstärke besitzt, auch die höchste viruzide Wirksamkeit aufweist. Bei diesem sind für nahezu alle Testorganismen statistisch signifikant geringere Strahlungsdosen zum Erreichen der geforderten Reduktion von  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml notwendig als beim 270 nm-LED-Strahler (Strahlungsstärke: 0,24 mW/cm<sup>2</sup>). Dagegen konnte mit dem 233 nm-LED-Strahler (Strahlungsstärke: 0,11 mW/cm<sup>2</sup>), welcher die geringste Strahlungsstärke aufweist, lediglich für einen der Testorganismen (HPV-1) eine erfolgreiche Inaktivierung erzielt werden. Begründet wird das Ergebnis zum einen dadurch, dass der Quecksilberstrahler mit der Wellenlänge von 254 nm näher am Absorptionsmaximum für DNA und RNA von 260 nm liegt als der 270 nm-Strahler (Gerchman *et al.*, 2020; Rheinbaben F., 2006). Zum anderen ist auch die Strahlungsstärke der Quecksilberlampe nahezu doppelt so hoch wie beim 270 nm-Strahler bzw. fünfmal so hoch wie beim 233 nm-Strahler. Eine ähnliche Tendenz wurde bereits in einer vergleichbaren Studie festgestellt, bei der die Wirksamkeit eines 254 nm-Quecksilberstrahlers (92,85 mJ/cm<sup>2</sup>) mit einem 265 nm-LED-Strahler (44,7 mJ/cm<sup>2</sup>) verglichen wurde (Maquart und Marlet, 2022). Sowohl der 270 nm- als auch der 254 nm-Strahler können prinzipiell zur Desinfektion von Oberflächen eingesetzt werden. Neben der bereits erwähnten Wellenlänge

und Strahlungsdosis, hängt die Wirksamkeit von weiteren Faktoren ab. So sind Erregerart, mögliche begleitende Substanzen oder die Erregermenge wichtige Einflussgrößen. Demgegenüber steht die Technik und der zu desinfizierende Bereich. Hierbei können Positionierung des Geräts und Luftgeschwindigkeit eine entscheidende Rolle spielen. Insbesondere von Gegenständen verursachte Verschattungen verhindern, dass diese Bereiche mittels UV C-Bestrahlung dekontaminiert werden können. Je nach der zu behandelnden Fläche muss der Strahler über eine ausreichend hohe Strahlungsstärke verfügen (AirTechSystems, 2023). Die Effizienz der Strahler kann aber durch die Kombination von LEDs verschiedener Wellenlänge (Campana *et al.*, 2023) und durch das Verbauen möglicher Spiegelreflektoren innerhalb des Strahlers gesteigert werden (AirTechSystems, 2023). Neben der Nutzbarkeit zur Oberflächendesinfektion eignen sich diese beiden getesteten Strahler prinzipiell auch zur Inaktivierung von Luft. Allerdings gilt auch hier, je schneller die Luft am Strahler vorbeigeführt wird, desto ineffektiver ist die Desinfektion. Im Gegensatz dazu ist der 233 nm-Strahler nicht für das Bestrahlen von Oberflächen, sondern für Haut- und Schleimhautbehandlungen vorgesehen (Glaab *et al.*, 2021). Aus diesem Grund wurden keine höheren bzw. hautschädigende Dosen von über 80 mJ/cm<sup>2</sup> getestet (Zwicker *et al.*, 2022). Insbesondere in den durchgeführten Versuchen mit lebenden und feuchten Oberflächen konnten deutlich bessere Inaktivierungseffizienzen erzielt werden (Abb. 18 und 6.2 Untersuchung der Eignung lebender Oberflächen). Daraus lässt sich schließen, dass UV C-Bestrahlung eine sehr effiziente Inaktivierungsmaßnahme von Flüssigkeiten darstellt. Dies wurde bereits mit unangetrockneten Virusproben durch Maquart und Marlet (2022) gezeigt. Hier waren unter Verwendung eines 254 nm-Quecksilberstrahlers lediglich fünf Sekunden für eine  $\geq 6 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml-Reduktion von SARS CoV-2 notwendig. Dies zeigt deutlich, welchen Einfluss die Beschaffenheit der behandelten Probe (Aerosol, Flüssigkeit oder in getrockneter Form) auf die Wirksamkeit hat. Des Weiteren ergibt sich, dass durch das Fehlen einheitlicher Vorgaben zur Verwendung von UV C-Strahlung ein direkter Vergleich aufgrund verschiedener Wellenlängen, festgelegter Grenzen in  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml für eine erfolgreiche Inaktivierung und der gewählten Strahlungsdosis zwischen publizierten Daten schwierig ist (Hessling *et al.*, 2020).

Bei den Inaktivierungsversuchen mit dem Kaltplasmagerät PlasmaCare® konnten nur geringe Reduktionen für die auf den Edelstahlkeimträgern angetrockneten viralen Testorganismen ermittelt werden. Im Falle des murinen Norovirus konnte nach einer Bestrahlungszeit von 20 min die höchste Reduktion mit lediglich  $1,34 \pm 0,23 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml gezeigt werden. Somit konnte hier die bereits in einer ähnlichen Arbeit von Ahlfeld *et al.* (2015) beschriebene schwache Wirksamkeit gegenüber Viren bestätigt werden. In dieser Studie wurde ein SMD-

Strahler mit einer Spannung von 8.5 kV und einer Frequenz 1 kHz verwendet. Dabei wurde aufgezeigt, dass eine fünfminütige Bestrahlung von Noroviren in einer Stuhlsuspension ( $2,36 \times 10^4$  Genomäquivalente/ml), eine Reduktion von bis zu  $> 1 \log_{10}$  in der PCR erbrachte (Ahlfeld *et al.*, 2015). Allerdings sind diese Versuche nur bedingt für einen Vergleich geeignet, da eine Verringerung der Infektiosität in Folge einer Desinfektionsmaßnahme nicht notwendigerweise auch mit einer Reduzierung der nachweisbaren mikrobiellen Genomäquivalenten einhergehen muss. Auch wenn die Anwendung von Kaltplasma zur Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Sharma *et al.*, 2009) und zur Freisetzung von UV-Strahlung (Rheinbaben F., 2006) führt, welche DNA- und RNA-Schädigungen induzieren können, ist eine nachweisbare Abnahme der Genomkopien eher nicht zu erwarten. Die Behandlung von Wunden bzw. Pilz- und Bakterieninfektionen wurde jedoch vielfach als wirksam publiziert (Heinlin *et al.*, 2011; Maisch *et al.*, 2012). Durch das elektromagnetische Feld kommt es zu Porenbildung in der Bakterienmembran, wodurch ROS und RNS in die Zelle dringen und die Zellstrukturen zerstören können (ViroMed, 2023). Da bei menschlichen und tierischen Zellen der Zellkern eine tragende Schutzfunktion einnimmt, sind diese vor der inaktivierenden Wirkung geschützt (Eisenhans, 2015; ViroMed, 2023). Darüber hinaus werden bei Mensch und Tier durch die Kaltplasmabehandlung zelleigene Reparaturmechanismen angeregt (Droge, 2002). Aufgrund der bereits beschriebenen Wirksamkeit bei Wunden und Bakterieninfektionen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht nur Edelstahl, sondern auch lebende Oberflächen, in Form von 2D- und 3D-Kulturen, mit einbezogen. Zwar konnte in diesem Fall die Reduktion von VSIV um mehr als das Fünffache, im Vergleich zu den Keimträgerversuchen, erhöht werden, allerdings war dies für die geforderte Virusinaktivierung dennoch nicht ausreichend (Abb. 22). Darüber hinaus wurde auch die Zytotoxizität der Plasmabehandlung auf die 2D- und 3D-Kultur untersucht. Während die Toxizitätskontrollen der 2D-Monolayerkultur mikroskopisch keinen cpE aufwiesen, ergab der durchgeführte Zellvitalitätstest sowohl für die 2D-Monolayerkultur als auch für die 3D-Kulturen eine signifikante Abnahme der Zellvitalität (Abb. 23). Dies belegt damit eine zellschädigende Wirkung durch eine Kaltplasmastrahlung, welche letztlich sogar eine größere Auswirkung auf die Vitalität der Zellen nach sich zog als der Einsatz des 233 nm-Strahlers (Vergleich Abb. 18 und 19, Tab. 13-19). Dieser Effekt kann eine Ursache der beschriebenen Wirksamkeit einer Wundbehandlung durch das Kaltplasma darstellen (Karrer und Arndt, 2015). Dennoch lässt sich schlussfolgern, dass bei der viruziden Behandlung mit dem PlasmaCare®-Gerät keine wirksame Reduktion auf unbelebten bzw. belebten Oberflächen nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei der Trockenvernebelung und der UV C- Bestrahlung grundsätzlich behüllte Viren eine geringere und unbehüllte Viren eine höhere Widerstandsfähigkeit aufwiesen. Allerdings variierte die Tenazität der einzelnen eingesetzten Testorganismen innerhalb der beiden Gruppen zum Teil erheblich. Als Ursachen können mehrere Faktoren in Betracht gezogen werden. Ein wichtiger Aspekt darunter ist der Grad der Lipo- bzw. Hydrophilie der Testerreger. Behüllte Viren zeigen aufgrund ihrer Hülle lipophile Eigenschaften, die jedoch abhängig vom Anteil der Membranlipide aber auch hinsichtlich des Anteils von Doppelbindungen in den Fettsäuren schwanken können. Sind die Fettsäuren in der Lipidschicht gesättigt, zeigen diese eine höhere Stabilität als ungesättigte Fettsäuren (Stryer, 1990). So unterteilt man in behüllte Viren mit einem hohen und einen niedrigen Grad der Lipophilie sowie unbehüllte Viren mit einem hohen und einen niedrigen Grad der Hydrophilie (Tab. 10). Des Weiteren können durch den Anteil an aromatischen Aminosäuren innerhalb der Membran Unterschiede in der Stabilität auftreten. Je mehr aromatische Aminosäuren in den Proteinen der Membran eingelagert sind, desto stabiler ist diese (Berg *et al.*, 2018; Vollhardt, 1988).

Tabelle 10: Einteilung der Viren nach Grad der Lipophilie bzw. Hydrophilie (Rheinbaben und Wolff, 2002d)

behüllte Viren		unbehüllte Viren	
Hohe Lipophilie	Geringere Lipophilie	Hohe Hydrophilie	Geringere Hydrophilie
Enthalten einen hohen Anteil an Membranlipiden	Enthalten einen niedrigen Anteil an Membranlipiden	Enthalten keine Lipide	Enthalten Lipide
Reagieren stärker mit Lipiden	Reagieren schwächer mit Lipiden	Reagieren nicht mehr mit Lipiden	Reagieren mit Lipiden
z.B. Herpesviren, Retroviren, Flaviviren	z.B. Pockenviren	z.B. Picornaviren, Parvoviren	z.B. Reoviren, Adenoviren, Caliciviren, Rotaviren

Um eine weitere Einteilung von Viren vornehmen zu können, muss darüber hinaus der prozentuale Anteil von Protein zu Nukleinsäuren ermittelt werden. Bei unbehüllten Viren mit einem hohen Grad der Hydrophilie ist der Protein-Nukleinsäuren-Anteil 70 % zu 30 %. Dabei gilt, je niedriger der relative Anteil der Nukleinsäuren, desto empfindlicher sind die Viren. Pockenviren weisen dabei einen Nukleinsäureanteil von 5 %, Adenoviren von 12-15 % und Bakteriophagen von >30 % auf (Rheinbaben und Wolff, 2002d). Dies erklärt u.a. die nachgewiesene hohe Tenazität des hier getesteten MS 2 Bakteriophagen. Es konnte auch gezeigt werden, dass Modifikationen der Kapsidhülle nicht zu einer erhöhten Stabilität des

Virus führen (Rheinbaben und Wolff, 2002d). Darüber hinaus liegen die einzelnen viralen Testorganismen in Form von Flüssigkulturen vor, die durch Vermehrung auf unterschiedlichen Zellkulturen gewonnen wurden. Trotz Zentrifugation ist nicht auszuschließen, dass Detritus noch in der Virussuspension vorhanden ist und dieser in der Bestrahlung bzw. Vernebelung einen Einfluss auf z.B. UV C-Absorption, Radikalbildung, etc. haben könnte. Da für die Virusanzucht unterschiedliche Medien verwendet wurden, kann folglich auch die Medienzusammensetzung (z.B. ein höherer Salz- bzw. Proteingehalt) zu einem unterschiedlichen Antrocknungsverhalten führen und so die Wirksamkeit der jeweiligen Desinfektionsmethode beeinflussen.

Sowohl bei der aPES-Trockenvernebelung als auch bei der UV C-Bestrahlung konnten in einigen Fällen Unterschiede in der Inaktivierungseffizienz bezüglich der Viren auf den verschiedenen Materialien nachgewiesen werden, welche im Falle der Trockenvernebelung, aufgrund der hohen Wirksamkeit der Methode, weniger ins Gewicht fielen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten oberflächenbedingten Unterschiede wurden auch in anderen Untersuchungen beschrieben. In der Studie von Maquart und Marlet (2002) wurden Stahl, Plastik, Papier, Tuch und Pappe mit Virus beladen und anschließend sowohl mit einem LED-Strahler ( $44,7 \text{ mJ/cm}^2$ ) als auch einem Quecksilberstrahler ( $92,85 \text{ mJ/cm}^2$ ) für 5 s, 15 s, 30 s und 60 s behandelt. Bei den Inaktivierungsversuchen auf Plastik war der Quecksilberstrahler stets effizienter. Im Vergleich dazu erzielten die Bestrahlungen der restlichen Materialien unterschiedliche Ergebnisse. So zeigte die Behandlung mit dem Quecksilberstrahler nach 15 s auf dem Tuch eine höhere Reduktion als die LED-Strahler. Wohingegen die Papierbehandlung durch die LED-Strahler nach 15 s eine höhere Wirksamkeit als die Quecksilberstrahler erwies (Maquart und Marlet, 2022). Wie bereits bezüglich des Phagen erwähnt, sind diese Unterschiede primär auf die Benetzbarkeit der Oberfläche zurückzuführen. Diese hat einen deutlichen Einfluss auf die Antrocknung der ausgebrachten Suspension auf den jeweiligen Materialien. Prinzipiell gilt dabei, je geringer die Oberflächenenergie des Materials bzw. die Polarität der Oberfläche ist, desto schlechter kann die Oberfläche benetzt werden. Dementsprechend handelt es sich bei der Oberflächenenergie um ein Maß der Hydrophilie bzw. Lipophilie des Materials. Edelstahl und Glas besitzen dabei eine hohe Oberflächenenergie, was das Anheften von Virus begünstigt. Plastik weist demgegenüber eine niedrige Oberflächenenergie auf, weswegen sich das Virusmaterial rasch als Tropfen zusammenzieht (Lamilux, 2023). Die dadurch entstehende höhere Schichtdicke hat sowohl einen Einfluss auf die Antrocknung als auch auf die Wirksamkeit der nachfolgenden Desinfektion. Als Folge dessen konnte in den Versuchen nicht immer sichergestellt werden, dass durch den gebildeten Tropfen und die damit erhöhte Schichtdicke die aufgebrachte

Suspension auch vollständig trocknete oder ob innerhalb des Tropfens noch Restfeuchtigkeit vorhanden war, wodurch die Inaktivierungseffizienz zusätzlich beeinflusst wurde. Darüber hinaus kann auch das unterschiedliche Oberflächenprofil der Keimträger einen weiteren Einflussfaktor darstellen. So erwiesen sich die Glas- und PVC-Keimträger als makroskopisch glatt, wohingegen die Edelstahlkeimträger leichte Unebenheiten durch Kratzer zeigten.

### 6.1.2 Anwendungs- und Anwenderfreundlichkeit

Bei den Trockenvernebelungsversuchen wurde mit einer maximalen Konzentration von 0,125 % aPES gearbeitet, was 1250 ppm entspricht. Die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) liegt für aPES bei 0,1 ppm, weshalb ein Atemschutz bei den Versuchen anzulegen ist. Darüber hinaus ist während der Herstellung der PES-Verdünnung ebenso das Arbeiten unter einem Abzug mit Schutzkleidung vorgesehen, da es bei Kontakt mit der unverdünnten Lösung zu Hautrötungen, Augenreizungen, Tränenfluss oder Reizungen der Atemwege kommen kann (Flemming, 1984). Abhängig von der Konzentration kann PES Materialien wie Metalle oder Kunststoffe angreifen und Rückstände hinterlassen (Mücke, 1970). Aufgrund des trockenen Aerosolisierungsverfahrens, bei dem eine relative Luftfeuchtigkeit von maximal 95 % rH nicht überschritten wurde, kam es auf den behandelten Oberflächen zu keiner sichtbaren Kondensation und somit zu keinerlei Korrosion o.ä. Die Handhabung der Methode ist prinzipiell einfach, allerdings dauert das Verfahren drei Stunden mit anschließender Belüftungsphase. Wie bereits erwähnt, kann die Länge der Einwirkzeit bei einer Desinfektion von viralen Erregern aber deutlich verkürzt werden. Lediglich bei der Anwendung gegenüber Mykobakterien und Sporen scheint eine längere Einwirkzeit einen entscheidenden Einfluss auf den Desinfektionsprozess zu haben. Um die relative Luftfeuchtigkeit über die gesamte Einwirkzeit im wirksamen Bereich zwischen 85-95 % zu halten, muss in wiederkehrenden Abständen aPES durch das Dry Fog-Gerät und den Kompressor ausgebracht werden. Ein Betreten des Raumes ist dabei durch die Nutzung funkferngesteuerter Steckdosen und Funksensoren nicht notwendig. Allerdings stellt eine zu hohe initiale relative Luftfeuchtigkeit am Versuchstag ein größeres Problem dar. Das Protokoll sieht vor, aPES solange zu vernebeln bis eine Luftfeuchtigkeit von maximal 95 % rH erreicht wird. Wenn die vorhandenen raumlufftechnischen Anlagen über keine Entfeuchtungsfunktionen verfügen, kann an feuchten Tagen die Ausgangsluftfeuchtigkeit schon sehr hoch sein, sodass folglich weniger Desinfektionsmittel vernebelt werden kann und damit eine niedrigere Wirksamkeit erzielt wird.

Auch die Arbeit mit UV C-Strahlung kann gesundheitsschädigende Wirkungen haben, die sich in Form eines akuten oder chronischen Leidens manifestieren. Zu den akuten Schäden zählen Entzündungen der Horn- und Bindehaut sowie Erytheme der Haut. Bei den chronischen

Erkrankungen kann es zu Hautkrebs oder grauen Star kommen (BAuA, 2023c; BfS, 2023). Dabei gilt, je kurzwelliger die Strahlung ist, desto geringer ist die Eindringtiefe, weshalb Strahler mit einer Wellenlänge von 222-230 nm für die Bestrahlung von Haut und Auge in Betracht gezogen werden können (BfS, 2023; Glaab *et al.*, 2021; Zwicker *et al.*, 2022). Generell muss der UV C-Strahler die Mindestanforderungen nach DIN EN ISO 15858, im Sinne des Strahlenschutzes, einhalten. Durch die Anwendung von LEDs, wie sie bei dem verwendeten 233- und 270 nm-LED-Strahlern zum Einsatz kamen, ist das Risiko einer Quecksilberkontamination und einer folglich möglichen Vergiftung nicht mehr gegeben (Campana *et al.*, 2023). Allerdings war vor jedem Versuch die emittierte Strahlungsstärke der LEDs zu prüfen. Um die Lebensdauer der LEDs zu steigern, musste zusätzlich bei jeder Verwendung ein Kühlgerät zur Begrenzung der Betriebstemperatur angeschlossen werden. Darüber hinaus erwies sich das Gerät als klein, kompakt und robust, sodass ein Transport aus und in die MSW problemlos möglich war. Die LED-Strahler können im Gegensatz zur Quecksilberlampe auch spontan an- und ausgeschaltet werden und erreichen beim Anschalten zügiger die geforderte Strahlungsdosis (Beck *et al.*, 2017).

Die Verwendung des Plasmastrahlers war am einfachsten. Das mobile Gerät besitzt einen Akku, der vor den Behandlungen geladen wurde und erst am Ende des Versuchstags erneut angeschlossen werden musste (Ladezeit  $\approx$  6-8 Stunden). Der kleine und kompakte Plasmastrahler verfügte lediglich über einen Einschaltknopf. Nach Betätigung dessen konnte die Probe für eine Minute bestrahlt werden. Umständlich war jedoch, dass für längere Strahlzeiten der Knopf jeweils nach dieser Minute erneut betätigt werden musste, was die Arbeit mit einer Bestrahlungszeit über 20 min erschwerte. Darüber hinaus waren keine Kontrollen der Leistungsfähigkeit möglich, weswegen etwaige Wirksamkeitsverluste, die auf technische Probleme des Gerätes zurückzuführen sind, nicht detektierbar waren. Außerdem konnten auch keine Veränderungen der Frequenz, Spannung oder Leistung vorgenommen werden, weshalb weitere Einstellungen mit einer möglichen höheren Wirksamkeit nicht getestet wurden.

### 6.1.3 Wirksamkeit über die Zeit und Stabilität

Das hier angewendete Trockenvernebelungsprotokoll beinhaltete stets eine Konditionierungsphase, eine 3 stündige Einwirkzeit sowie eine anschließende Belüftungsphase. Wie bereits von Schinköthe *et al.* (2021) dargestellt, kann bei einer Desinfektion von Viren die Einwirkzeit jedoch verkürzt werden. Da PES sehr schnell zerfällt, müssen Verdünnungen vor jeder Trockenvernebelung frisch angesetzt werden (Mücke, 1970). Hohe Temperaturen beschleunigen dabei diesen Prozess (Bützer, 2012). Bedingt durch die

chemische Instabilität, wird Peroxyessigsäure sehr selten als Reinsubstanz, sondern im Gemisch mit Essigsäure, Wasserstoffperoxid und Wasser verwendet. Bei dieser verdünnten Lösung wird im Gegensatz zur Reinsubstanz die Zerfallsreaktion bei 15,6°C um etwa einen Faktor 50 verlangsamt und damit die Halbwertszeit von 1,6 auf 77 h erhöht (Bützer, 2012). Darüber hinaus zeigt PES durch unspezifische Oxidationen von Proteinen einen starken Eiweiß- und Blutfehler (Rheinbaben und Wolff, 2002a).

Bei den Arbeiten mit den UV-Strahlern zeigten sich hinsichtlich der Wirksamkeit erhebliche Unterschiede, welche primär auf die jeweilige emittierte Strahlungsstärke und Wellenlänge zurückzuführen sind. So waren zum Erreichen einer Strahlungs-dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> im Falle des 254 nm-Quecksilberstrahlers lediglich nur  $\approx 1,5$  min notwendig, während für den 270 nm-LED-Strahler  $\approx 3$  min und mit dem 233 nm-LED-Strahler sogar  $\approx 7$  min benötigt wurden. Dementsprechend konnten mit dem 254 nm-Quecksilberstrahler auch die höchsten Titerreduktionen erzielt werden, wobei dieser auch zeiteffizienter als die LED-Strahler arbeitete. Dies wurde auch in der Arbeit von Gerchman *et al.* (2020) bestätigt. Zusätzlich nahm die gemessene Strahlungsstärke der LED-Strahler über den Versuchszeitraum kontinuierlich ab, sodass diese mehrmals wieder ersetzt werden mussten. In Anbetracht dieser mäßigen Lebensspanne handelt es sich hierbei um ein wartungsintensives Verfahren.

Bei den Plasmabestrahlungen der Edelstahlkeimträger wurden als Bestrahlungszeiten 1 min, 5 min, 10 min und 20 min festgelegt. Ausschließlich für MNV konnte bei 20 min eine Reduktion  $\geq 1 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml gezeigt werden, was deutlich unter dem geforderten Grenzwert von  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml lag. Bei dieser Methode konnte nur eine geringe Wirkungssteigerung mit zunehmender Bestrahlungszeit festgestellt werden (Abb. 20). Auch Ahlfeld *et al.* (2015) konnten in ihrer Studie zur Inaktivierung von Noroviren in einer Stuhlsuspension nur eine geringe Erhöhung der Wirksamkeit über die Zeit feststellen. Der Titer der Suspension mit  $2,36 \times 10^4$  Genomäquivalente/ml konnte nach einer Bestrahlungszeit von 1 min um  $0,5 \log_{10}$ , 5 min um  $\approx 0,8 \log_{10}$ , 10 min um  $\approx 1,25 \log_{10}$  und nach 20 min um  $\approx 1,75 \log_{10}$  reduziert werden (Ahlfeld *et al.*, 2015).

#### 6.1.4 Umweltverträglichkeit, Nachhaltigkeit und Wirtschaftlichkeit

Die Trockenvernebelung von aPES wird als Alternative zu Formaldehyd- bzw. Wasserstoffperoxidbegasung gesehen. Formaldehyd gilt als schwer gesundheitsschädigend und ist sowohl ätzend, giftig, allergen und krebserregend (Gregersen und Roth, 2012). Nach der Behandlung mit Formaldehyd muss dieses mit Ammoniak neutralisiert werden, wodurch Nebenprodukte als weißer Niederschlag auftreten (Reiche *et al.*, 2020). Folglich wurde in anderen Studien versucht, Formaldehyd durch Wasserstoffperoxidbegasungen zu ersetzen.

Dies ist eine sichere Alternative zu Formaldehyd, zeigt aber Schwächen in der Inaktivierung von Mykobakterien und Bakteriensporen, weswegen häufig die Peroxyessigsäure als zu vernebelndes DM eingesetzt wird (Gregersen und Roth, 2012). Diese zersetzt sich binnen 24 h in Essigsäure, Sauerstoff und Wasser, was im Vergleich zu Formaldehyd deutlich umweltverträglicher ist (Gregersen und Roth, 2012; Schubert, 2016d). Von Vorteil ist jedoch, dass bislang keine Resistenz von Mikroorganismen gegenüber PES festgestellt wurde (Flemming, 1984). Hinsichtlich der Wirtschaftlichkeit bleibt festzuhalten, dass das eingesetzte Desinfektionsmittel Lerasept® kostengünstig zu erwerben ist. Größere Investitionen müssen einmalig mit dem Mini Dry Fog-Gerät, den Funksensoren sowie dem Kompressor getätigt werden.

Die eingesetzten UV C-LED-Strahler sind im Gegensatz zu den herkömmlich verwendeten Quecksilberstrahlern wesentlich umweltfreundlicher. Im Laufe der letzten Jahre unterlagen die LEDs einer ständigen Weiterentwicklung hinsichtlich des Stromverbrauchs bzw. der Leistung, sodass diese nun kleiner und robuster sowie stromsparender sind (Beck *et al.*, 2017). Des Weiteren besteht bei den Arbeiten mit den LED-Strahlern kein Kontaminationsrisiko durch das toxische Quecksilber (Campana *et al.*, 2023). Im Vergleich zu den Quecksilberlampen produzieren LEDs kein Ozon, wodurch Ab- und Zuluft nicht kontrolliert werden müssen (IFAM, 2023). Jedoch konnten bereits Resistenzbildungen von Bakterien gegenüber UV-Strahlung festgestellt werden (Arrage *et al.*, 1993; Paulino-Lima *et al.*, 2016; Pullerits *et al.*, 2020). Die UV C-Strahler sind mit Blick auf die Wirtschaftlichkeit nur bedingt einsetzbar. Über die Versuche hinweg konnte bereits ein Abfall der Strahlungsstärke mancher LEDs festgestellt werden, die folglich erneuert werden mussten. Darüber hinaus sind LEDs mit einer Wellenlänge nahe dem Absorptionsmaximum von DNA und RNA bei 260 nm in der Beschaffung kostenintensiver und deutlich kurzlebiger als LEDs mit höheren Wellenlängen (ams-OSRAM International GmbH, 2023; Gerchman *et al.*, 2020).

Hinsichtlich der Umweltverträglichkeit ist bei der Verwendung des getesteten Kaltplasmagerätes hervorzuheben, dass lediglich Luft als Trägergas und keine weiteren Gase oder Chemikalien benötigt werden (Terraplasma, 2023). Während des Betriebes wird zwar eine sehr schwache UV-Strahlung emittiert, welche für den Anwender bei entsprechend geprüften Geräten jedoch unbedenklich ist. Da diese Geräte für eine *in vivo*-Anwendung konzipiert und zugelassen sind, erzeugt das Gerät keine hohen Temperaturen, sodass es zu keiner Schädigung behandelter Materialoberflächen kommen kann. Ähnlich wie bei der PES ist auch hier von Vorteil, dass bislang noch keine Resistenzbildungen beschrieben wurden (Karrer und Arndt, 2015). Das Plasmagerät war in der Anschaffung vergleichsweise günstig.

Da aber keine Eigenkontrolle der Geräteeinstellungen durchgeführt werden konnten, können keine Aussagen über Wartung und Langlebigkeit getätigt werden.

## 6.2 Untersuchung der Eignung lebender Oberflächen (Monolayerkulturen und 3D-Schleimhautmodell) zur Testung alternativer Oberflächendesinfektionsverfahren

Da der Kaltplasmastrahler und der UV C-LED-Strahler mit einer Wellenlänge von 233 nm primär als Desinfektionsmethode für Haut und Schleimhaut vorgesehen sind, wurde die Reduktion von Viren nicht nur auf den zuvor beschriebenen unbelebten Oberflächen, sondern auch auf einer 3D-Schleimhaut- und einer 2D-Monolayerzellkultur untersucht. Das 3D-Schleimhautmodell ähnelt dabei der oralen Mukosa. Dieses System liegt in einem geschlossenen Verbund und in einer Schichtdicke von 150 µm vor, weswegen davon auszugehen ist, dass der gesamte Zellverbund insgesamt eine höhere Tenazität gegenüber äußeren Einflüssen aufweist als einschichtige Zellkulturen. Es handelt sich um ein 8-12 schichtiges, unverhorntes Plattenepithel, an dem Sensibilitätsuntersuchungen unter physiologisch- und *in vivo*-ähnlichen Bedingungen dargestellt werden können. Durch die Zugabe von Calciumchlorid (3D-Medium B) entsteht eine Differenzierung der einzelnen Schichten in kubische Basalzellen, ein Stratum intermedium und ein abgeflachtes Stratum superficiale. Darüber hinaus hat das Modell die Qualitätskontrolle der OECD Guidelines bestanden und kann somit als Alternative zu Tierversuchen eingesetzt werden (Zwicker *et al.*, 2023). Dennoch gibt es Limitierungen des Modells, da es sich um eine Krebszelllinie handelt und diese andere Eigenschaften als gesunde Zellen hinsichtlich Zellteilung, Wundheilung oder Vitalität aufweist (Zwicker *et al.*, 2023). Aufgrund der unebenen Oberfläche der Schleimhaut, möglicher Lücken zwischen den Zellen sowie daraus resultierender Bereiche, die von der Strahlung nicht direkt erreicht werden können, stellt diese Oberfläche eine große Herausforderung für eine Bestrahlung dar. Eine Limitierung dieser Zellkulturmodelle stellt auch die begrenzte Auswahl geeigneter viraler Testorganismen dar, welche in der Lage sind, die Zellen zu infizieren. Von den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Testviren konnte einzig eine Adaptation mit VSIV an das 3D-Modell durchgeführt werden. In parallel durchgeführten Versuchen mit Bakterien dienten die *in vivo*-Modelle lediglich als Testoberfläche. Vergleichbar könnten natürlich auch nicht permissive Testviren aufgebracht, behandelt und anschließend auf geeignete andere suszeptible Zelllinien zur Titration übertragen werden. Da die beiden eingesetzten Geräte jedoch explizit für die *in vivo*-Behandlung einer Infektion vorgesehen sind, wurde bei den durchgeführten Versuchen auf diese Methode bewusst verzichtet. Nur so ist es möglich, neben der direkten antiviralen Wirksamkeit auch eine eventuelle indirekte Wirksamkeit, in Folge einer behandlungsbedingten Zellstimulation, mitzubetrachten.

Durch die Kaltplasma- und UV C-Bestrahlung von Zellkulturen kommt es vermehrt zur Entstehung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (de Jager *et al.*, 2017), welche auch physiologisch im Organismus vorkommen und dort unterschiedliche Systeme z.B. Blutbildung, Ventilation oder Gefäß- und Muskeltonus regulieren (Droge, 2002). Hohe Konzentrationen zeigen antimikrobielle Effekte. Durch diese werden Schutz- und Reparaturmechanismen im Körper angeregt, die zum Beispiel zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Antioxidantien, zum Einleiten der Apoptose, zur Anregung der Angiogenese und des Wundverschlusses führen (Droge, 2002). Um die Auswirkungen der Bestrahlung auf die belebten Oberflächen zu detektieren, wurde neben der mikroskopischen Sichtkontrolle ein MTT-Test zur Bestimmung der Zellvitalität durchgeführt. Im Rahmen der UV C-Bestrahlung mit der Wellenlänge von 233 nm konnte bereits bei der niedrigsten getesteten Strahlungsdosis von 20 mJ/cm<sup>2</sup> mikroskopisch ein zytotoxischer Effekt auf der 2D-Monolayerkultur dargestellt werden (Tab. 9). Dieser wurde anhand des MTT-Tests bestätigt (Abb. 19). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass eine Bestrahlung der Kulturen eine größere Abnahme der Zellvitalität nach sich zog als eine ausschließliche Virusinfektion, ohne jegliche Bestrahlung (PK). Im Gegensatz dazu zeigte die 3D-Kultur weder nach der Bestrahlung noch durch die Virusinfektion mit anschließender Bestrahlung eine signifikante Abnahme der Zellvitalität (Abb. 19). Darüber hinaus konnten auch Aussagen zur viruziden Wirksamkeit getroffen werden. So erzielte bereits eine Strahlungsdosis von 60 mJ/cm<sup>2</sup> eine Reduktion von mehr als 4 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml (Abb. 18). Da sowohl ein bis vier Tage nach dem Versuch kein infektiöser Überstand gewonnen wurde und auch keine signifikante Abnahme der Zellvitalität festgestellt werden konnte, kann sogar von einer vollständigen Inaktivierung des Testvirus ausgegangen werden. Damit zeigte der 233 nm-Strahler eine signifikant höhere Wirksamkeit auf belebten Oberflächen als in den Keimträgerversuchen. Diese Wirksamkeitssteigerung könnte durch das Auftreten zusätzlicher Brechungseffekte innerhalb der vorhandenen Restflüssigkeit zurückzuführen sein. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Maquart und Marlet (2022) bei UV C-Untersuchungen von unangetrockneten Virussuspensionen auf verschiedenen Oberflächen. Dabei reichte bereits eine Strahlungsdosis von 7,14 mJ/cm<sup>2</sup> bei einer Bestrahlungszeit von 5 s für eine Inaktivierung von über 6 log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml von SARS-CoV-2 aus (Maquart und Marlet, 2022). Durch die Verhinderung einer Infektion des 3D-Modells in Folge der Behandlung liegt die Vermutung nahe, dass dies als Resultat des Zusammenspiels der viruziden Wirksamkeit der UV C-Strahlung sowie der durch diese in den Zellen ausgelösten Prozesse ist. Während der einschichtige Zellrasen nach der 233 nm-Behandlung deutliche Schäden aufwies, wurden aufgrund der geringen Eindringtiefe vermutlich nur wenige obere Zellschichten des 3D-Modells angegriffen.

Die mikroskopische Beurteilung der Toxizitätskontrollen nach erfolgter Plasmabehandlung ergab keinen Nachweis eines cpE. (Abb. 21, Tab. 23). Überraschenderweise zeigte jedoch die Vitalitätsbestimmung mittels MTT-Test sowohl für die 2D- als auch für die 3D-Kultur eine signifikante Abnahme der Zellvitalität. Im Unterschied zur 2D-Kultur konnte allerdings für die 3D-Kultur durch eine Erhöhung der Bestrahlungszeit auch eine Steigerung der Virusreduktion für VSIV nachgewiesen werden (Abb. 22). Auch wenn in keinem Fall die geforderte  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml-Reduktion für VSIV erreicht werden konnte, zeigte dies, ähnlich wie zuvor bei der 233 nm-Strahlung, dass auch hier eine Steigerung der viruziden Wirksamkeit bei der Anwendung auf lebenden Oberflächen über die Einwirkzeit möglich ist. Ob diese primär durch das Auslösen zellulärer Immunabwehrmechanismen hervorgerufen wird, kann mit den vorliegenden Daten nur spekuliert werden. Zusammenfassend zeigte sich, dass das 3D-Schleimhautmodell bedeutend resistenter gegenüber der Bestrahlung durch UV C und Kaltplasma ist und sich somit besser als Testoberfläche eignet als die herkömmlichen Monolayerkulturen.

### 6.3 MS 2 als Surrogaterreger für unbehüllte Viren

Neben den in den Richtlinien empfohlenen Testorganismen für unbehüllte RNA-Viren (MNV und HPV-1) wurde zusätzlich der MS 2 Bakteriophage in dieser Arbeit untersucht. Dabei konnte die aPES-Vernebelung auf Edelstahl ähnliche Ergebnisse für MNV und MS 2 erzielen. Im Vergleich zu den anderen getesteten Viren wurde während der UV C-Bestrahlung für den MS 2 Phagen die höchste Tenazität ermittelt. Im Zuge der UV C-Behandlung wurde außerdem das in den Richtlinien empfohlene Humane Poliovirus Typ-1 untersucht. Dieses wies gegenüber der UV-Strahlung nur eine geringe Tenazität auf, sodass bei 254 nm und 270 nm bereits vergleichbare Strahlungsdosen für die geforderte  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml-Reduktion wie für die untersuchten behüllten Testviren ausreichend waren. Bezüglich der Untersuchungen mit dem 233 nm-Strahler war HPV-1 das einzige aller eingesetzten Testviren, welches auf Edelstahl wirksam inaktiviert werden konnte (Abb. 17). Zusammenfassend zeigt sich, dass der MS 2 Bakteriophage in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit getesteten alternativen Oberflächendesinfektionsverfahren eine deutlich höhere Tenazität aufwies als die anderen eingesetzten und in den Richtlinien und DIN-Normen vorgesehenen unbehüllten Testviren. Hervorzuheben ist auch die einfache Handhabung des MS 2 Phagen, da weder für die Anzucht noch für den Nachweis eine entsprechende Zellkultur benötigt wurde. Darüber hinaus ist eine lange Lagerung im Kühlschrank möglich, ohne dass Titerverluste auftreten. Dementsprechend einfach sind auch mögliche Transporte, da dabei kein Trockeneis verwendet werden muss. Auch hinsichtlich der Auswertung zeigten sich Unterschiede. So konnte der MS 2-Titer bereits nach einer Inkubationszeit von einem Tag abgelesen werden, wohingegen dies bei HPV-1 erst

nach vier und bei MNV erst nach fünf Tagen möglich war. Des Weiteren bergen Bakteriophagen keine Gefahr für Mensch, Tier oder Umwelt und werden daher der Risikogruppe 1 zugeordnet (BAuA, 2012), wodurch eine Nutzung als Referenzkeim bei Desinfektionsmaßnahmen außerhalb von Laborräumen möglich ist.

#### 6.4 BCoV als Surrogaterreger für SARS CoV-2

Hinsichtlich der behüllten Viren wurden u.a. die ssRNA-Coronaviren (FCoV, BCoV und SARS CoV-2) untersucht. Dabei zeigte das zu den Alphacoronaviren gehörende feline Coronavirus (King *et al.*, 2011e) sowohl bei der aPES-Vernebelung als auch bei der UV C-Bestrahlung die geringsten Tenazitäten. Demgegenüber erwies sich das bovine Coronavirus (BCoV) als deutlich resistenter. Die Behandlung von SARS CoV-2 zeigte dabei höhere Tenazitäten als FCoV, jedoch niedrigere als BCoV (Abb. 11, 13 und 14). Insbesondere die Stabilität der beiden Betacoronaviren SARS CoV-2 und BCoV (King *et al.*, 2011e) gegenüber der aPES-Trockenvernebelung zeigte vergleichbare Resultate. Dabei ist hervorzuheben, dass die für eine wirksame Desinfektion erforderliche aPES-Konzentration für BCoV und SARS CoV-2 vergleichbar bzw. teilweise höher war als für einige der unbehüllten Viren. Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass BCoV hinsichtlich seiner Tenazitätseigenschaften ein geeigneter Surrogaterreger für SARS CoV-2 ist. Ob sich dies auch im Falle anderer Desinfektionsmittel identisch verhält, muss zuvor jeweils geprüft werden. Darüber hinaus ist BCoV laut der TRBA 462 in die Risikogruppe 1 mit dem Hinweis der Übertragbarkeit auf empfängliche Tierarten t2 gelistet, während SARS CoV-2 ein hohes zoonotisches Potenzial aufweist und daher in die Risikogruppe 3 eingeordnet ist (BAuA, 2023a).

## 7 Zusammenfassung

### **Viruzider Wirksamkeitsvergleich der Oberflächendesinfektion mittels aerosolierter Peroxyessigsäure (aPES) sowie Bestrahlung mit UV C-LED oder Kaltplasma**

Ziel dieser Studie war es, die viruzide Wirksamkeit von alternativen Desinfektionsverfahren für Oberflächen, ohne den Einsatz von Feucht- und Wischdesinfektion, zu ermitteln. Dabei wurde die Anwendung der Trockenvernebelung aerosolierter Peroxyessigsäure (aPES), UV C-LED-Strahlung bei 233 und 270 nm sowie einer UV C-Quecksilberlampe bei 254 nm und Kaltplasmastrahlung untersucht. Für diesen Zweck wurden unbelebte Oberflächen wie Edelstahl, Glas und PVC gegenüber einem breiten Erregerspektrum aus behüllten und unbehüllten Viren getestet. Die Auswahl geeigneter Viren erfolgte einerseits anhand der DVV-RKI-Leitlinien, der DVG-Leitlinien und der DIN EN 17272:2020. Andererseits wurden gezielt noch weitere Viren (MS 2 Bakteriophage, Bovines Coronavirus) ausgewählt und hinsichtlich ihrer Eignung als Surrogate untersucht. Zur jeweiligen Anwendung der einzelnen Methoden wurden entsprechende Keimträger aus den unterschiedlichen Materialien eingesetzt, auf denen die virushaltigen Suspensionen angetrocknet wurden. Die anschließende Quantifizierung des Desinfektionserfolges erfolgte durch Abspülen der Keimträger und nachfolgender Titration auf empfänglichen Zellkulturen. Da sowohl der UV C-LED-Strahler mit einer Wellenlänge von 233 nm als auch der Kaltplasmastrahler primär für die Desinfektion von belebten Oberflächen vorgesehen sind, wurde deren zytotoxisches Potenzial sowie die antivirale Wirksamkeit auch auf 2D-Monolayerkulturen und einem etablierten 3D-Schleimhautmodell getestet. Dabei können die erzielten Ergebnisse zu folgenden Kernaussagen zusammengefasst werden:

- Die aPES-Trockenvernebelung wies eine hohe Wirksamkeit und einfache Durchführung, allerdings im Vergleich mit den anderen hier getesteten Methoden einen etwas höheren Kosten- und Zeitaufwand auf. Insgesamt ist es als ein sehr effizientes und robustes Desinfektionsverfahren zu bewerten.
- Die Bestrahlung mit dem LED-Strahler bei 270 nm und der Quecksilberlampe bei 254 nm erbrachte vergleichbar hohe Virustiterreduktionen, welche jedoch vom Quecksilberstrahler bereits bei niedrigeren Strahlungsdosen und Bestrahlungszeiten erreicht wurde.
- Die UV C-LED-Bestrahlung mit der Wellenlänge von 233 nm wurde nur bis zu einer Strahlungsdosis von 80 mJ/cm<sup>2</sup> eingesetzt und erzielte auf unbelebten Oberflächen keine ausreichende viruzide Wirksamkeit, mit Ausnahme des humanen Poliovirus Typ 1 auf Edelstahlkeimträgern.

- Mit Blick auf die Behandlung von belebten Oberflächen, in Form einer 3D-Kultur, erreichte der 233 nm-Strahler bereits bei 60 mJ/cm<sup>2</sup> die geforderte Reduktion des eingesetzten Testvirus. Auf der anderen Seite konnte mithilfe der 2D-Monolayerkultur auch die zytotoxische Wirkung anhand massiver Zellschädigung beobachtet werden, welche im Falle des 3D-Zellkulturmodells deutlich schwächer ausfiel.
- Der Kaltplasmastrahler zeigte bei der Bestrahlung von unbelebten Oberflächen nur eine geringe Wirksamkeit und erzielte kaum messbare Virusreduktionen. Diese fielen bei den Testungen auf der 3D-Schleimhautkultur zwar erheblich höher aus, verfehlten aber mit einer maximalen Reduktion von  $2,30 \pm 0,19 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  die geforderten  $\geq 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  deutlich. Obwohl in den behandelten 2D-Monolayerkulturen mikroskopisch keine zytotoxische Wirkung nach der Kaltplasmabehandlung zu erkennen war, zeigte der durchgeführte MTT-Test eine signifikante Abnahme der Zellvitalität sowohl im 2D- als auch im 3D-Zellkulturmodell.
- Neben der aPES-Trockenvernebelung zeigte der MS 2 Bakteriophage auch bei der UV C-Bestrahlung jeweils die höchste Tenazität. Aufgrund seines einfachen Umgangs, dem nicht vorhandenen zoonotischen und umweltgefährdenden Potenzial und der daraus resultierenden Zuordnung in die Risikogruppe 1, bietet sich dieser als ein geeigneter Surrogaterreger für unbehüllte Viren zur Durchführung von Desinfektionsmethoden an.
- Im Vergleich der beiden phylogenetisch vergleichbaren Vertreter der Betacoronaviren erwies sich das bovine Coronavirus (BCoV) in den getesteten Desinfektionsmethoden resistenter als SARS CoV-2. Da es außerdem nur ein äußerst geringes zoonotisches Potenzial aufweist und daher in die Risikogruppe 1 eingeordnet wird, ist es ein idealer Surrogaterreger für SARS CoV-2.

## 8 Summary

### **Virucidal efficacy comparison of surface disinfection using aerosolized peroxyacetic acid (aPAA), irradiation with UV C-LED or cold plasma**

The aim of this study was to assess the virucidal efficacy of alternative disinfection methods for surfaces without the use of wet and wipe disinfection. The application of dry fogging of aerosolized peroxyacetic acid (aPAA), UV C-LED radiation at 233 and 270 nm as well as a UV C mercury lamp at 254 nm and cold plasma radiation were investigated. For this purpose, inanimate surfaces such as stainless steel, glass and PVC were tested regarding a broad spectrum of enveloped and non-enveloped viruses. Suitable viruses were selected on the basis of the DVV-RKI guidelines, DVG guidelines and DIN EN 17272:2020 while other viruses (MS 2 bacteriophage, bovine coronavirus) were also specifically chosen and examined with regard to their suitability as surrogates. For the application of the individual methods, corresponding germ carriers made of the different materials were used, on which the virus-containing suspensions were dried. The quantification of the disinfection success was carried out by rinsing the germ carriers and subsequent titration on susceptible cell cultures. Because the UV C-LED radiator with a wavelength of 233 nm and the cold plasma radiator are primarily intended for the disinfection of living surfaces, their cytotoxic potential and virucidal efficacy were also tested on 2D monolayer cultures and an established 3D mucosa model.

The following conclusions were drawn:

- aPAA dry fogging was highly effective and easy to use, but was more costly and time-consuming than the other methods tested here. Overall, it can be rated as a very efficient and robust disinfection method.
- UV C irradiation with the LED radiator at 270 nm and the mercury lamp at 254 nm resulted in comparably high virus titer reductions, which were already achieved by the mercury lamp at lower radiation doses and irradiation times.
- UV C irradiation with a wavelength of 233 nm was only used up to a radiation dose of 80 mJ/cm<sup>2</sup> and did not achieve a sufficient virucidal efficacy on inanimate surfaces, with the exception of human poliovirus type 1 on stainless steel carriers.
- Regarding the treatment of living surfaces, the 233 nm radiator already achieved the required reduction of the test virus used at 60 mJ/cm<sup>2</sup> on a 3D culture. In contrast, using the 2D monolayer culture enables the identification of a strong cytotoxic effect in form of massive cell damage, that was significantly less in the 3D culture.
- The cold plasma radiator was weakly effective when irradiating inanimate surfaces and achieved barely measurable virus reductions. Although this was considerably higher

reductions in the tests on the 3D mucosal culture, the maximum reduction of  $2.30 \pm 0.19$   $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml was significant below the required  $\geq 4$   $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Even if no cytotoxic effect could be seen microscopically in the treated 2D monolayer cultures, the MTT test showed a significant decrease in cell viability in the 2D and the 3D cell culture model.

- Beside the aPAA dry fogging, the MS 2 bacteriophage showed the highest tenacity, even at the UV C irradiation. Due to the simple handling, the absence of zoonotic and environmentally hazardous potential resulting in the assignment in risk group 1, it is a suitable surrogate for non-enveloped viruses for the performance of disinfection methods.
- In a comparison of the two phylogenetically comparable representatives of the betacoronaviruses, the bovine coronavirus (BCoV) proved to be more resistant than SARS CoV-2 in the tested disinfection methods. It also has only an extremely low zoonotic potential and is therefore classified in risk group 1, so seems it to be an ideal surrogate for SARS CoV-2.

## 9 Literaturverzeichnis

- Ahlfeld, B., Li, Y., Boulaaba, A., Binder, A., Schotte, U., Zimmermann, J.L., Morfill, G. und Klein, G. (2015). Inactivation of a foodborne norovirus outbreak strain with nonthermal atmospheric pressure plasma. *mBio*, 6(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02300-14>
- AirTechSystems. (2023). *Wie die ausreichende Strahlungsdosis sichergestellt werden kann*. abgerufen am 18.10.2023 um 11.46 Uhr <https://www.itg.de/produkte-dienstleistungen/itg-raumluftechnik/luftentkeimung/funktionsweise-der-uv-c-entkeimung/>
- All Cells®. (2023). *How to Count Cells and Determine Percent Viability Using the Trypan Blue Exclusion Method*. abgerufen am 27.10.2023 um 09.43 Uhr <https://allcells.com/resources-and-support/protocols/counting/>
- ams-OSRAM International GmbH. (2023). *Why are many UV-C LEDs today around 275nm and not at the peak effectiveness of 260 nm?*
- Antoine, G., Scheiflinger, F., Dorner, F. und Falkner, F.G. (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology*, 244(2), 365-396. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9123>
- Arrage, A.A., Phelps, T.J., Benoit, R.E. und White, D.C. (1993). Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Appl Environ Microbiol*, 59(11), 3545-3550. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3545-3550.1993>
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35, 235-241. <https://doi.org/10.1128/br.35.3.235-241.1971>
- BAuA. (2012). Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, TRBA (Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe) 462 - Einstufung von Viren in Risikogruppen. *Gemeinsames Mineiterialblatt (GMBI)*, Nr. 15-20, 1-73. abgerufen am 23.11.2023 um 14.34 Uhr [https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.baua.de/DE/Angebote/Regelwerk/TRBA/pdf/TRBA-462.pdf?__blob=publicationFile)
- BAuA. (2023a). Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Begründung zur Einstufung des Virus SARS-CoV-2 in die Risikogruppe3 und der Kennzeichnung mit "Z" und der englischen Version. *Beschluss 11/2023 des ABAS vom 24.05.2023*. abgerufen am 23.11.2023 um 14.27 Uhr [https://www.baua.de/DE/Die-BAuA/Aufgaben/Geschaeftsfuehrung-von-Ausschuessen/ABAS/pdf/SARS-CoV-2.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=4](https://www.baua.de/DE/Die-BAuA/Aufgaben/Geschaeftsfuehrung-von-Ausschuessen/ABAS/pdf/SARS-CoV-2.pdf?__blob=publicationFile&v=4)
- BAuA. (2023b). *Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Biozidprodukte im Entscheidungsverfahren*. abgerufen am 17.10.2023 um 13.20 Uhr [https://www.baua.de/DE/Themen/Anwendungssichere-Chemikalien-und-Produkte/Chemikalienrecht/Biozide/pdf/Biozidprodukte-im-Entscheidungsverfahren.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.baua.de/DE/Themen/Anwendungssichere-Chemikalien-und-Produkte/Chemikalienrecht/Biozide/pdf/Biozidprodukte-im-Entscheidungsverfahren.pdf?__blob=publicationFile)
- BAuA. (2023c). *Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, Welchen Beitrag kann UV-C-Strahlung zum Infektionsschutz leisten?* abgerufen am 18.10.2023 um 12.46 Uhr <https://www.baua.de/DE/Themen/Arbeitsgestaltung-im-Betrieb/Coronavirus/FAQ/FAQ-40.html>

- Beck, S.E., Ryu, H., Boczek, L.A., Cashdollar, J.L., Jeanis, K.M., Rosenblum, J.S., Lawal, O.R. und Linden, K.G. (2017). Evaluating UV-C LED disinfection performance and investigating potential dual-wavelength synergy. *Water Res*, 109, 207-216.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.11.024>
- Berg, J., Tymoczko, J., Gatto jr., G. und Stryer, L. (2018). Zusammensetzung und Struktur der Proteine. In J. Berg, J. Tymoczko, G. Gatto jr. und L. Stryer (Eds.), *Stryer Biochemie* (Vol. 8th edition, pp. 31-43). Springer Spektrum.
- Berridge, M.V. und Tan, A.S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), 474-482.  
<https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- BfS. (2023). *Bundesamt für Strahlenschutz, Desinfektion mit UV-C-Strahlung*. abgerufen am 18.10.2023 um 12.40 Uhr [https://www.bfs.de/DE/themen/opt/anwendung-alltag-technik/uv/uv-c-strahlung/uv-c-desinfektion\\_node.html](https://www.bfs.de/DE/themen/opt/anwendung-alltag-technik/uv/uv-c-strahlung/uv-c-desinfektion_node.html)
- Bodenschatz, W. (2006a). Grundbegriffe der Keimzahlverminderung. In W. Bodenschatz (Ed.), *Kompaktwissen Desinfektion - Das Handbuch für Ausbildung Praxis* (Vol. 3, pp. 65-71). Behr.
- Bodenschatz, W. (2006b). Ultraviolettstrahlen. In W. Bodenschatz (Ed.), *Kompaktwissen Desinfektion* (Vol. 3, pp. 108-110). Behr.
- Bunz, O., Mese, K., Funk, C., Wulf, M., Bailer, S.M., Piwowarczyk, A. und Ehrhardt, A. (2020). Cold atmospheric plasma as antiviral therapy - effect on human herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol*, 101(2), 208-215.  
<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001382>
- Bützer, P. (2012). Peroxyessigsäure: Einfach, aber wirksam-Ein sehr wirksames Desinfektionsmittel im Überblick *CLB Chemie in Labor und Biotechnik*, 3, 96-115.
- Calenberg. (2009). Innovative Betriebshygiene mit UVC. *Hygiene Report*, 5, 12-20. abgerufen am 23.11.2023 um 14.52 Uhr [https://www.ibm-merschbrock.de/veroeffentlichungen/pdf/Hygienerreport%2011\\_2009.pdf](https://www.ibm-merschbrock.de/veroeffentlichungen/pdf/Hygienerreport%2011_2009.pdf)
- Campana, R., Moroni, S., Paolucci, D., Federici, M., Casettari, L. und Frangipani, E. (2023). Efficacy of UV and UV-LEDs Irradiation Models for Microbial Inactivation Applicable to Automated Sterile Drug Compounding. *J Pharm Sci*, 112(9), 2389-2392.  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.07.008>
- CEN. (2015). Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika-Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich-Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 14675:2015. In.
- CEN. (2019). Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika-Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-poröser Oberflächen-Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 17122:2019. In.

- CEN. (2020). Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika-Verfahren zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren–Bestimmung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden, levuroziden, viruziden, tuberkuloziden und Phagen-Wirksamkeit; Deutsche Fassung EN 17272:2020. *DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)*, 1-73. <https://doi.org/10.31030/3071835>
- Chen, Z., Garcia, G., Jr., Arumugaswami, V. und Wirz, R.E. (2020). Cold atmospheric plasma for SARS-CoV-2 inactivation. *Phys Fluids (1994)*, 32(11), 111702. <https://doi.org/10.1063/5.0031332>
- Daeschlein, G., Scholz, S., Ahmed, R., von Woedtke, T., Haase, H., Niggemeier, M., Kindel, E., Brandenburg, R., Weltmann, K.D. und Juenger, M. (2012). Skin decontamination by low-temperature atmospheric pressure plasma jet and dielectric barrier discharge plasma. *J Hosp Infect*, 81(3), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2012.02.012>
- Deutsche Gesellschaft für Mundchirurgie; Kieferchirurgie und Gesichtschirurgie (DGMKG). (2022). Rationaler therapeutischer Einsatz von kaltem physikalischem Plasma. *S2k-Leitlinie AWMF online Das Portal der wissenschaftlichen Medizin*, 5-8. abgerufen am 23.11.2023 um 08.51 Uhr <https://register.awmf.org/assets/guidelines/007-1071-Rationaler-therapeutischer-Einsatz-von-kaltem-physikalischem-Plasma-2022-02.pdf>
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1), 47-95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- DSMZ. (2023). *Escherichia phage MS 2 - DSM 13767*. abgerufen am 20.11.2023 um 14.44 Uhr <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-13767>
- DVG. (2017). *Methoden der Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln für die Tierhaltung (Kapitel V), Viruzidie*. abgerufen am 22.11.2023 um 15.10 Uhr [https://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG\\_Desinfektion/Dokumente/Fuer\\_Gutachter/Pruefrichtlinien/V.4\\_Viruzidie\\_7Nov2017.pdf](https://www.desinfektion-dvg.de/fileadmin/FG_Desinfektion/Dokumente/Fuer_Gutachter/Pruefrichtlinien/V.4_Viruzidie_7Nov2017.pdf)
- Elsenhans. (2015). *Heilendes Plasma*. abgerufen am 11.12.2023 um 08.37 Uhr <https://m.thieme.de/viamedici/klinik-faecher-dermatologie-1532/a/heilendes-plasma-30127.htm>
- Europäisches Parlament und Europäische Union. (2012). Verordnung (EU) Nr. 528/2012 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. Mai 2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten. Zuletzt geändert durch Delegierte Verordnung (EU) 2021/807 der Kommission vom 10. März 2021. . *Amtsblatt der Europäischen Union*, 1-18.
- Filipic, A., Gutierrez-Aguirre, I., Primc, G., Mozetic, M. und Dobnik, D. (2020). Cold Plasma, a New Hope in the Field of Virus Inactivation. *Trends Biotechnol*, 38(11), 1278-1291. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.04.003>
- Flemming, H.C. (1984). Die Peressigsäure als Desinfektionsmittel - Ein Überblick. *Zbl. Bakt. Hyg I*, 179, 97-111.
- Freschney, J. (2016). Quantification. In J. Freschney (Ed.), *Culture of Animal Cells* (Vol. 6, pp. 335-339). Wiley-Blackwell.

- Fux, D. und Sexl, V. (2016). Desinfektionsmittel. In *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* (Vol. 4, pp. 513-523).
- Gabriel, H. und Brill, F. (2011). Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel im Lebensmittel- und Veterinärbereich nach Europäischen Normen (EN). *DVG Themenheft: "Desinfektion"*. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., 49-51.
- Gay-Mimbrera, J., Garcia, M.C., Isla-Tejera, B., Rodero-Serrano, A., Garcia-Nieto, A.V. und Ruano, J. (2016). Clinical and Biological Principles of Cold Atmospheric Plasma Application in Skin Cancer. *Adv Ther*, 33(6), 894-909. <https://doi.org/10.1007/s12325-016-0338-1>
- Gerchman, Y., Mamane, H., Friedman, N. und Mandelboim, M. (2020). UV-LED disinfection of Coronavirus: Wavelength effect. *J Photochem Photobiol B*, 212, 112044. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.112044>
- Glaab, J., Lobo-Ploch, N., Cho, H.K., Filler, T., Gundlach, H., Guttman, M., Hagedorn, S., Lohan, S.B., Mehnke, F., Schleusener, J., Sicher, C., Sulmoni, L., Wernicke, T., Wittenbecher, L., Woggon, U., Zwicker, P., Kramer, A., Meinke, M.C., Kneissl, M., Weyers, M., Winterwerber, U. und Einfeldt, S. (2021). Skin tolerant inactivation of multiresistant pathogens using far-UVC LEDs. *Sci Rep*, 11(1), 14647. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94070-2>
- Granicher, G., Tapia, F., Behrendt, I., Jordan, I., Genzel, Y. und Reichl, U. (2021). Production of Modified Vaccinia Ankara Virus by Intensified Cell Cultures: A Comparison of Platform Technologies for Viral Vector Production. *Biotechnol J*, 16(1), e2000024. <https://doi.org/10.1002/biot.202000024>
- Gränicher, H. (1996). *Messung beendet – was nun? Einführung und Nachschlagewerk für die Planung und Auswertung von Messungen*. vdf Hochschulverlag AG. 64-69
- Gregersen, J.P. und Roth, B. (2012). Inactivation of stable viruses in cell culture facilities by peracetic acid fogging. *Biologicals*, 40(4), 282-287. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2012.02.004>
- Hähnel, M., von Woedtke, T. und Weltmann, K.D. (2010). Influence of the Air Humidity on the Reduction of Bacillus Spores in a Defined Environment at Atmospheric Pressure Using a Dielectric Barrier Surface Discharge. *Plasma Processes and Polymers*, 7(3-4), 244-249. <https://doi.org/10.1002/ppap.200900076>
- Hartnack, S., Essbauer, S. und Truyen, U. (2008). Substitution of vaccinia virus Elstree by modified vaccinia virus Ankara to test the virucidal efficacy of chemical disinfectants. *Zoonoses Public Health*, 55(2), 99-105. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01094.x>
- Heinlin, J., Isbary, G., Stolz, W., Morfill, G., Landthaler, M., Shimizu, T., Steffes, B., Nosenko, T., Zimmermann, J. und Karrer, S. (2011). Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 25(1), 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x>
- Heinlin, J., Zimmermann, J.L., Zeman, F., Bunk, W., Isbary, G., Landthaler, M., Maisch, T., Monetti, R., Morfill, G., Shimizu, T., Steinbauer, J., Stolz, W. und Karrer, S. (2013). Randomized placebo-controlled human pilot study of cold atmospheric argon plasma

- on skin graft donor sites. *Wound Repair Regen*, 21(6), 800-807.  
<https://doi.org/10.1111/wrr.12078>
- Hessling, M., Hones, K., Vatter, P. und Lingenfelder, C. (2020). Ultraviolet irradiation doses for coronavirus inactivation - review and analysis of coronavirus photoinactivation studies. *GMS Hyg Infect Control*, 15, Doc08. <https://doi.org/10.3205/dgkh000343>
- IFAM, F.-I.f.F.u.A.M. (2023). *Nachhaltigkeit durch Plasma- und Lasertechnik*. abgerufen am 17.10.2023 um 14.54 Uhr  
<https://www.ifam.fraunhofer.de/de/technologien/plasmatechnik-lasertechnik-nachhaltige-oberflaechenbehandlung.html#:~:text=Plasma%2D%20und%20Laserverfahren%20bi,eten%20hier,k%C3%BCrzeren%20Taktzeiten%20werden%20Ressourcen%20eingespart.>
- Jones, P. und Middlemiss, D.N. (1972). Formation of compound I by the reaction of catalase with peroxyacetic acid. *Biochem J*, 130(2), 411-415.  
<https://doi.org/10.1042/bj1300411>
- Jursch, C.A., Gerlich, W.H., Glebe, D., Schaefer, S., Marie, O. und Thraenhart, O. (2002). Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus. *Med Microbiol Immunol*, 190(4), 189-197. <https://doi.org/10.1007/s00430-001-0103-0>
- Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 162(4), 480-483. <https://doi.org/10.1007/bf01863914>
- Karrer, S. und Arndt, S. (2015). Plasma medicine in dermatology: Mechanisms of action and clinical applications. *Hautarzt*, 66(11), 819-828. <https://doi.org/10.1007/s00105-015-3686-x> (Plasmamedizin in der Dermatologie : Wirkmechanismen und Anwendungsmöglichkeiten.)
- King, A., Adams, M., Carstens, E. und Lefkowitz, E. (2011a). Caliciviridae. In A. King, M. Adams, E. Carstens und E. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9., pp. 977). Elsevier Science. <https://books.google.de/books?id=KXRCYay3pH4C>
- King, A., Adams, M., Carstens, E. und Lefkowitz, E. (2011b). Picornavirales. In A. King, M. Adams, E. Carstens und E. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9., pp. 835-836). Elsevier Science. <https://books.google.de/books?id=KXRCYay3pH4C>
- King, A., Adams, M., Carstens, E. und Lefkowitz, E. (2011c). Adenoviridae. In A. King, M. Adams, E. Carstens und E. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9., pp. 125-126). Elsevier Science. <https://books.google.de/books?id=KXRCYay3pH4C>
- King, A., Adams, M., Carstens, E. und Lefkowitz, E. (2011d). Reoviridae. In A. King, M. Adams, E. Carstens und E. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9., pp. 547-548). Elsevier Science. <https://books.google.de/books?id=KXRCYay3pH4C>
- King, A., Adams, M., Carstens, E. und Lefkowitz, E. (2011e). Coronaviridae. In A. King, M. Adams, E. Carstens und E. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the*

- International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9., pp. 806-811). Elsevier Science. <https://books.google.de/books?id=KXRCYay3pH4C>
- King, A., Adams, M., Carstens, E. und Lefkowitz, E. (2011f). Rhabdoviridae. In A. King, M. Adams, E. Carstens und E. Lefkowitz (Eds.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Vol. 9., pp. 686). Elsevier Science. <https://books.google.de/books?id=KXRCYay3pH4C>
- Kramer, A. (2006). Chemische Desinfektion. In W. Bodenschatz (Ed.), *Kompaktwissen Desinfektion - Das Handbuch für Ausbildung Praxis* (Vol. 3, pp. S. 155-193). Behr.
- Kramer, A., Reichwagen, S., Heldt, P., Widulle, H. und Nürnberg, W. (2008). Oxidanzien. In A. Kramer, O. Assadian und K. H. Wallhäußer (Eds.), *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung - Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin* (pp. 713-729). Thieme.
- KRINKO. (2022). Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen : Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 65(10), 1074-1115. <https://doi.org/10.1007/s00103-022-03576-1>
- Krishnan, J., Fey, G., Stansfield, C., Landry, L., Nguy, H., Klassen, S. und Robertson, C. (2012). Evaluation of a Dry Fogging System for Laboratory Decontamination. *Applied Biosafety*, 17(3), 132-141. <https://doi.org/10.1177/153567601201700305>
- Lamilux. (2023). *Reinigbarkeit von Oberflächen*. abgerufen am 20.11.2023 um 14.12 Uhr <https://www.lamilux.de/hub/hygiene-und-forschung/reinigbarkeit-von-oberflaechen.html>
- Mai-Prochnow, A., Murphy, A.B., McLean, K.M., Kong, M.G. und Ostrikov, K.K. (2014). Atmospheric pressure plasmas: infection control and bacterial responses. *Int J Antimicrob Agents*, 43(6), 508-517. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.025>
- Maisch, T., Shimizu, T., Li, Y.F., Heinlin, J., Karrer, S., Morfill, G. und Zimmermann, J.L. (2012). Decolonisation of MRSA, *S. aureus* and *E. coli* by cold-atmospheric plasma using a porcine skin model in vitro. *PLoS One*, 7(4), e34610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034610>
- Maquart, M. und Marlet, J. (2022). Rapid SARS-CoV-2 inactivation by mercury and LED UV-C lamps on different surfaces. *Photochem Photobiol Sci*, 21(12), 2243-2247. <https://doi.org/10.1007/s43630-022-00292-2>
- Mettenleiter, T.C., Ehlers, B., Müller, T., Kyoung-Jin, Y. und Teifke, J.P. (2019). Herpesvirus. In J. J. Zimmermann, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson und J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine* (Vol. 11th edition, pp. 548-549). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781119350927>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Mücke, H. (1970). Über die Eigenschaften der Peressigsäure. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Universität Rostock, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Reihe, Heft 3*, 267-270.
- Müller, W., Schlenker, G. und Zucker, B.A. (2017). Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen und Parasitenstadien. In W. Müller, G. Schlenker und B. A. Zucker (Eds.), *Kompendium der Tierhygiene* (Vol. 5. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage). Lehmanns Media.
- Paulino-Lima, I.G., Fujishima, K., Navarrete, J.U., Galante, D., Rodrigues, F., Azua-Bustos, A. und Rothschild, L.J. (2016). Extremely high UV-C radiation resistant microorganisms from desert environments with different manganese concentrations. *J Photochem Photobiol B*, 163, 327-336.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.08.017>
- Perdiz, D., Grof, P., Mezzina, M., Nikaido, O., Moustacchi, E. und Sage, E. (2000). Distribution and repair of bipyrimidine photoproducts in solar UV-irradiated mammalian cells. Possible role of Dewar photoproducts in solar mutagenesis. *J Biol Chem*, 275(35), 26732-26742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001450200>
- Pullerits, K., Ahlinder, J., Holmer, L., Salomonsson, E., Öhrman, C., Jacobsson, K., Dryselius, R., Forsman, M., Paul, C.J. und Rådström, P. (2020). Impact of UV irradiation at full scale on bacterial communities in drinking water. *npj Clean Water*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0057-7>
- Rabenau, H.F., Rapp, I. und Steinmann, J. (2010). Can vaccinia virus be replaced by MVA virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants? *BMC Infect Dis*, 10, 185. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-185>
- Rabenau, H.F., Schwebke, I., Blumel, J., Eggers, M., Glebe, D., Rapp, I., Sauerbrei, A., Steinmann, E., Steinmann, J., Willkommen, H. und Wutzler, P. (2015). Guideline of the German Association for the Control of Viral Diseases (DVV) eV and the Robert Koch Institute (RKI) for testing chemical disinfectants for effectiveness against viruses in human medicine. Version of 1 December, 2014. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 58(4-5), 493-504. <https://doi.org/10.1007/s00103-015-2131-8> (Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e. V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin : Fassung vom 1. Dezember 2014.)
- Rabenau, H.F., Schwebke, I., Steinmann, J., Eggers, M., Rapp, I. und Neumann-Haefelin, D. (2012). Quantitative Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen. In (Vol. 37, pp. 78-85): Robert Koch-Institut, Infektionskrankheiten / Erreger.
- Rager, J. (2013). *Quantitative Analyse der Proteinadsorption an Primärpackmittel* Freie Universität Berlin]. Berlin. abgerufen am 08.12.2023 um 09.37 Uhr [https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/fub188/8107/Dissertation\\_Julia\\_Rager.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/fub188/8107/Dissertation_Julia_Rager.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Reiche, S., Schinköthe, J., Diederich, S., Scheinemann, H., Eschbaumer, M., Freese, H., Kluge, K. und Teifke, J.P. (2020). Trockenvernebelung von Peroxyessigsäure: Ein universelles -viruzides, bakterizides und sporozides Raumesinfektionsverfahren? *WMM*, 64(10-11), 370-375.

- Rheinbaben und Wolff. (2002a). Aktivsauerstoff freisetzende Desinfektionswirkstoffe. In Rheinbaben F. und M. H. Wolff (Eds.), *Handbuch der viruswirksamen Desinfektion* (pp. 64-69). Springer.
- Rheinbaben und Wolff. (2002b). UV-Strahlung. In Rheinbaben F. und M. H. Wolff (Eds.), *Handbuch der viruswirksamen Desinfektion* (pp. 39-41). Springer.
- Rheinbaben und Wolff. (2002c). UV-Licht. In Rheinbaben F. und M. H. Wolff (Eds.), *Handbuch der viruswirksamen Desinfektion* (pp. 177-179). Springer.
- Rheinbaben und Wolff. (2002d). Bau und Resistenz der Viren. In Rheinbaben F. und M. H. Wolff (Eds.), *Handbuch der viruswirksamen Desinfektion* (pp. 15-23). Springer.
- Rheinbaben F. (2006). Viren als Kontaminanten. In A. Kramer, O. Assadian und K. H. Wallhäußer (Eds.), *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung - Qualitätssicherung der Hygiene in Industrie, Pharmazie und Medizin* (pp. 26-37). Thieme.
- Richtlinie über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei bestimmten Tierseuchen, F.-L.-I. (2023). abgerufen am 29.09.2023 um 10.12 Uhr [https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar\\_derivate\\_00052142/FLI-5-3-3-Desinfektionsmittel-RL-Desinfektion-V1-0.pdf](https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00052142/FLI-5-3-3-Desinfektionsmittel-RL-Desinfektion-V1-0.pdf)
- Rosenheck, K. und Doty, P. (1961). The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47(11), 1775-1785. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.11.1775>
- Schinköthe, J., Scheinemann, H.A., Diederich, S., Freese, H., Eschbaumer, M., Teifke, J.P. und Reiche, S. (2021). Airborne Disinfection by Dry Fogging Efficiently Inactivates Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), Mycobacteria, and Bacterial Spores and Shows Limitations of Commercial Spore Carriers. *Appl Environ Microbiol*, 87(3). <https://doi.org/10.1128/AEM.02019-20>
- Schliesser, T. (1975). Tierarzt und Desinfektion. *Tierärztl. Umschau*, 7, 319-324.
- Schubert, F. (2016a). Allgemeines zur Desinfektion und Sterilisation. In F. Schubert (Ed.), *Leitfaden Desinfektion, Sterilisation und Entwesung* (Vol. 10. Auflage, pp. 65-69). Behr.
- Schubert, F. (2016b). Praktische Durchführung der Desinfektion. In F. Schubert (Ed.), *Leitfaden Desinfektion, Sterilisation und Entwesung* (Vol. 10. Auflage, pp. 165-168). Behr.
- Schubert, F. (2016c). Chemische Desinfektion und Sterilisation. In F. Schubert (Ed.), *Leitfaden Desinfektion, Sterilisation und Entwesung* (Vol. 10. Auflage, pp. 105-110). Behr.
- Schubert, F. (2016d). Peressigsäuren. In F. Schubert (Ed.), *Leitfaden Desinfektion, Sterilisation und Entwesung* (Vol. 10. Auflage, pp. 128-130). Behr.
- Schubert, F. (2016e). Anwendung von Strahlen. In F. Schubert (Ed.), *Leitfaden Desinfektion, Sterilisation und Entwesung* (Vol. 10. Auflage, pp. 98-101). Behr.

- Sharma, A., Collins, G. und Pruden, A. (2009). Differential gene expression in *Escherichia coli* following exposure to nonthermal atmospheric pressure plasma. *J Appl Microbiol*, 107(5), 1440-1449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04323.x>
- Spearman, C. (1908). The Method of 'Right and Wrong Cases' ('Constant Stimuli') without Gauss's Formulae. *British Journal of Psychology*, 1904-1920, 2(3), 227-242. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1908.tb00176.x>
- Spössig, M. (1989). Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der Peressigsäure - 25 Jahre Erfahrung und Entwicklung. *Hyg Med*, 14, 498-501.
- Stockmeier. (2023). *Stockmeier GmbH & Co. KG Peressigsäure zur Desinfektion*. abgerufen am 18.10.2023 um 07.54 Uhr <https://www.stockmeier.com/de/produkte/chemie/industriechemikalien/saeuren-laugen/peressigsaeure/>
- Stryer, L. (1990). Der Fettsäurestoffwechsel. In *Biochemie* (pp. 489-494). Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft mbH.
- TecScience. (2023). *Bernoulli-Effekt (Venturi-Effekt)*. abgerufen am 02.10.2023 um 11.20 Uhr <https://www.tec-science.com/de/mechanik/gase-und-fluessigkeiten/hydrodynamisches-paradoxon-druck-als-energie/>
- Teifke, J.P., Scheinemann, H., Schinköthe, J., Eschbaumer, M., Meluh, A., Streitz, M., Freese, H. und Reiche, S. (2021). Dry-fog decontamination of microbiological safety cabinets after activities with SARS-CoV-2: cycle development and process validation for dry fogging with peroxyacetic acid. *GMS Hyg Infect Control*, 16, 1-16. <https://doi.org/10.3205/dgkh000397>
- Terraplasma. (2023). *Wie wird das Kaltsplasma der plasma care®-Produktserie erzeugt?* abgerufen am 23.11.2023 um 07.45 Uhr <https://www.terraplasma-medical.com/kaltplasma/>
- ViroMed. (2023). *Kaltplasmatechnologie*. abgerufen am 12.12.2023 um 08.35 Uhr <https://www.viromed.de/kaltplasma-technologie/>
- Vollhardt, K. (1988). Die besondere Stabilität des cyclischen Elektronenskeletts. In *Organische Chemie* (Vol. 1. Ausgabe, pp. 877-885). VCH Verlagsgesellschaft.
- Weinhold und Köhler. (1971). Versuche am Newcastle disease-Virus zur Erstellung eines Prüfungsschemas für viruzid wirkende chemische Desinfektionsmittel. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 72, 27-32.
- Weiss, M., Daeschlein, G., Kramer, A., Burchardt, M., Brucker, S., Wallwiener, D. und Stope, M.B. (2017). Virucide properties of cold atmospheric plasma for future clinical applications. *J Med Virol*, 89(6), 952-959. <https://doi.org/10.1002/jmv.24701>
- Wiegand, C. und Elsner, P. (2017). Plasmamedizin – Kaltes Plasma zur Behandlung von Hautinfektionen. *Akt Dermatol*, 43(08/09), 339-345. <https://doi.org/10.1055/s-0043-112681>
- Zhu, Q., Li, B. und Sun, D. (2022). Advances in Bovine Coronavirus Epidemiology. *Viruses*, 14(5). <https://doi.org/10.3390/v14051109>

- Ziesing, S., Schubert, S., Heim, A. und Vonberg, R.P. (2020). Virusisolation in Zellkulturen. In S. Suerbaum, G. D. Burchard, S. H. E. Kaufmann und T. F. Schulz (Eds.), *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Vol. 9. völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, pp. 184-185). Springer Berlin. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-61385-6>
- Zwicker, P., Schleusener, J., Lohan, S.B., Busch, L., Sicher, C., Einfeldt, S., Kneissl, M., Kuhl, A.A., Keck, C.M., Witzel, C., Kramer, A. und Meinke, M.C. (2022). Application of 233 nm far-UVC LEDs for eradication of MRSA and MSSA and risk assessment on skin models. *Sci Rep*, 12(1), 2587. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06397-z>
- Zwicker, P., Zumpe, M., Kramer, A. und Muller, G. (2023). A 3D Model of Human Buccal Mucosa for Compatibility Testing of Mouth Rinsing Solutions. *Pharmaceutics*, 15(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030721>

## 10 Anhang

Tabelle 11: Ergebnisse der Trockenvernebelung mit aPES, Edelstahl, n=3, \* komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, n.d. nicht durchgeführt

	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	MVA	MS 2	MNV	ORV-1	HAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml-Reduktion (gewichteter Mittelwert $\pm$ innere Konsistenz $\pm$ externe Konsistenz)							
0,0078%	0,76 $\pm 0,23$ $\pm 0,33$	4,80 $\pm 0,31$ $\pm 0,42$	3,38 $\pm 0,44$ $\pm 0,00$	2,25 $\pm 0,23$ $\pm 0,09$	0,64 $\pm 0,17$ $\pm 0,10$	1,19 $\pm 0,21$ $\pm 0,65$	0,34 $\pm 0,41$ $\pm 0,10$	0,35 $\pm 0,25$ $\pm 0,04$
0,0156%	2,03 $\pm 0,26$ $\pm 0,02$	4,63 $\pm 0,21$ $\pm 0,15$	4,00 $\pm 0,45$ $\pm 0,15$	5,05 $\pm 0,15$ $\pm 0,10$	2,93 $\pm 0,20$ $\pm 0,57$	4,36 $\pm 0,09$ $\pm 0,41$	1,91 $\pm 0,32$ $\pm 0,23$	3,24 $\pm 0,43$ $\pm 0,01$
0,0313%	3,60 $\pm 0,24$ $\pm 0,42$	5,03 $\pm 0,13$ $\pm 0,36$	5,07 $\pm 0,10$ $\pm 0,00$	5,24 $\pm 0,11$ $\pm 0,13$	4,57 $\pm 0,18$ $\pm 0,18$	4,50 $\pm 0,20$ $\pm 0,32$	5,79* $\pm 0,10$ $\pm 0,01$	4,32 $\pm 0,26$ $\pm 0,13$
0,0625%	4,15 $\pm 0,11$ $\pm 0,06$	6,14 $\pm 0,91$ $\pm 0,00$	n.d.	5,85 $\pm 0,11$ $\pm 0,10$	6,58 $\pm 0,38$ $\pm 0,74$	5,75* $\pm 0,09$ $\pm 0,14$	5,60* $\pm 0,14$ $\pm 0,00$	5,40 $\pm 0,11$ $\pm 0,12$
0,125%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,10 $\pm 0,10$ $\pm 0,10$	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 12: Ergebnisse der Trockenvernebelung mit aPES, PVC, n=3, \* komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, n.d. nicht durchgeführt

	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	MVA	MS 2	MNV	ORV-1	HAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml-Reduktion (gewichteter Mittelwert $\pm$ innere Konsistenz $\pm$ externe Konsistenz)							
0,0078%	n.d.	4,37 $\pm 0,09$ $\pm 0,18$	n.d.	3,44 $\pm 0,10$ $\pm 0,17$	n.d.	1,24 $\pm 0,04$ $\pm 0,01$	n.d.	n.d.
0,0156%	3,29 $\pm 0,16$ $\pm 0,11$	4,73 $\pm 0,15$ $\pm 0,10$	n.d.	5,51 $\pm 0,10$ $\pm 0,10$	1,02 $\pm 0,12$ $\pm 0,10$	4,44 $\pm 0,10$ $\pm 0,10$	2,50 $\pm 0,17$ $\pm 1,18$	2,67 $\pm 0,48$ $\pm 0,10$
0,0313%	3,31 $\pm 0,10$ $\pm 0,35$	5,09 $\pm 0,12$ $\pm 0,13$	n.d.	5,59 $\pm 0,10$ $\pm 0,50$	2,66 $\pm 0,09$ $\pm 0,13$	5,51* $\pm 0,10$ $\pm 0,31$	5,24* $\pm 0,18$ $\pm 0,45$	3,96 $\pm 0,36$ $\pm 0,40$

0,0625%	4,53 ±0,12 ±0,0,	4,48 ±0,18 ±0,00	n.d.	5,25 ±0,12 ±0,23	3,97 ±0,12 ±0,15	5,91* ±0,09 ±0,24	5,86* ±0,33 ±0,50	5,14 ±0,24 ±0,26
0,125%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,51 ±0,15 ±0,10	5,26* ±0,53 ±0,23	n.d.	n.d.

Tabelle 13: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 254 nm (Quecksilber), Edelstahl, n=3, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, n.d. nicht durchgeführt

Bestrahlungsdosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	BCoV	FCoV	VSV	SuHV-1	MVA	MS 2	HPV-1	FCV	MNV	ORV-1	HAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)										
5	n.d.	3,48 ±0,13 ±0,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	4,25 ±0,08 ±0,10	2,98 ±0,09 ±0,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	3,92 ±0,09 ±0,20	4,63 ±0,12 ±0,10	4,21 ±0,08 ±0,10	n.d.	3,71 ±0,10 ±0,09	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
25	4,29 ±0,14 ±0,04	n.d.	4,72 ±0,13 ±0,18	n.d.	n.d.	n.d.	3,91 ±0,11 ±0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	4,71 ±0,07 ±0,22	n.d.	n.d.	n.d.	4,39 ±0,11 ±0,39	n.d.	4,20 ±0,09 ±0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
35	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,39 ±0,08 ±0,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	n.d.	n.d.	n.d.	3,61 ±0,09 ±0,23	4,60 ±0,12 ±0,22	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	n.d.	n.d.	n.d.	4,44 ±0,10 ±0,10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

60	n.d.	n.d.	n.d.	4,70 ±0,09 ±0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,94 ±0,10 ±0,20	n.d.
70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,19 ±0,08 ±0,09	n.d.
80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,45 ±0,08 ±0,14	n.d.
90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,44 ±0,10 ±0,16	n.d.	n.d.	3,04 ±0,10 ±0,52
100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,33 ±0,09 ±0,15	n.d.	n.d.	4,26 ±0,08 ±0,21
110	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,59 ±0,10 ±0,19	n.d.	n.d.	4,86 ±0,09 ±0,03
120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
290	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,77 ±0,07 ±0,08	n.d.	n.d.
300	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,31 ±0,10 ±0,15	n.d.	n.d.
310	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,45 ±0,12 ±0,12	n.d.	n.d.
550	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,97 ±0,08 ±0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,18 ±0,09 ±0,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 14: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 270 nm, Edelstahl, n=3, \* komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, n.d. nicht durchgeführt

Bestrahlungs-dosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	VSIV	SuHV-1	MVA	MS 2	HPV-1	FCV	MNV	ORV-1	HADV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)											
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	n.d.	3,76 ±0,08 ±0,11	n.d.	n.d.	3,51 ±0,11 ±0,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	3,33 ±0,12 ±0,25	4,39 ±0,10 ±0,14	3,47 ±0,11 ±0,07	n.d.	4,04± 0,08 ±0,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	n.d.	4,09 ±0,11 ±0,48	4,66* ±0,07 ±0,02	4,04 ±0,10 ±0,17	n.d.	4,62 ±0,10 ±0,14	n.d.	3,60 ±0,08 ±0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	2,90 ±0,13 ±0,24	4,31 ±0,10 ±0,09	n.d.	4,38 ±0,08 ±0,20	n.d.	4,89 ±0,06 ±0,17	n.d.	4,30 ±0,07 ±0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	3,67 ±0,12 ±0,20	4,62 ±0,10 ±0,23	n.d.	4,58 ±0,11 ±0,12	n.d.	n.d.	n.d.	4,45* ±0,09 ±0,08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60	4,50 ±0,11 ±0,09	n.d.	n.d.	n.d.	3,98 ±0,11 ±0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70	4,77 ±0,10 ±0,19	n.d.	n.d.	n.d.	4,51 ±0,07 ±0,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,21 ±0,10 ±0,43	n.d.
80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,39 ±0,12 ±0,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,09 ±0,07 ±0,03	n.d.
90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,36 ±0,09 ±0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,56 ±0,07 ±0,09	3,51 ±0,08 ±0,16
100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,97 ±0,08 ±0,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,09 ±0,08 ±0,07

## Anhang

110	n.d.	n.d.	n.d.	4,72 ±0,09 ±0,17								
180	n.d.	n.d.	n.d.	4,46 ±0,08 ±0,15								
230	n.d.	3,30 ±0,08 ±0,31	n.d.	n.d.	n.d.							
240	n.d.	3,40 ±0,07 ±0,25	n.d.	n.d.	n.d.							
250	n.d.	3,23 ±0,10 ±0,23	n.d.	n.d.	n.d.							
280	n.d.	3,43 ±0,08 ±0,06	n.d.	n.d.	n.d.							
290	n.d.	4,36 ±0,09 ±0,08	n.d.	n.d.	n.d.							
300	n.d.	4,54 ±0,12 ±0,18	n.d.	n.d.	n.d.							
440	n.d.	3,61 ±0,12 ±0,06	n.d.	n.d.								
450	n.d.	4,03 ±0,12 ±0,19	n.d.	n.d.								

Anhang

460	n.d.	n.d.	n.d.	4,14 ±0,12 ±0,02	n.d.	n.d.						
470	n.d.	n.d.	n.d.	4,70 ±0,16 ±0,20	n.d.	n.d.						
550	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,14 ±0,09 ±0,13	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,12 ±0,11 ±0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 15: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 270 nm, PVC, n=3, \* komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, n.d. nicht durchgeführt

Bestrahlungs-dosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	VSV	SuHV-1	MVA	MS 2	HPV-1	FCV	MNV	ORV-1	HAAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)											
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,99 ±0,07 ±0,32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	3,31 ±0,10 ±0,10	3,54 ±0,12 ±0,20	3,95 ±0,09 ±0,17	3,78 ±0,10 ±0,11	n.d.	4,21 ±0,07 ±0,46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	4,32 ±0,12 ±0,29	4,88 ±0,09 ±0,23	4,15 ±0,08 ±0,48	4,54 ±0,06 ±0,54	n.d.	4,89 ±0,10 ±0,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	4,70 ±0,11 ±0,08	4,82 ±0,09 ±0,24	4,55* ±0,11 ±0,07	4,63 ±0,09± 0,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Anhang

60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,92 ±0,10 ±0,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,33 ±0,11 ±0,20	n.d.	n.d.	4,19 ±0,08 ±0,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,66 ±0,11 ±0,12	n.d.	n.d.	4,55 ±0,08 ±0,17	n.d.	n.d.	3,43 ±0,07 ±0,17	n.d.
90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,62 ±0,09 ±0,32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,77 ±0,08 ±0,36
100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,65 ±0,10 ±0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,24 ±0,08 ±0,23
110	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,86 ±0,13 ±0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,37 ±0,09 ±0,26
120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,45 ±0,11 ±0,21	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
130	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,49* ±0,08 ±0,02	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
170	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,56 ±0,08 ±0,16	n.d.
180	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,35 ±0,08 ±0,19	n.d.
190	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,67 ±0,07 ±0,26	n.d.

Anhang

230	n.d.	n.d.	3,88 ±0,11 ±0,09	n.d.	n.d.	n.d.						
240	n.d.	n.d.	4,39 ±0,12 ±0,22	n.d.	n.d.	n.d.						
250	n.d.	n.d.	4,59 ±0,15 ±0,04	n.d.	n.d.	n.d.						
290	n.d.	n.d.	4,73 ±0,10 ±0,16	n.d.	n.d.	n.d.						
450	n.d.	n.d.	n.d.	3,28 ±0,10 ±0,10	n.d.	n.d.						
460	n.d.	n.d.	n.d.	3,50 ±0,12 ±0,24	n.d.	n.d.						
500	n.d.	n.d.	n.d.	3,67 ±0,13 ±0,17	n.d.	n.d.						
550	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,57 ±0,11 ±0,06	n.d.	n.d.	4,36 ±0,14 ±0,29	n.d.	n.d.
600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,00 ±0,07 ±0,07	n.d.	n.d.	4,69 ±0,11 ±0,07	n.d.	n.d.

Tabelle 16: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 270 nm, Glas, n=3, \* komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, n.d. nicht durchgeführt

Bestrahlungs-dosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	VSIV	SuHV-1	MVA	MS 2	HPV-1	FCV	MINV	ORV-1	HAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)											
5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	n.d.	3,35 ±0,08 ±0,22	n.d.	3,21 ±0,09 ±0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	n.d.	4,35 ±0,10 ±0,26	n.d.	4,14 ±0,07 ±0,02	n.d.	3,35 ±0,07 ±0,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
30	n.d.	4,73 ±0,10 ±0,13	3,87 ±0,11 ±0,09	4,22 ±0,07 ±0,11	n.d.	4,42 ±0,11 ±0,30	n.d.	3,56 ±0,10 ±0,24	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
40	n.d.	n.d.	4,12 ±0,08 0,18	n.d.	n.d.	4,49 ±0,10 ±0,30	n.d.	4,29 ±0,07 ±0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
50	3,73 ±0,10 ±0,10	n.d.	4,31* ±0,08 ±0,03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,33 ±0,07 ±0,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
60	4,30 ±0,12 ±0,19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70	4,30 ±0,09 ±0,12	n.d.	n.d.	n.d.	2,98 ±0,10 ±0,32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
80	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,25 ±0,11 ±0,15	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,18 ±0,08 ±0,34	n.d.
90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,82 ±0,08 ±0,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,27 ±0,08 ±0,07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

## Anhang

110	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,35 ±0,13 ±0,17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,26 ±0,10 ±0,09
120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,68 ±0,09 ±0,14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,40 ±0,09 ±0,23
130	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,62 ±0,08 ±0,06
170	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,96 ±0,07 ±0,09	n.d.
180	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,46 ±0,10 ±0,14	n.d.
190	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,97 ±0,09 ±0,19	n.d.
220	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,73 ±0,12 ±0,07	n.d.	n.d.	n.d.
230	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,26 ±0,09 ±0,28	n.d.	n.d.	n.d.
240	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,35 ±0,09 ±0,04	n.d.	n.d.	n.d.
250	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,47 ±0,09 ±0,09	n.d.	n.d.	n.d.
290	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,13 ±0,11 ±0,09	n.d.	n.d.	n.d.

440	n.d.	n.d.	n.d.	3,73 ±0,07 ±0,07	n.d.	n.d.							
450	n.d.	n.d.	n.d.	4,29 ±0,11 ±0,08	n.d.	n.d.							
460	n.d.	n.d.	n.d.	4,44 ±0,12 ±0,12	n.d.	n.d.							
550	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,59 ±0,13 ±0,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
600	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,04 ±0,11 ±0,04	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	

Tabelle 17: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 233 nm, Edelstahl, n=3, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$

Bestrahlungs-dosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	VSIV	SuHV-1	MVA	MS 2	HPV-1	FCV	MNV	ORV-1	HAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)											
10	0,68 ±0,10 ±0,16	2,55 ±0,10 ±0,32	1,52 ±0,09 ±0,08	1,52 ±0,11 ±0,15	0,25 ±0,11 ±0,07	0,53 ±0,09 ±0,10	0,22 ±0,10 ±0,10	2,89 ±0,08 ±0,33	1,82 ±0,10 ±0,28	0,15 ±0,11 ±0,17	0,44 ±0,10 ±0,06	0,72 ±0,10 ±0,17
50	1,52 ±0,09 ±0,06	3,30 ±0,10 ±0,22	2,59 ±0,10 ±0,08	1,66 ±0,10 ±0,06	1,16 ±0,10 ±0,18	0,83 ±0,10 ±0,10	0,61 ±0,09 ±0,10	3,88 ±0,11 ±0,06	2,96 ±0,11 ±0,04	0,39 ±0,12 ±0,15	0,86 ±0,12 ±0,07	1,61 ±0,09 ±0,10
80	1,56 ±0,09 ±0,07	3,32 ±0,12 ±0,19	3,48 ±0,11 ±0,43	2,83 ±0,10 ±0,13	1,32 ±0,11 ±0,08	1,61 ±0,07 ±0,03	1,50 ±0,12 ±0,15	4,28 ±0,09 ±0,18	3,28 ±0,12 ±0,30	1,73 ±0,12 ±0,28	1,49 ±0,08 ±0,04	2,88 ±0,09 ±0,37

Tabelle 18: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 233 nm, PVC, n=3

Bestrahlungs-dosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	VSIV	SuHV-1	MVA	MS 2	HPV-1	FCV	MNV	ORV-1	HAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)											
10	0,56 ±0,11 ±0,17	0,73 ±0,09 ±0,12	0,91 ±0,10 ±0,09	0,72 ±0,10 ±0,18	0,51 ±0,09 ±0,09	0,95 ±0,11 ±0,20	0,17 ±0,12 ±0,17	1,76 ±0,09 ±0,18	1,56 ±0,09 ±0,23	0,82 ±0,11 ±0,15	0,74 ±0,08 ±0,09	1,61 ±0,11 ±0,05
50	1,10 ±0,11 ±0,23	1,41 ±0,11 ±0,17	1,78 ±0,12 ±0,15	1,55 ±0,13 ±0,07	1,29 ±0,11 ±0,31	1,86 ±0,11 ±0,18	0,44 ±0,12 ±0,18	1,84 ±0,10 ±0,24	2,03 ±0,10 ±0,12	0,92 ±0,09 ±0,09	1,48 ±0,10 ±0,14	1,87 ±0,11 ±0,06
80	1,40 ±0,10 ±0,06	2,77 ±0,11 ±0,30	2,88 ±0,13 ±0,18	2,00 ±0,10 ±0,16	1,73 ±0,09 ±0,11	2,76 ±0,08 ±0,09	0,44 ±0,09 ±0,25	2,48 ±0,17 ±0,17	2,51 ±0,15 ±0,06	1,46 ±0,11 ±0,07	1,79 ±0,08 ±0,06	2,67 ±0,11 ±0,17

Tabelle 19: Ergebnisse der UV C-Bestrahlung, 233 nm, Glas, n=3

Bestrahlungs-dosis [mJ/cm <sup>2</sup> ]	BCoV	FCoV	SARS CoV-2	VSIV	SuHV-1	MVA	MS 2	HPV-1	FCV	MNV	ORV-1	HAdV-5
	log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)											
10	0,46 ±0,10 ±0,08	1,72 ±0,09 ±0,14	1,74 ±0,09 ±0,16	1,84 ±0,09 ±0,14	0,85 ±0,08 ±0,09	0,94 ±0,10 ±0,16	0,88 ±0,11 ±0,13	0,72 ±0,10 ±0,12	1,48 ±0,10 ±0,14	0,36 ±0,06 ±0,10	0,86 ±0,09 ±0,11	1,80 ±0,12 ±0,15
50	0,65 ±0,10 ±0,15	2,15 ±0,11 ±0,20	2,44 ±0,11 ±0,09	2,17 ±0,10 ±0,17	1,76 ±0,08 ±0,08	1,52 ±0,12 ±0,16	1,03 ±0,11 ±0,24	2,12 ±0,12 ±0,17	2,68 ±0,11 ±0,15	1,05 ±0,13 ±0,10	1,11 ±0,11 ±0,24	2,24 ±0,12 ±0,20
80	1,67 ±0,10 ±0,26	2,79 ±0,11 ±0,33	2,96 ±0,10 ±0,26	2,61 ±0,11 ±0,32	2,22 ±0,10 ±0,32	2,18 ±0,08 ±0,28	1,34 ±0,11 ±0,29	2,85 ±0,11 ±0,11	3,18 ±0,11 ±0,19	1,59 ±0,08 ±0,06	1,84 ±0,12 ±0,13	2,92 ±0,08 ±0,14

Tabelle 20: Ergebnisse der 233 nm-Bestrahlung des 3D-Mundschleimhautmodells, Inkubationszeit (IKZ) = 60 min, n=3, \* komplette Reduktion, grau= Reduktion inkl. interner und externer Konsistenz  $\geq 4 \log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/ml, PK=Positivkontrolle

Bestrahlungsdosis	20 mJ/cm <sup>2</sup>	40 mJ/cm <sup>2</sup>	60 mJ/cm <sup>2</sup>	80 mJ/cm <sup>2</sup>	PK
VSIV-Reduktion [log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml] ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz	1,44 ±0,13 ±0,58	4,45 ±0,14 ±0,77	5,72* ±0,07 ±0,51	5,72* ±0,07 ±0,51	7,43 ±0,10 ±0,64

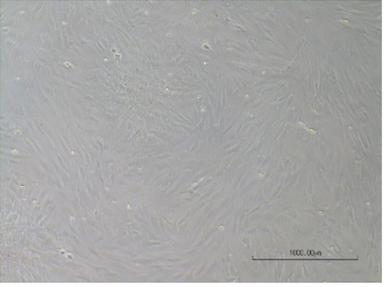
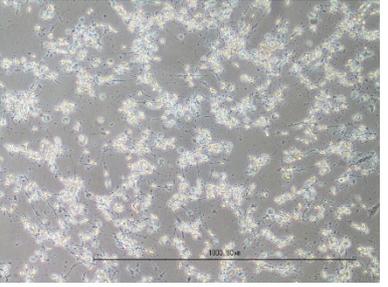
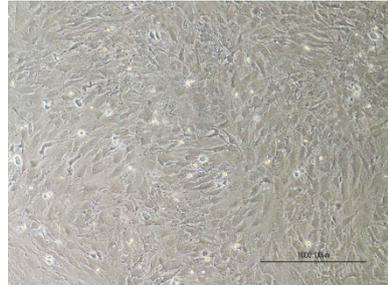
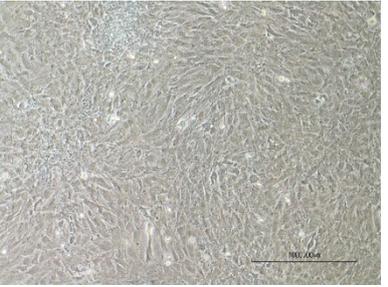
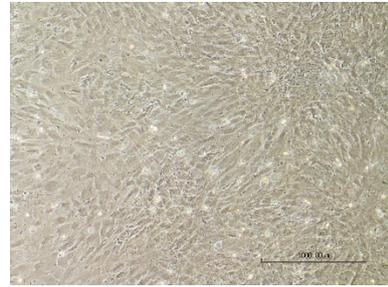
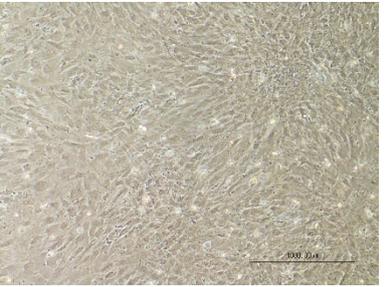
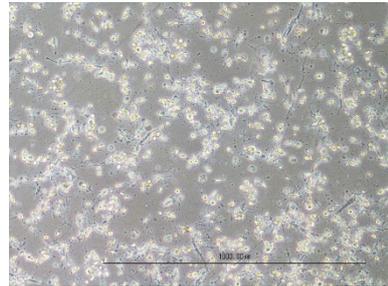
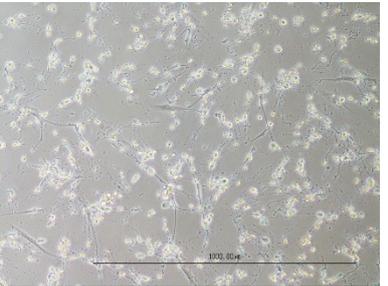
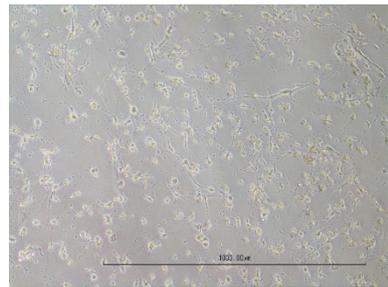
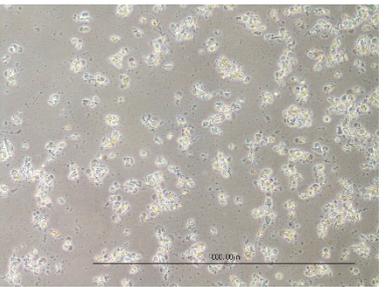
Tabelle 21: MTT-Test-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) und der 2D-Monolayerkultur (TR146) nach 233 nm Bestrahlung, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3

	3D-Schleimhautmodell		2D-Monolayerkultur	
	Extinktion bei 560 nm±SD	prozentuale Extinktion bei 560 nm	Extinktion bei 560 nm±SD	prozentuale Extinktion bei 560 nm
NK	0,1367±0,03	100%	0,1379±0,00	100%
PK	0,1056±0,01	77,2%	0,1020±0,00	74,0%
Tox. 20 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1193±0,02	87,3%	0,0949±0,00	68,8%
Tox. 40 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1118±0,02	81,8%	0,0708±0,01	51,3%
Tox. 60 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1141±0,01	83,5%	0,0626±0,00	45,4%
Tox. 80 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1208±0,01	88,4%	0,0627±0,00	45,5%
20 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1170±0,02	85,6%	0,0814±0,00	59,0%
40 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1216±0,02	89,0%	0,0478±0,00	34,6%
60 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1146±0,01	83,8%	0,0606±0,00	43,9%
80 mJ/cm <sup>2</sup>	0,1293±0,03	94,8%	0,0612±0,00	44,4%

Tabelle 22: Ergebnisse der Kaltplasmabestrahlung, Edelstahl, n=2

Behandlungsdauer [s]	MNV	FCV	VSIV	SuHV-1
log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml Reduktion (gewichteter Mittelwert ± innere Konsistenz ± externe Konsistenz)				
60	0,30 ±0,33 ±0,04	0,46 ±0,10 ±0,05	0,74 ±0,13 ±0,01	0,58 ±0,08 ±0,03
300	0,34 ±0,18 ±0,00	0,48 ±0,23 ±0,03	0,41 ±0,18 ±0,01	0,60 ±0,11 ±0,01
600	0,67 ±0,27 ±0,04	0,50 ±0,11 ±0,00	0,41 ±0,18 ±0,02	0,61 ±0,10 ±0,00
1200	1,34 ±0,23 ±0,01	0,50 ±0,23 ±0,00	0,42 ±0,10 ±0,00	0,61 ±0,08 ±0,00

Tabelle 23: mikroskopische Aufnahmen der 2D-Monolayerkulturen (10x Vergrößerung), Plasmabestrahlung, eingesetztes Virus: VSIV, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, Tox. Toxizitätskontrolle

<p>NK</p>		<p>PK (1:10 Ver- dünnung)</p>	
<p>1 min Tox.</p>		<p>5 min Tox.</p>	
<p>10 min Tox.</p>		<p>20 min. Tox</p>	
<p>1 min Plasma + Virus- zugabe</p>		<p>5 min Plasma + Virus- zugabe</p>	
<p>10 min Plasma + Virus- zugabe</p>		<p>20 min Plasma + Virus- zugabe</p>	

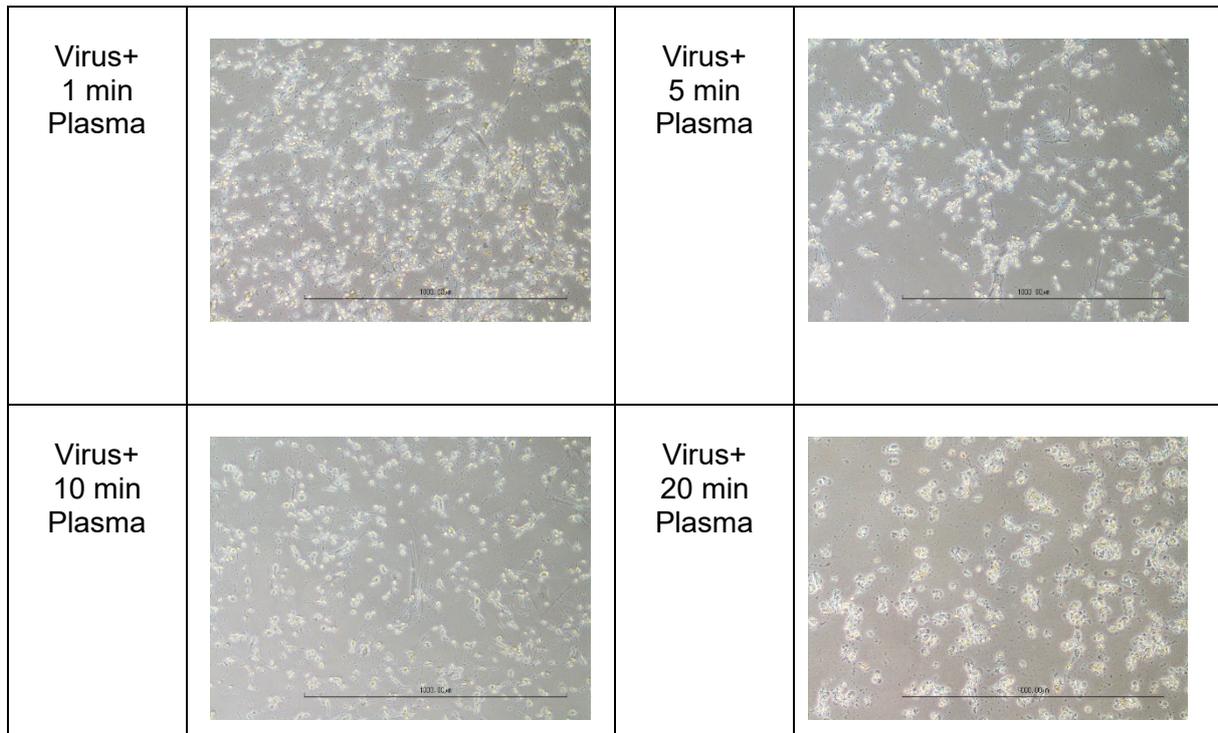


Tabelle 24: Ergebnisse der Kaltplasmabestrahlung des 3D-Mundschleimhautmodells, Inkubationszeit (IKZ) = 60 min, n=3

Bestrahlungszeiten	1 min	5 min	10 min	20 min	ATK
VSIV-Reduktion [log <sub>10</sub> TCID <sub>50</sub> /ml]	0,26	0,32	1,37	2,30	7,31
± innere Konsistenz	±0,19	±0,19	±0,19	±0,19	±0,11
± externe Konsistenz	±0,09	±0,09	±0,09	±0,09	±0,21

Tabelle 25: MTT-Test-Extinktionswerte des 3D-Schleimhautmodells (TR146) und der 2D-Monolayerkultur nach Kaltplasmabestrahlung, NK Negativkontrolle, PK Positivkontrolle, SD Standardabweichung, Tox. Toxizitätskontrolle, n=3

	3D-Schleimhautmodell		2D-Monolayerkultur	
	Extinktion bei 560 nm±SD	prozentuale Extinktion bei 560 nm	Extinktion bei 560 nm±SD	prozentuale Extinktion bei 560 nm
NK	0,1870±0,02	100,0%	0,1488±0,01	100,0%
PK	0,1329±0,01	69,9%	0,0993±0,01	66,6%
Tox. 1 min	0,1499±0,00	69,7%	0,0982±0,01	73,4%
Tox. 5 min	0,1431±0,01	68,1%	0,0977±0,01	71,8%
Tox. 10 min	0,1397±0,01	65,7%	0,0943±0,01	69,8%
Tox. 20 min	0,1079±0,02	63,3%	0,0937±0,01	69,4%
1 min	0,1184±0,00	61,3%	0,0905±0,00	61,3%
5 min	0,1096±0,01	59,9%	0,0897±0,00	59,3%
10 min	0,1075±0,01	58,4%	0,0889±0,00	58,8%
20 min	0,1011±0,00	56,6%	0,0875±0,00	57,5%

## 11 Publikationsverzeichnis

### Vorträge

Peroxyacetic acid (PAA) based aerosol decontamination of commercial aircraft. [Jessica Kohs](#), Sandro Klafack, Karla Schwenke, Paul Siller, Janina Reißner, Holger Freese, Alina Below, Tim Lübke, Stefan Mehler, Bernd Albert, Heiko Barth, Sabine Hoelterhoff, Mathias Streitz, Marcell Engel, Jan Schinköthe, Marc Thanheiser, Uwe Rösler, Sven Reiche; Medical Biodefense Conference, Bundeswehr; Oktober 2023, München.

Peroxyacetic acid (PAA) based aerosol decontamination of commercial aircraft. [Jessica Kohs](#), Sandro Klafack, Karla Schwenke, Paul Siller, Janina Reißner, Holger Freese, Alina Below, Tim Lübke, Stefan Mehler, Bernd Albert, Heiko Barth, Sabine Hoelterhoff, Mathias Streitz, Marcell Engel, Jan Schinköthe, Marc Thanheiser, Uwe Rösler, Sven Reiche; Seminar Friedrich-Loeffler-Institut; September 2023; Greifswald-Insel Riems.

### Poster

Efficient decontamination of highly pathogenic and easily transmissible pathogens using aerosolized peroxyacetic acid. [Jessica Kohs](#), Sandro Klafack, Karla Schwenke, Paul Siller, Janina Reißner, Holger Freese, Alina Below, Tim Lübke, Stefan Mehler, Bernd Albert, Heiko Barth, Sabine Hoelterhoff, Mathias Streitz, Marcell Engel, Jan Schinköthe, Marc Thanheiser, Uwe Rösler, Sven Reiche; 9th International Symposium on Physical Protection and Decontamination, Bundeswehr; Juni 2023; Munster.

Efficient decontamination of highly pathogenic and easily transmissible pathogens using aerosolized peroxyacetic acid. [Jessica Kohs](#), Sandro Klafack, Karla Schwenke, Paul Siller, Janina Reißner, Holger Freese, Alina Below, Tim Lübke, Stefan Mehler, Bernd Albert, Heiko Barth, Sabine Hoelterhoff, Mathias Streitz, Marcell Engel, Jan Schinköthe, Marc Thanheiser, Uwe Rösler, Sven Reiche; Junior Scientist Symposium, Friedrich-Loeffler-Institut; November 2022; Greifswald-Insel Riems.

Efficient decontamination of highly pathogenic and easily transmissible pathogens using aerosolized peroxyacetic acid. [Jessica Kohs](#), Sandro Klafack, Karla Schwenke, Paul Siller, Janina Reißner, Holger Freese, Alina Below, Tim Lübke, Stefan Mehler, Bernd Albert, Heiko Barth, Sabine Hoelterhoff, Mathias Streitz, Marcell Engel, Jan Schinköthe, Marc Thanheiser, Uwe Rösler, Sven Reiche; International Symposium on Zoonoses Research; Oktober 2022; Berlin.

*In vitro* determination of the virucidal effect of UVC irradiation of different wavelengths on SARS-CoV-2 and other respiratory viruses. Jessica Kohs, Sven Reiche; Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM); September 2022; Berlin.

*In vitro* determination of the virucidal effect of UVC irradiation of different wavelengths on viruses. Jessica Kohs, Sven Reiche; Junior Scientist Symposium, Friedrich-Loeffler-Institut, online.

## 12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Zeit der meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt:

- Herrn Dr. Sven Reiche für seine Betreuung während meiner Zeit als Doktorandin, motivierenden Worte und für die Hilfe bei der Abfassung meiner Dissertation.
- Herrn Prof. Dr. Uwe Rösler für die Bereitstellung und wissenschaftlichen Betreuung dieser Promotionsarbeit.
- Herrn Prof. Dr. Jens Teifke für seine wissenschaftliche Betreuung und konstruktive Unterstützung bei diversen Fragestellungen und der Abfassung meiner Dissertation.
- Herrn PD Dr. Nicolai Denzin für seine konstruktive Unterstützung bei dem Verfassen meiner Promotionsarbeit.

Weiterhin danke ich:

- Herrn Sven Sander für die intensive Einarbeitung und stets hilfreiche und engagierte Unterstützung im Labor.
- Herrn Mathias Streit, Frau Alina Below und Herrn Holger Freese für ihre motivierenden Worte sowie für ihre hilfreichen Ratschläge bei allen Fragen und Problemen.
- meiner Familie für die aufbauenden Worte, für Rat und Tat sowie für ihre finanzielle Unterstützung während des Studiums.
- Janine für die liebevolle Unterstützung und für die Geduld zu jeder Zeit der Dissertation.

### 13 Finanzierungsquelle

Diese Arbeit wurde finanziert durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Rahmen des Forschungsprojektes „CorsaVir“ sowie das Bundesministerium für Gesundheit im Rahmen des Forschungsprojektes „DryFogTraffic“.



Es besteht kein Interessenkonflikt gegenüber der hier angegebenen finanziellen Unterstützung oder gegenüber Dritten in Bezug auf die vorliegende Arbeit.

#### **14 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Greifswald, 21.06.2024

Jessica Kohs