

## Fern-UVC-Licht: Ein neues Werkzeug zur Kontrolle der Ausbreitung luftgetragener mikrobieller Krankheiten

### Abstrakt

Durch die Luft übertragene mikrobielle Krankheiten wie Influenza und Tuberkulose stellen große Herausforderungen für die öffentliche Gesundheit dar. Ein direkter Ansatz zur Verhinderung der Übertragung durch die Luft ist die Inaktivierung von Krankheitserregern in der Luft, und das antimikrobielle Potenzial von UVC-UV-Licht in der Luft ist seit langem bekannt. Ihre weit verbreitete Verwendung in öffentlichen Einrichtungen ist jedoch begrenzt, da herkömmliche UVC-Lichtquellen sowohl krebserregend als auch kataraktogen sind. Im Gegensatz dazu haben wir zuvor gezeigt, dass fernes UVC-Licht (207-222 nm) Bakterien effizient inaktiviert, ohne die exponierte Haut von Säugetieren zu schädigen. Dies liegt daran, dass fernes UVC-Licht aufgrund seiner starken Absorption in biologischen Materialien nicht einmal die äußeren (nicht lebenden) Schichten der menschlichen Haut oder des Auges durchdringen kann; Da Bakterien und Viren jedoch Mikrometer- oder kleinere Abmessungen haben, können Fern-UVC sie durchdringen und inaktivieren. Wir zeigen zum ersten Mal, dass fern-UVC aerosolisierte Viren in der Luft effizient inaktiviert, wobei eine sehr niedrige Dosis von  $2 \mu\text{mJ}/\text{cm}^2$  222-nm-Licht  $> 95\%$  des aerosolisierten H1N1-Influenzavirus inaktiviert. Kontinuierliches Fern-UVC-Licht mit sehr niedriger Dosisleistung in öffentlichen Innenräumen ist ein vielversprechendes, sicheres und kostengünstiges Instrument, um die Ausbreitung von durch die Luft übertragenen mikrobiellen Krankheiten zu reduzieren.

### Einführung

Durch die Luft übertragene mikrobielle Erkrankungen stellen eine der größten Herausforderungen für die öffentliche Gesundheit weltweit dar<sup>1</sup>. Häufige Beispiele sind Influenza<sup>2</sup>, die in saisonaler<sup>3</sup> und pandemischer<sup>4</sup> Form auftritt, und bakteriell bedingte luftübertragene Krankheiten wie Tuberkulose<sup>5</sup>, die zunehmend in multiresistenter Form auftreten.

### Einführung

Durch die Luft übertragene mikrobielle Erkrankungen stellen eine der größten Herausforderungen für die öffentliche Gesundheit weltweit dar<sup>1</sup>. Häufige Beispiele sind Influenza<sup>2</sup>, die in saisonaler<sup>3</sup> und pandemischer<sup>4</sup> Form auftritt, und bakteriell bedingte luftübertragene Krankheiten wie Tuberkulose<sup>5</sup>, die zunehmend in multiresistenter Form auftreten.

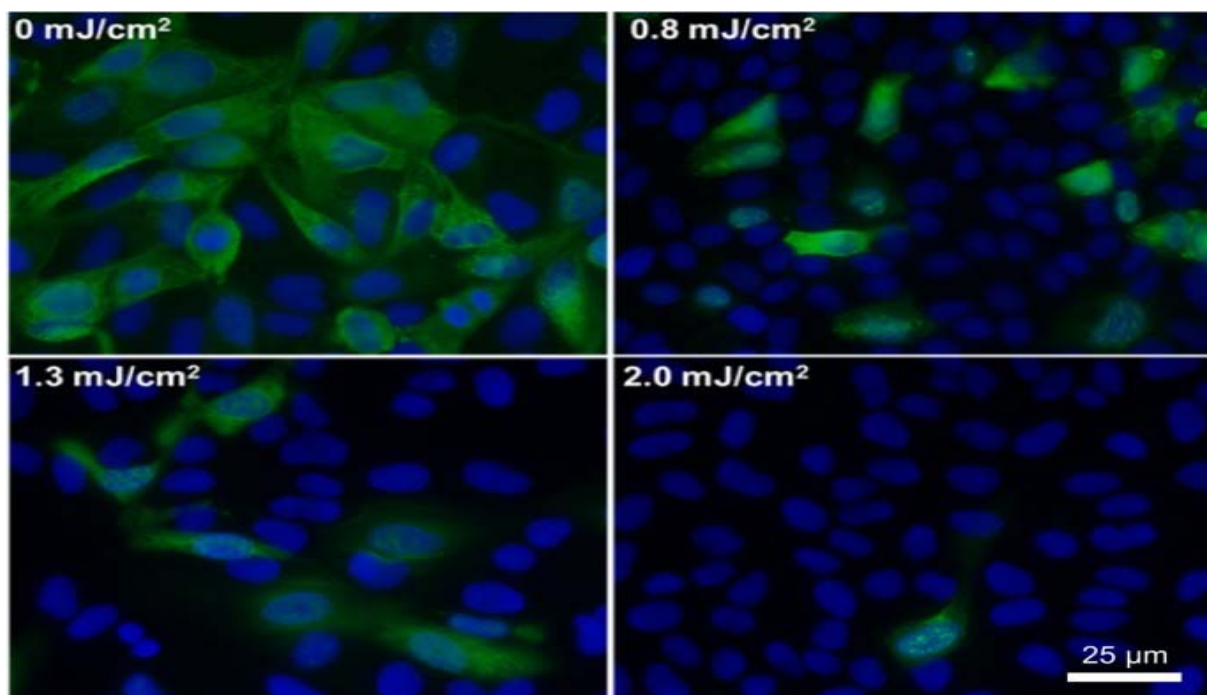
Im Gegensatz dazu haben wir früher gezeigt, dass fernes UVC-Licht, das von gefilterten Excimerlampen erzeugt wird, die im Wellenlängenbereich von 207 bis 222 nm emittieren, arzneimittelresistente Bakterien wirksam inaktiviert, ohne die exponierte Haut von Säugetieren offensichtlich zu schädigen<sup>13,14,15</sup>. Der biophysikalische Grund ist, dass fernes UVC-Licht aufgrund seiner starken Absorption in biologischen Materialien keine ausreichende Reichweite hat, um selbst die äußere Schicht (Stratum corneum) auf der Oberfläche der menschlichen Haut oder die äußere Tränenschicht auf der äußeren Haut zu durchdringen. Augenoberfläche, von denen keine lebende Zellen enthält; Da Bakterien und Viren jedoch typischerweise Mikrometer oder kleinere Abmessungen aufweisen, kann Licht im fernen UVC-Bereich sie dennoch effizient durchdringen und inaktivieren<sup>13,14,15</sup>.

Die früheren Studien zur keimtötenden Wirksamkeit von fernem UVC-Licht<sup>13,15,16,17,18</sup> wurden durchgeführt, indem Bakterien auf einer Oberfläche oder in Suspension bestrahlt wurden. Da ein Hauptweg für die Verbreitung von Influenza A die Aerosolübertragung ist<sup>3</sup>, untersuchen wir erstmals die Wirksamkeit von 222-nm-Licht im fernen UVC-Bereich zur Inaktivierung von luftgetragenen Viren in Aerosolen – mit dem Ziel, eine potenziell sichere Alternative zu herkömmlichen . bereitzustellen 254-nm-keimtötende Lampen zur Inaktivierung von Mikroben in der Luft.

## Ergebnisse

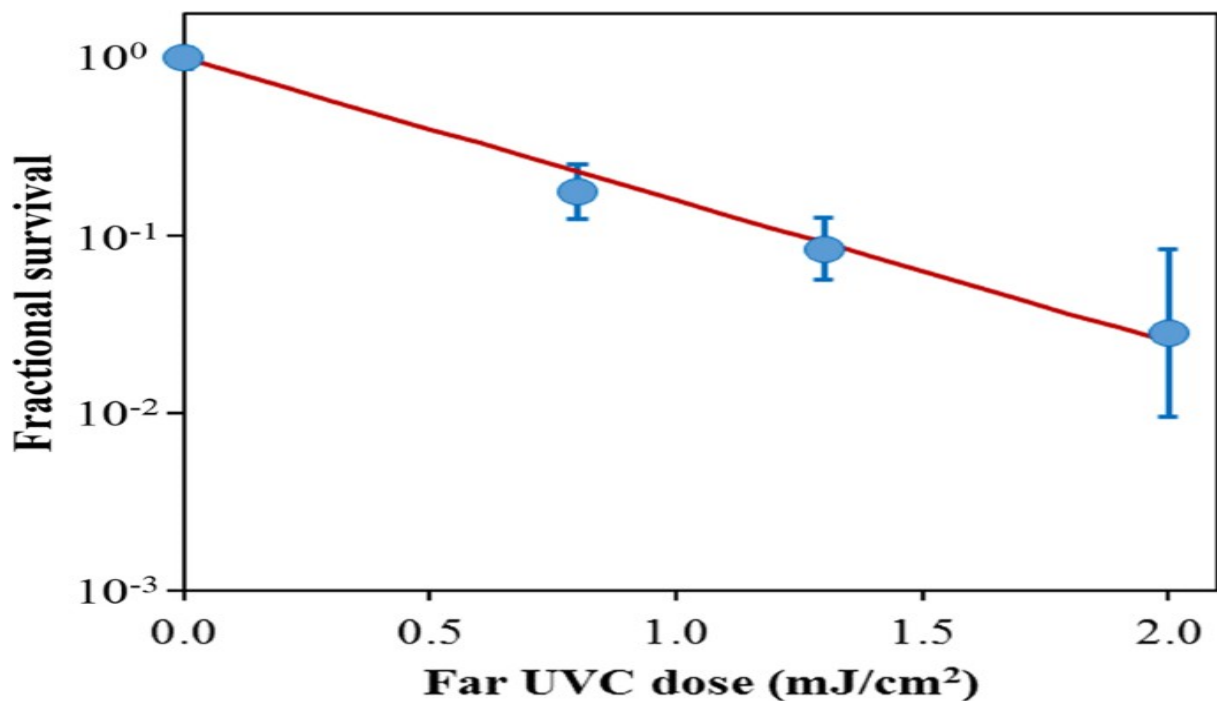
### Virusinaktivierung

Abbildung 1 zeigt repräsentative fluoreszierende 40-fache Bilder von Säugetierepithelzellen, die mit luftgetragenen Viren inkubiert wurden, die in aerosolisierte Form fernen UVC-Dosen (0, 0,8, 1,3 oder 2,0 mJ/cm<sup>2</sup>) ausgesetzt wurden, die von gefilterten 222-nm-Excimerlampen erzeugt wurden. Blaue Fluoreszenz wurde verwendet, um die Gesamtzahl der Zellen in einem bestimmten Sichtfeld zu identifizieren, während grüne Fluoreszenz die Integration von lebenden Influenza A (H1N1)-Viren in die Zellen anzeigte. Die Ergebnisse der Nulldosis-Kontrollstudien (Abb. 1, oben links) bestätigten, dass die Aerosol-Bestrahlungskammer die aerosolisierten Viren effizient durch das System transportierte, wonach das lebende Virus die Testepithelzellen von Säugetieren effizient infizierte.



Antivirale Wirksamkeit verschiedener niedriger Dosen von 222-nm-fernem UVC-Licht. Typische Fluoreszenzbilder von MDCK-Epithelzellen, die mit dem Influenza-A-Virus (H1N1) infiziert sind. Die Viren wurden in aerosolisierte Form in der Bestrahlungskammer Dosen von 0, 0,8, 1,3 oder 2,0 mJ/cm<sup>2</sup> 222-nm-Fern-UVC-Licht ausgesetzt. Infizierte Zellen fluoreszieren grün (blau=Nuklearfärbung DAPI; grün=Alexa Fluor-488 konjugiert an Anti-Influenza-A-Antikörper). Die Bilder wurden mit einem 40×-Objektiv aufgenommen.

2 zeigt die überlebende Fraktion als Funktion der einfallenden 222-nm-Fern-UVC-Dosis exponierter H1N1-Aerosolviren, gemessen durch die Anzahl der fokusbildenden Einheiten in inkubierten Epithelzellen im Vergleich zu unbelichteten Kontrollen. Lineare Regressionen (siehe unten) zeigten, dass die Überlebensergebnisse mit einem klassischen exponentiellen UV-Desinfektionsmodell mit einer Geschwindigkeitskonstanten  $k = 1,8 \text{ cm}^2/\text{mJ}$  (95 % Konfidenzintervall  $1,5\text{--}2,1 \text{ cm}^2/\text{mJ}$ ) konsistent waren. Die Gesamtanpassung des Modells war gut, mit einem Bestimmtheitskoeffizienten  $R^2 = 0,95$ , was darauf hindeutet, dass der größte Teil der Variabilität des Virusüberlebens durch das Exponentialmodell erklärt wurde. Die Geschwindigkeitskonstante von  $1,8 \text{ cm}^2/\text{mJ}$  entspricht einem Inaktivierungsquerschnitt (erforderliche Dosis zur Inaktivierung von 95 % der exponierten Viren) von  $D_{95} = 1,6 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  (95 % Konfidenzintervall  $1,4\text{--}1,9 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ).



Quantifizierung der antiviralen Wirksamkeit von 222-nm-Fern-UVC-Licht. Das fraktionierte Überleben, FFUUV/FFUcontrols, ist als Funktion der 222-nm-Fern-UVC-Dosis aufgetragen. Mittelwerte und Standardabweichungen beziehen sich auf Dreifach-Wiederholungsstudien und die Linie repräsentiert die am besten passende Regression zu Gl. 1 (siehe Text).

## Diskussion

Wir haben einen Ansatz zur UV-basierten Sterilisation unter Verwendung von Einzelwellenlängen-Fern-UVC-Licht entwickelt, das von gefilterten Exzilampen erzeugt wird, die Mikroorganismen selektiv inaktivieren, aber keine biologischen Schäden an exponierten Säugerzellen und -geweben verursachen<sup>13,14,15</sup>. Der Ansatz basiert auf biophysikalischen Prinzipien, da fern-UVC-Licht Bakterien und Viren, die typischerweise Mikrometer-Dimensionen oder kleiner sind, durchdringen und damit inaktivieren kann, während fern-UVC-Licht aufgrund seiner starken Absorption in biologischen Materialien nicht einmal die äußeren Toten durchdringen kann. Zellschichten der menschlichen Haut, noch die äußere Tränenschicht auf der Augenoberfläche.

Hier haben wir diesen Ansatz angewendet, um die Wirksamkeit des 222-nm-Fern-UVC-Lichts zur Inaktivierung des Influenza-A-Virus (H1N1), das von Aerosolen getragen wird, in einer Benchtop-Aerosol-UV-Bestrahlungskammer zu testen, die Aerosoltröpfchen mit ähnlichen Größen wie beim menschlichen Husten erzeugte und Atmung. Aerosolisierte Viren, die durch die Bestrahlungskammer strömten, wurden UVC-emittierenden Lampen ausgesetzt, die vor dem Kammerfenster platziert wurden.

Wie in Abb. 2 gezeigt, folgt die Inaktivierung des Influenza-A-Virus (H1N1) durch 222-nm-Fern-UVC-Licht einem typischen exponentiellen Desinfektionsmodell mit einem Inaktivierungsquerschnitt von  $D_{95}=1,6 \text{ mJ/cm}^2$  (95%-KI: 1,4– 1,9). Zum Vergleich fanden McDevitt et al.<sup>19</sup> unter Verwendung einer ähnlichen Versuchsanordnung, jedoch unter Verwendung einer herkömmlichen keimtötenden UVC-Lampe mit 254 nm, einen  $D_{95}$ -Wert von 1,1  $\text{mJ/cm}^2$  (95% CI: 1,0–1,2) für das H1N1-Virus. Wie wir<sup>13,15</sup> und andere<sup>16,17,18</sup> in früheren Studien zur bakteriellen Inaktivierung berichtet haben, sind 222-nm-Fern-UVC-Licht und 254-nm-Breitspektrum-Keimtötungslicht auch hinsichtlich ihrer Wirksamkeiten für die aerosolisierte Virusinaktivierung vergleichbar. Andere neuere Arbeiten, in denen die Virusinaktivierung über das UVC-Spektrum verglichen wurde, haben gezeigt, dass Effizienzwankungen erwartet werden, aber im Allgemeinen sind beide Bereiche des Spektrums bei der Inaktivierung wirksam, obwohl die genaue Ursache der Inaktivierung unterschiedlich sein kann<sup>20,21</sup>. Wie jedoch oben erörtert, scheint Fern-UVC-Licht auf der Grundlage biophysikalischer Überlegungen und im Gegensatz zu den bekannten Sicherheitsproblemen der menschlichen Gesundheit, die mit konventionellem keimtötenden 254-nm-Breitspektrum-UVC-Licht verbunden sind, in vitro für exponierte menschliche Zellen und Gewebe nicht zytotoxisch zu sein oder in vivo<sup>13,14,15</sup>.

Wenn diese Ergebnisse in anderen Szenarien bestätigt werden, folgt daraus, dass die Verwendung von Overhead-Low-Level-Fern-UVC-Licht an öffentlichen Orten eine sichere und effiziente Methode zur Begrenzung der Übertragung und Ausbreitung luftgetragener mikrobieller Krankheiten wie Influenza und Tuberkulose darstellen kann. Tatsächlich ist der potenzielle Einsatz von ultraviolett Licht zur Luftdesinfektion keineswegs neu und wurde erstmals vor mehr als 80 Jahren nachgewiesen<sup>8,22</sup>. Bei der in jüngerer Zeit angewandten luftgetragenen ultravioletten keimtötenden Bestrahlung (UVGI) wird im oberen Teil des Raums konventionelles keimtötendes UVC-Licht mit Lamellen verwendet, um eine direkte Exposition potenziell besetzter Raumbereiche zu verhindern<sup>23</sup>. Dies führt dazu, dass mehr als 95 % der aus dem UVGI-Gerät austretenden UV-Strahlung blockiert werden, was zu einer erheblichen Verringerung der Wirksamkeit führt<sup>24</sup>. Im Gegensatz dazu könnte die Verwendung von Low-Level-Fern-UVC-Lampen, die potenziell sicher für die Exposition des Menschen sind, die gewünschten antimikrobiellen Vorteile ohne die begleitenden Gesundheitsbedenken der herkömmlichen keimtötenden UVGI-Lampe bieten.

Ein wesentlicher Vorteil des UVC-basierten Ansatzes, der im deutlichen Gegensatz zu Impfansätzen steht, besteht darin, dass UVC-Licht wahrscheinlich gegen alle luftgetragenen Mikroben wirksam ist. Obwohl es zum Beispiel mit ziemlicher Sicherheit Variationen der UVC-Inaktivierungseffizienz geben wird, wenn verschiedene Influenza-Stämme auftreten, ist es unwahrscheinlich, dass sie groß sind<sup>7,10</sup>. Ebenso ist es unwahrscheinlich, dass sich ihre UVC-Inaktivierungseffizienzen stark ändern, wenn multiresistente Varianten von Bakterien auftauchen<sup>9</sup>.

Zusammenfassend haben wir zum ersten Mal gezeigt, dass sehr niedrige Dosen von fernem UVC-Licht durch Aerosole übertragene Viren in der Luft effizient inaktivieren. Beispielsweise inaktiviert eine sehr niedrige Dosis von 2 mJ/cm<sup>2</sup> 222-nm-Licht > 95 % des luftgetragenen H1N1-Virus. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Fern-UVC-Licht ein leistungsstarker und kostengünstiger Ansatz zur Vorbeugung und Reduzierung von Virusinfektionen in der Luft ist, ohne die mit herkömmlichen keimtötenden UVC-Lampen verbundenen Gesundheitsgefahren für den Menschen. Wenn diese Ergebnisse in anderen Szenarien bestätigt werden, folgt daraus, dass die Verwendung von Overhead-Fern-UVC-Licht mit sehr geringer Intensität an öffentlichen Orten eine sichere und effiziente Methode zur Begrenzung der Übertragung und Ausbreitung von durch die Luft übertragenen mikrobiellen Krankheiten darstellen kann. In Frage kommen hier öffentliche Orte wie Krankenhäuser, Arztpraxen, Schulen, Flughäfen und Flugzeuge. Dieser Ansatz kann dazu beitragen, saisonale Influenza-Epidemien, die Übertragung von Tuberkulose sowie größere Pandemien zu begrenzen.

## Methoden

### Fern-UVC-Lampen

Wir verwendeten eine Reihe von drei Excimerlampen, die ein Kr-Cl-Gasgemisch enthielten, das überwiegend bei 222 nm emittiert<sup>25,26</sup>. Das Austrittsfenster jeder Lampe wurde mit einem kundenspezifischen Bandpassfilter bedeckt, der entworfen wurde, um alle bis auf die dominante Emissionswellenlänge zu entfernen, wie zuvor beschrieben<sup>15</sup>. Jeder Bandpassfilter (Omega Optical, Brattleboro, VT) hatte eine Mittenwellenlänge von 222 nm und eine Halbwertsbreite (FWHM) von 25 nm und ermöglicht >20% Transmission bei 222 nm. Zur Verifizierung des 222-nm-Emissionsspektrums wurde ein UV-Spektrometer (SPM-002-BT64, Photon Control, BC, Kanada) mit einem Empfindlichkeitsbereich zwischen 190 nm und 400 nm verwendet. Zur radiometrischen Kalibrierung des UV-Spektrometers wurde ein Deuteriumlampenstandard mit einer auf NIST rückführbaren spektralen Bestrahlungsstärke (Newport Model 63945, Irvine, CA) verwendet. Ein SM-70-Ozonmonitor (Aeroqual, Avondale, Auckland, Neuseeland) maß die Ozonerzeugung der Lampen mit <0,005 ppm, was kein signifikanter Wert ist, um eine antimikrobielle Wirkung auf aerosolisierte Viren zu erzielen<sup>27</sup>.

### Fern-UVC-Dosimetrie

Die Messungen der optischen Leistung wurden unter Verwendung eines 818-UV/DB-Silizium-Photodetektors mit niedriger Leistung UV-verstärkt mit einem optischen Leistungsmesser 843-R (Newport, Irvine, CA) durchgeführt. Zusätzliche Dosimetrie zur Bestimmung der Gleichmäßigkeit der UV-Exposition wurde unter Verwendung von fern-UVC-empfindlichen Filmen durchgeführt, wie in unserer früheren Arbeit beschrieben<sup>28,29</sup>. Dieser Film hat eine hohe räumliche Auflösung mit der Fähigkeit, Merkmale bis mindestens 25 µm aufzulösen, und zeigt eine nahezu ideale Kosinusantwort<sup>30,31</sup>. Zwischen den Experimenten wurden Messungen durchgeführt, wodurch die Platzierung von Sensoren innerhalb der Kammer ermöglicht wurde.

Ein Bereich von Fern-UVC-Expositionen von 3,6 µJ/cm<sup>2</sup> bis zu 281,6 mJ/cm<sup>2</sup> wurde verwendet, um eine Reaktionskalibrierungskurve zu definieren. Die Filme wurden als 48-Bit-RGB-TIFF-Bilder mit 150 dpi unter Verwendung eines Flachbettscanners Epson Perfection V700 Photo (Epson, Japan) gescannt und mit einer Software zur Analyse radiochromer Filme<sup>32</sup> analysiert, um die Gesamtbelichtung basierend auf den gemessenen Änderungen der optischen Dichte zu berechnen.

Messungen unter Verwendung von sowohl einem Siliziumdetektor als auch UV-empfindlichen Filmen wurden kombiniert, um die Gesamtdosis zu berechnen, die von einem Partikel empfangen wurde, der das Belichtungsfenster durchquert. Die drei vertikal gestapelten Lampen erzeugten eine nahezu gleichmäßige Dosisverteilung entlang der vertikalen Achse, sodass jedes horizontal durch die Bestrahlungskammer hindurchtretende Partikel eine identische Dosis erhielt. Die Lampenbreite (100 mm) war kleiner als die Breite des Bestrahlungskammerfensters (260 mm), so dass die Lampenleistung nahe der Mitte des Bestrahlungskammerfensters im Vergleich zum Rand höher war. Der UV-empfindliche Film zeigte eine Leistung von ungefähr  $120 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  im mittleren Drittel des Fensters und  $70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  für die äußeren Drittel an. Der Siliziumdetektor wurde verwendet, um das Reflexionsvermögen des Aluminiumblechs bei ungefähr 15% der einfallenden Leistung zu quantifizieren. Die Kombination dieser Daten ermöglichte die Berechnung der durchschnittlichen Gesamtdosis von  $2,0 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  für ein Partikel, das das Fenster in 20 Sekunden durchquert. Außerdem wurde der Siliziumdetektor verwendet, um zu bestätigen, dass die Abschwächung von 222-nm-Licht durch eine einzelne Plastikfolie 65% betrug. Die Zugabe von ein oder zwei Plastikfolien zwischen den Lampen und dem Bestrahlungskammerfenster ergab durchschnittliche Dosen von  $1,3 \text{ mJ}/\text{cm}^2$  bzw.  $0,8 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ .

#### Benchtop-Aerosol-Bestrahlungskammer

Eine dynamische Aerosol/Virus-Bestrahlungskammer mit einem Durchgang wurde in einer ähnlichen Konfiguration konstruiert, wie sie von Ko et al.<sup>33</sup>, Lai et al.<sup>34</sup> und McDevitt et al.<sup>19,35</sup> verwendet wurde. Eine schematische Übersicht über das System ist in Abb. 3 dargestellt und in Abb. 4 dargestellt. Aerosolisierte Viren wurden durch Zugabe einer Viruslösung in einen Hochleistungs-Vernebler mit erweiterter Aerosol-Atemtherapie (HEART) (Westmed, Tucson, AZ) erzeugt und betrieben mit einer Doppelpumpe (Thermo Fisher 420-2901-00FK, Waltham, MA) mit einer Eingangsflussrate von 11 L/min. Das aerosolisierte Virus strömte in die Bestrahlungskammer, wo es mit unabhängig kontrollierten Zufuhren von befeuchteter und getrockneter Luft vermischt wurde. Befeuchtete Luft wurde erzeugt, indem Luft durch Wasser gesprudelt wurde, während trockene Luft bereitgestellt wurde, indem Luft durch einen Trockenlufttrockner (X06-02-00, Wilkerson Corp, Richland, MI) geleitet wurde. Die Anpassung des Verhältnisses von feuchter und trockener Luft ermöglichte die Steuerung der relativen Luftfeuchtigkeit (RH) innerhalb der Bestrahlungskammer, die zusammen mit den Verneblereinstellungen die Aerosol-Partikelgrößenverteilung bestimmte. Ein optimaler RH-Wert von 55% führte zu einer Verteilung der Aerosolpartikelgrößen ähnlich der natürlichen Verteilung beim Husten und Atmen des Menschen, die nachweislich um etwa  $1 \mu\text{m}$  verteilt ist, mit einem signifikanten Partikelschwanz von weniger als  $1 \mu\text{m}$ <sup>36,37,38</sup>.

Nach Kombinieren der Feuchtigkeitskontroll-Inputs mit dem aerosolisierten Virus wurde der Input-Flow durch eine Reihe von Prallblechen geleitet, die das Trocknen und Mischen der Tröpfchen förderten, um eine gleichmäßige Partikelverteilung und stabile Feuchtigkeit zu erzeugen<sup>34</sup>. Die relative Luftfeuchtigkeit und die Temperatur innerhalb der Bestrahlungskammer wurden unter Verwendung eines Omega RH32-Messgeräts (Omega Engineering Inc., Stamford, CT) unmittelbar nach den Ablenkblechen überwacht. Ein Partikelgrößenmessgerät HAL-HPC300 von Hal Technologies (Fontana, CA) wurde an die Bestrahlungskammer angeschlossen, um eine Probenahme der Partikelgrößen während des gesamten Betriebs zu ermöglichen.

Während der UV-Belichtung wurden die 222-nm-Lampen 11 cm vom Bestrahlungskammerfenster entfernt platziert. Die Lampen wurden auf das  $26 \text{ cm} \times 25,6 \text{ cm}$  große Kammerfenster gerichtet, das aus einer  $254 \mu\text{m}$  dicken UV-

transparenten Kunststofffolie (Topas 8007x10, Topas Advanced Polymers, Florence, KY) konstruiert war und eine Transmission von ~65% bei 222nm . aufwies . Die dem transparenten Fenster gegenüberliegende Wand der Bestrahlungskammer wurde mit poliertem Aluminium konstruiert, um einen Teil des UVC-Lichts durch den Belichtungsbereich zurückzereflektieren, wodurch die Gesamtbelichtungsdosis erhöht wird, indem Photonen in beide Richtungen passieren. Die Tiefe der Bestrahlungskammer zwischen dem Fenster und der Aluminiumplatte betrug 6,3 Zoll, was ein Gesamtbelichtungsvolumen von 4,2 Zoll ergab.

Die Aerosole strömen weiter aus der Bestrahlungskammer zu einem Satz von Dreiwegeventilen, die so konfiguriert werden könnten, dass sie entweder durch einen Bypasskanal (verwendet, wenn keine Probenahme erforderlich war) oder einen BioSampler (SKC Inc, Eighty Four, PA) verwendet um das Virus zu sammeln. Der BioSampler verwendet einen Schallflusssaufprall auf eine Flüssigkeitsoberfläche, um Aerosole zu sammeln, wenn er mit einem Luftstrom von 12,5 l/min betrieben wird. Schließlich wurde der Fluss aus dem System durch einen abschließenden HEPA-Filter und zu einer Vakuumpumpe (WP6111560, EMD Millipore, Billerica, MA) fortgesetzt. Die Vakuumpumpe am Ende des Systems strömt durch die Bestrahlungskammer. Die Flussrate durch das System wurde durch den BioSampler geregelt. Bei gegebener Flussrate und dem Gesamtexpositionsvolumen der Bestrahlungskammer, 4,2 l, passierte ein einzelnes Aerosoltröpfchen das Expositionsvolumen in ungefähr 20 Sekunden.

Die gesamte Bestrahlungskammer wurde in einem zertifizierten biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II Typ A2 (Labconco, Kansas City, MO) aufgestellt. Alle Luftein- und -ausgänge wurden mit HEPA-Filtern (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA) ausgestattet, um zu verhindern, dass unerwünschte Kontaminationen in die Kammer gelangen und das Virus nicht in die Umgebung freigesetzt wird.

#### Leistung der Bestrahlungskammer

Die maßgefertigte Bestrahlungskammer simulierte die Übertragung von aerosolisierten Viren, die durch das Husten und Atmen des Menschen erzeugt werden. Die Kammer arbeitete bei einer relativen Feuchtigkeit von 55 %, was zu einer Teilchengrößenverteilung von 87 % zwischen 0,3 µm und 0,5 µm, 11 % zwischen 0,5 µm und 0,7 µm und 2 % > 0,7 µm führte. Ein Vergleich mit veröffentlichten Bereichen der Partikelgrößenverteilung ist in Tabelle 1 gezeigt. Aerosolisierte Viren wurden effizient durch das System übertragen, wie aus der Kontrolle (keine Exposition) hervorgeht, die eine klare Virusintegration zeigt (Abb. 1 .).

#### Versuchsprotokoll

Die Viruslösung im Vernebler bestand aus 1 µl Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Life Technologies, Grand Island, NY) mit 108 fokusbildenden Einheiten pro ml (FFU/ml) Influenza-A-Virus [A/PR/8/34 (H1N1)], 20 ml entionisiertes Wasser und 0,05 ml Hank's Balanced Salt Solution with Calcium and Magnesium (HBSS++). Die Bestrahlungskammer wurde vor der Probenahme mit aerosolisierten Viruspartikeln betrieben, die durch die Kammer und den Bypasskanal strömten, 15 Minuten lang, um den gewünschten RH-Wert von ~55% einzustellen. Die Probennahme wird durch Ändern des Luftstroms vom Bypass-Kanal zum BioSampler mithilfe des Dreiwegeventilsatzes eingeleitet. Der BioSampler wurde anfänglich mit 20 ml HBSS++ gefüllt, um das Aerosol einzufangen. Während jeder Probenahmezeit, die 30 Minuten dauerte, wurde das Innere der Bestrahlungskammer durch das

halbtransparente UVC-Kunststofffenster einem 222-nm-fernen UVC-Licht ausgesetzt. Eine Variation der an Aerosolpartikel abgegebenen Fern-UVC-Dosis wurde durch Einfügen zusätzlicher halbtransparenter UVC-Kunststofffolien, identisch mit dem Material, das als Kammerfenster verwendet wurde, zwischen den Lampen und dem Kammerfenster erreicht. Die zusätzlichen Kunststofffolien reduzierten gleichmäßig die in die Kammer eintretende Leistung. Die drei Testdosen von 0,8, 1,3 und 2,0 mJ/cm<sup>2</sup> wurden durch Zugabe von zwei, einer bzw. keiner zusätzlichen Kunststofffolien erreicht. Null-Dosis-Kontrollstudien wurden mit ausgeschalteten Excimerlampen durchgeführt. Die Experimente mit jeder Dosis wurden dreifach wiederholt. Für jeden Versuchsdurchlauf wurde ein frisch sterilisierter BioSampler verwendet, um eine unerwünschte Kontamination zu vermeiden. Negativkontrollen, bei denen das Virus aus der Verneblermischung weggelassen wurde, wurden intermittierend durchgeführt und zeigten keine Virussammlung im BioSampler. Nach Ablauf der Probenahmezeit wurde die Lösung aus dem BioSampler für den Virusinfektiositätstest verwendet.

### Virusinfektiosität-Assay

Wir haben die virale Infektiosität mit einem fokusbildenden Assay gemessen, der Standard-Fluoreszenz-Immunfärbungstechniken verwendet, um infizierte Wirtszellen und infektiöse Viruspartikel nachzuweisen<sup>39</sup>. Kurz gesagt, nach 30-minütigem Durchlaufen der Bestrahlungskammer wurden 0,5 ml der aus dem BioSampler gesammelten Virussuspension auf eine Monoschicht von Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-Epithelzellen, die routinemäßig in DMEM gezüchtet wurden, ergänzt mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS), 2 mM L-Alanyl-L-glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA). Die Zellen wurden 45 Minuten mit dem Virus inkubiert, dreimal mit HBSS++ gewaschen und über Nacht in DMEM inkubiert. Infizierte Zellen wurden dann in 100 % eiskaltem Methanol bei 4 °C für 5 Minuten fixiert und mit dem Influenza-A-Virus-Nukleoprotein-Antikörper [C43] (Abcam ab128193, Cambridge, MA) 1:200 in HBSS++ mit 1 % Rinderserumalbumin (BSA) markiert; Sigma-Aldrich Corp. St. Louis, MO, USA) bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter leichtem Schütteln. Die Zellen wurden dreimal in HBSS++ gewaschen und mit Ziegen-Anti-Maus-Alexa Fluor-488 (Life Technologies, Grand Island, NY) 1:800 in HBSS++ mit 1 % BSA bei Raumtemperatur 30 Minuten lang unter leichtem Schütteln markiert. Nach dreimaligem Waschen in HBSS++ wurden die Zellen mit Vectashield gefärbt, das DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) enthielt (Victor Laboratories, Burlingame, CA) und mit den 10x und 40x Objektiven eines Olympus IX70 Fluoreszenzmikroskops beobachtet ausgestattet mit einer hochauflösenden, hocheffizienten Digitalkamera PVCAM von Photometrics. Für jede Probe wurden mindestens drei Sichtfelder von zusammengeführten DAPI- und Alexa-488-Bildern erfasst. Die Software Image-Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, Bethesda, MD) wurde verwendet, um die 10x-Bilder zu analysieren, um die FFUUV als das Verhältnis der mit dem Virus infizierten Zellen geteilt durch die Gesamtzahl der Zellen zu messen.

### Datenanalyse

Die überlebende Fraktion (S) des Virus wurde berechnet, indem die Fraktion der Zellen, die bei jeder UV-Dosis positives Viruswachstum ergaben (FFUUV), durch die Fraktion bei Null-Dosis (FFU-Kontrollen) dividiert wurde:  $S = \text{FFUUV} / \text{FFU-Kontrollen}$ . Überlebenswerte wurden für jedes Wiederholungsexperiment berechnet und der natürliche Logarithmus (ln) transformiert, um die Fehlerverteilung näher an den Normalwert zu bringen<sup>40</sup>. Eine lineare Regression wurde unter Verwendung dieser normalisierten ln[S]-Werte als abhängige Variable und UV-Dosis (D, mJ/cm<sup>2</sup>) als unabhängige Variable durchgeführt. Mit diesem Ansatz wurde das



Virusüberleben (S) an die Kinetik erster Ordnung gemäß der Gleichung 7 angepasst:

wobei  $k$  die Geschwindigkeitskonstante der UV-Inaktivierung oder der Empfindlichkeitsfaktor ( $\text{cm}^2/\text{mJ}$ ) ist. Die Regression wurde durchgeführt, wobei der Achsenabschnittsterm auf Null gesetzt wurde, was die Definition eines relativen Überlebens von 100 % bei einer UV-Dosis von Null darstellt. Bootstrap 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter  $k$  wurden mit der Software R 3.2.3 berechnet<sup>41</sup>. Der Virusinaktivierungsquerschnitt  $D_{95}$ , das ist die UV-Dosis, die 95 % des exponierten Virus inaktiviert, wurde als  $D_{95} = -\ln[1 - 0.95]/k$  berechnet.