

**Vertaald vanuit origineel <https://www.nature.com/articles/srep11431#Fig4> "Ionizing air affects influenza virus infectivity and prevents airborne-transmission" middles google translate.**

**Gepubliceerd: 23 juni 2015**

Ioniserende lucht beïnvloedt de besmettelijkheid van het influenzavirus en voorkomt overdracht via de lucht

Marie Hagbom, Johan Nordgren, Rolf Nybom, Kjell-Olof Hedlund, Hans Wigzell & Lennart Svensson

Scientific Reports volume 5, artikelnummer: 11431 (2015) Citeer dit artikel

7 Citaten

117 Altmetrisch

Metrische gegevens

### **Abstract**

Door het gebruik van een gemodificeerd ionisatieapparaat beschrijven we effectieve preventie van door de lucht overgedragen influenza A (stam Panama 99) virusinfectie tussen dieren en inactivering van het virus (> 97%). Actieve ionisator voorkwam 100% (4/4) van cavia's van infectie. Bovendien heeft het apparaat effectief het via de lucht overgedragen calicivirus, rotavirus en influenzavirus opgevangen, met herstelpercentages tot 21% na 40 minuten in een kamer van 19 m<sup>3</sup>. De ionisator genereert negatieve ionen, waardoor in de lucht zwevende deeltjes / aerosoldruppels negatief worden geladen en ze elektrostatisch naar een positief geladen collectorplaat trekken. Gevangen virussen worden vervolgens geïdentificeerd door kwantitatieve real-time PCR met omgekeerde transcriptie. Het apparaat biedt unieke mogelijkheden voor het snel en eenvoudig verwijderen van virussen uit de lucht en biedt mogelijkheden om virussen in de lucht gelijktijdig te identificeren en te voorkomen.

### **Introductie**

Er is dringend behoefte aan eenvoudige, draagbare en gevoelige apparaten om virussen uit de lucht te verzamelen, te elimineren en te identificeren, en om uitbraken en verspreiding van infectieziekten snel op te sporen en te voorkomen<sup>1</sup>. Elk jaar veroorzaken infectieziekten wereldwijd miljoenen sterfgevallen en veel van de meest voorkomende infectieuze ziekteverwekkers worden verspreid door druppeltjes of aerosolen veroorzaakt door hoesten, niezen, braken enz.<sup>2,3,4,5</sup>. De kennis van aërosoltransmissiemechanismen is beperkt voor de meeste pathogenen, hoewel verspreiding via de lucht een belangrijke transmissieroute is voor veel pathogenen, waaronder virussen<sup>6</sup>.

Tegenwoordig bestaat er geen eenvoudige gevalideerde technologie die virussen snel en gemakkelijk uit de lucht kan halen en identificeren. Het probleem is niet de analysetechniek, aangezien moleculair biologische methoden zoals real-time PCR een gevoelig detectiesysteem van de meeste pathogenen mogelijk maken<sup>7,8,9</sup>. De moeilijkheid is het ontwikkelen van een effectieve bemonsteringsmethode om snel kleine deeltjes in de lucht, waaronder virussen, uit grote hoeveelheden lucht te verzamelen. Bovendien moet de bemonsteringsmethode robuust en gemakkelijk te hanteren zijn om een brede verspreiding en toepassing in vele soorten omgevingen mogelijk te maken. Op dit moment zijn de meest gebruikte technieken om ziekteverwekkers uit de lucht te halen, luchtstroom- en vloeistofmodellen<sup>10,11,12,13,14,15</sup>. Deze systemen zijn complex en hun efficiëntie is niet grondig geëvalueerd.

De verspreiding van infectieziekten in ziekenhuizen kan het grootst zijn <sup>16,17,18</sup>. In veel situaties is er behoefte aan een pathogeen- en deeltjesvrije omgeving, b.v. in operatiezalen, omgevingen voor patiënten met immunosuppressie en voor patiënten met ernstige allergieën. Dit maakt het wenselijk om niet alleen een methode te hebben voor het verzamelen en identificeren<sup>19</sup>, maar ook voor het verwijderen van virussen en andere ziekteverwekkers uit de lucht<sup>20</sup>. Van ozongas is aangetoond dat het het norovirus inactieveert en het kan in lege kamers worden gebruikt om oppervlakken te ontsmetten, maar in kamers met patiënten mag ozon niet worden gebruikt vanwege zijn toxiciteit<sup>21</sup>. Het is eerder aangetoond dat het genereren van negatieve ionen de overdracht van het Newcastle Disease Virus <sup>22,23</sup> en verschillende soorten bacteriën <sup>24,25</sup> in proefdieropstellingen vermindert.

Het in dit onderzoek gebruikte ionisatie-apparaat werkt op 12 V en genereert negatieve ionisaties in een elektrisch veld, die botsen met de aerosoldeeltjes en deze opladen. Die worden vervolgens opgevangen door een positief geladen collectorplaat. Om veiligheidsredenen heeft de collectorplaat een zeer lage stroom, minder dan 80  $\mu$ A, maar de ionisator versnelt een spanning van meer dan 200.000 eV, wat een hoge productie van enkele miljard elektronen per seconde mogelijk maakt. Bovendien produceert dit apparaat geen detecteerbare ozonniveaus en kan het dus veilig in alle omgevingen worden gebruikt.

Het is bekend dat deze techniek kattenallergenen effectief uit de lucht verzamelt en verwijdert<sup>26</sup>. Aerosolized rotavirus-, calicivirus- en influenzavirusdeeltjes blootgesteld aan de ioniserende inrichting werden aangetrokken door de collectorplaat en vervolgens geïdentificeerd door elektronenmicroscopie en reverse transcriptie kwantitatieve real-time PCR-technieken. Het belangrijkste is dat we aantonen dat deze technologie kan worden gebruikt om door de lucht overgedragen influenzavirusinfecties te voorkomen.

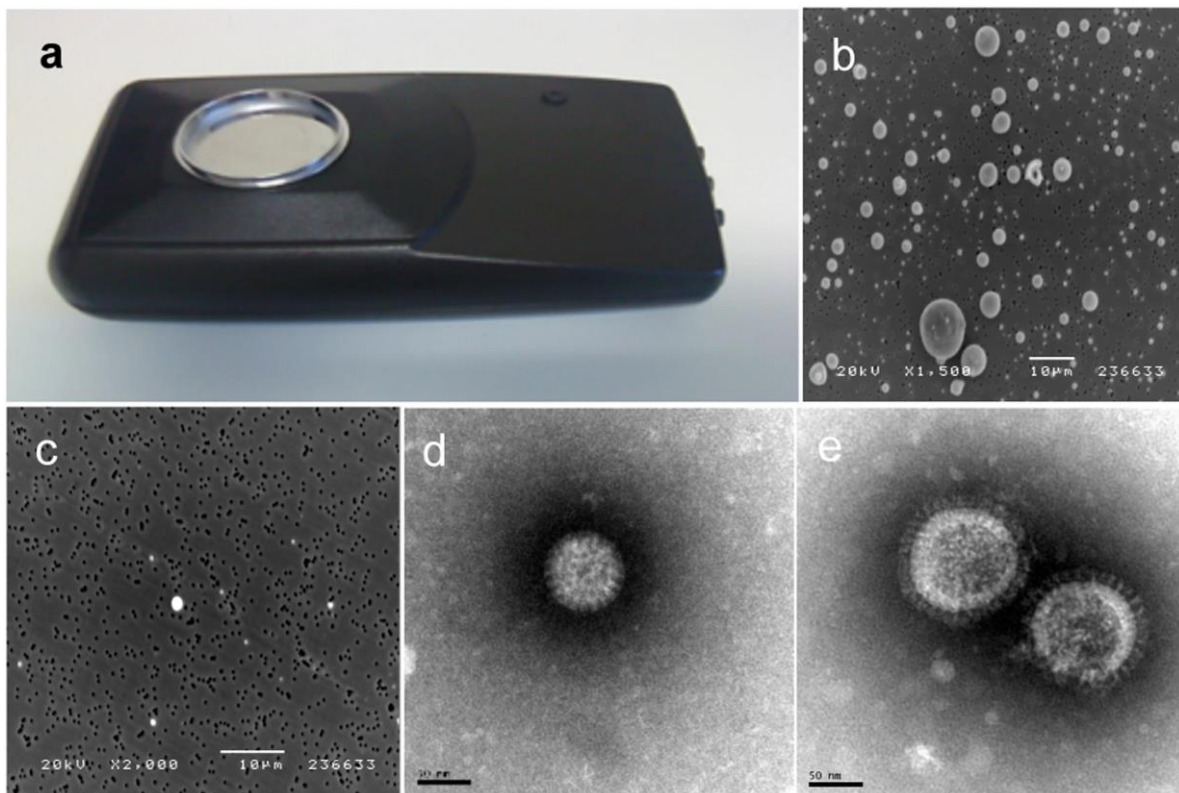
## Resultaten

Visualisatie en efficiëntie van aërosolbemonstering zoals bepaald door elektronenmicroscopie

Om de ionisatietechniek voor het verzamelen en identificeren van virale pathogenen te ontwikkelen en te valideren, hebben we verschillende virussen van klinisch belang gebruikt; calicivirus, rotavirus en griepvirus (H3N2, stam Salomon Island) evenals latexdeeltjes. Canine calicivirus (CaCV, stam 48) werd gebruikt als surrogaat<sup>27</sup> voor humaan norovirus, het etiologische middel achter de 'winterbrakenziekte', en veroorzaakte uitbraken van groot klinisch en economisch belang<sup>28</sup>. Rhesus rotavirus werd gebruikt als surrogaatmarker voor humaan rotavirus<sup>29</sup>.

Het apparaat (Fig. 1a) bestaat uit een kleine draagbare 12 volt-aangedreven ionisator, met een collectorplaat met positieve lading bevestigd aan de ionisator, die door elektrostatische aantrekking negatieve deeltjes uit de lucht aantrekt. Om optimale parameters voor tijdverzameling te bepalen, werden latexdeeltjes met afmetingen van <1 tot> 10  $\mu$ m verneveld in een ruimte van 19 m<sup>3</sup>. Uit testen bleek dat 40-60 minuten nodig waren om > 90% van de vrije latexdeeltjes in de lucht te verwijderen, zoals bepaald door real-time deeltjestelling (PortaCount Plus). De deeltjesteller kan deeltjes detecteren die groter zijn dan 0,02  $\mu$ m. Visualisatie door scanning-elektronenmicroscopie (SEM) op roosters van actieve en inactieve ionisatorcollectorplaten toonde aan dat de accumulatie van latexdeeltjes dramatisch werd verbeterd op actieve ionisatorcollectorplaten vergeleken met de inactieve (Fig. 1b, c). Vervolgens werden onder dezelfde omstandigheden hoge aantallen rotavirus en formaline-geïnactieveerd influenzavirus verneveld. Terwijl de inactieve collectorplaten na 40 minuten weinig (<5) rotavirus en influenzavirus bevatten, bevatte de actieve collector > 50 virusdeeltjes, zoals bepaald door transmissie-elektronenmicroscopie (TEM), (figuur 1d, e).

Figuur 1



Airpoint-ionisator met collectorplaat (afmeting 13 × 35 cm) (a). Het ionisatieapparaat is ontwikkeld op basis van de Ion-Flow Ionisatietechnologie van LightAir AB, Solna, Zweden en werd gemodificeerd door het installeren van een plastic beker met een geleidend oppervlak van 47 mm in diameter, met positieve lading, als de verzamelplaat; Aerosolized en ingesloten latexdeeltjes (> 1 tot <10 µm) op actieve (b) en inactieve (c) ionisator (bar = 10 µm); Rotavirus (d); en influenzavirus (H1N1; stam Salomon Island) (e) gevangen op actieve ionisator (Bar = 50 nm).

*Ioniserende lucht en elektrostatische aantrekkingskracht verzamelen aerosol-gedistribueerde virussen zoals bepaald door RT-qPCR*

Vervolgens hebben we de capaciteit van RT-qPCR-technologie bepaald om de capaciteit van de ionisatietechniek om virussen te verzamelen en te concentreren te kwantificeren. Er werden drie onafhankelijke experimenten met elk van de drie virussen uitgevoerd met dezelfde virusconcentraties in elk experiment (figuur 2a – c). Hoewel er verschillende stappen zijn van verzameling tot detectie, was het systeem robuust wat betreft reproduceerbaarheid. Uit de RT-qPCR-gegevens blijkt dat de actieve verzamelaar het virus 1500–3000 keer efficiënter concentreert en verzamelt in vergelijking met de inactieve verzamelaar (tabel 1). Wanneer verschillende virusverduningen werden gebruikt voor de aerosolproductie, lag het aandeel van het aerosolvirus dat op de actieve collector werd verzameld normaal gesproken tussen 0,1 en 0,6% voor CaCV, rotavirus en griepvirus. Een reproduceerbare bevinding met betrekking tot CaCV was een significante toename van het relatieve herstel bij de laagste concentraties, oplopend tot 10-20% van de totale hoeveelheid aerosol in het virus (tabel 1).

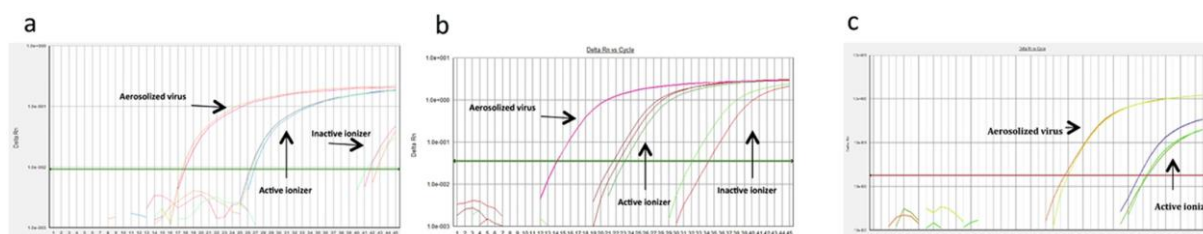
Tabel 1

Amount virus aerosolized (genes/PCR reaction)	Amount virus on collector ON (genes/PCR reaction) ±SE	Amount virus on collector OFF (genes/PCR reaction)	Recovery (%) ON	Recovery (%) OFF	Ratio (ON/OFF)
<b>CaCV</b>					
1.88 x 10 <sup>7</sup>	1.18x10 <sup>5</sup> ± 8.4x10 <sup>4</sup>	73	0.63%	0.00039%	1620
1.99 x 10 <sup>6</sup>	7.36x10 <sup>3</sup> ± 2.16x10 <sup>3</sup>	~5	0.37%	~0.00024%	~1520
9.93 x 10 <sup>5</sup>	1.66x10 <sup>3</sup> ± 4.63x10 <sup>2</sup>	not detected	0.17%	NA	NA
2.20 x 10 <sup>5</sup>	8.11x10 <sup>2a</sup>	not detected	0.37%	NA	NA
1.56 x 10 <sup>4</sup>	1.65x10 <sup>3</sup> ± 9.67x 10 <sup>2</sup>	not detected	10.60%	NA	NA
1.87 x 10 <sup>3</sup>	3.86x10 <sup>2</sup> ± 1.27x10 <sup>2</sup>	not detected	21%	NA	NA
<b>RRV</b>					
2.23 x 10 <sup>6</sup>	7.54x10 <sup>3</sup> ± 6.74x10 <sup>2</sup>	~2-3	0.34%	~0.00011%	~3000
4.85 x 10 <sup>5</sup>	6.40x10 <sup>2</sup> ± 86	Not detected	0.13%	NA	NA
9.13 x 10 <sup>4</sup>	41 ± 21	Not detected	0.05%	NA	NA
<b>Influenza virus</b>					
4.30 x 10 <sup>6</sup>	3.33x10 <sup>3</sup> ± 7.22x10 <sup>2</sup>	Not detected	0.08%	NA	NA

Table 1. Collection efficiency of aerosolized CaCV, rhesus rotavirus (RRV) and Influenza A virus in various concentrations as determined by RT-q PCR. a) This experiment was performed only once.

Verzamelingsefficiëntie van aerosolized CaCV, rhesus rotavirus (RRV) en Influenza A-virus in verschillende concentraties zoals bepaald door RT-q PCR.

Figuur 2



Real-time PCR op gevangen rotavirus (a), calicivirus (b) en influenzavirus (H1N1; stam Salomon Island) (c). Merk op dat er geen influenzavirus werd gedetecteerd op de inactieve ionisator.

#### *Ioniserende lucht vermindert de infectiviteit van calicivirus en rotavirus*

Vervolgens bepaalden we of verzamelde virussen hun besmettelijkheid behielden nadat ze waren blootgesteld aan negatieve ionen en / of nadat ze waren blootgesteld aan de positief geladen collectorplaat. Vijf ml celweekmedium (Eagles Minimal Essential Media (Eagles MEM)) dat  $1 \times 10^6$  peroxidase vormende eenheden van respectievelijk rotavirus van CaCV bevatte, werd aerosol gemaakt en gedurende 40 minuten verzameld op een actieve verzamelplaat, die 1 ml Eagles MEM bevatte. CaCV in celweekmedium werd ook direct blootgesteld aan een actieve en inactieve collectorplaat, zonder aerosolvorming. Virale infectiviteit werd in essentie bepaald zoals beschreven<sup>30</sup> en de verhouding tussen virale genoomkopieaantallen en infectiviteit werd vergeleken tussen aerosolized virus, virus blootgesteld aan actieve en inactieve collectorplaten en de virale voorraden. CaCV blootgesteld aan een actieve collectorplaat, zonder te zijn verneveld, vertoonde een lichte vermindering van infectiviteit (~ 40%) in vergelijking met virussen die zijn gevangen op een

inactieve collectorplaat (tabel 2). Daarentegen was de infectiviteit van aerosol-virussen sterk verminderd met > 97%, wat aangeeft dat ionisatie van de aerosol de overgrote meerderheid van de infectiviteitsreductie veroorzaakt en niet de blootstelling aan de geladen collectorplaat.

Tabel 2 Vermindering van de infectiviteit van Canine Calicivirus (CaCV) en Rhesus Rotavirus (RRV).

From: Ionizing air affects influenza virus infectivity and prevents airborne-transmission

	Ratio of infectious virus particles to virus genes per PCR-reaction as quantified by RT-qPCR					
	Exposed to charged collector	Exposed to uncharged collector	Reduction of infectivity	Aerolized virus	Aerolized virus captured	Reduction of infectivity
CaCV	$0.74 \times 10^{-4}$	$1.24 \times 10^{-4}$	40.1%	$2.96 \times 10^{-2}$	$<7.83 \times 10^{-4a}$	>97.4% <sup>a</sup>
RRV	n.d.	n.d.	n.d.	$4.86 \times 10^{-1}$	$<7.66 \times 10^{-3a}$	>98.4% <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Under detection limit (10 peroxidase forming units/mL) on the infectivity assay.

Verdere ondersteuning dat ionisatie het mechanisme was waardoor virussen hun infectiviteit verloren, komt uit experimenten waarbij het rotavirus werd verneveld zonder ionisatie en mocht worden opgesloten op een inactieve collectorplaat. Op 30 cm van de vernevelaar bevonden zich verzamelaars. Het resultaat concludeerde dat de verhouding tussen genoomkopie en infectiviteit ongewijzigd was ten opzichte van die van de virale voorraad, wat suggereert dat inactivering van virus geassocieerd is met geïoniseerde lucht.

#### *Ioniserende lucht en elektrostatische aantrekkingskracht voorkomen door de lucht overgedragen influenza A / Panama-virusinfectie tussen cavia's*

Vervolgens hebben we geprofiteerd van een gevestigd model voor influenza-cavia's<sup>31,32,33</sup> om te onderzoeken of ioniserende lucht en elektrostatische aantrekkingskracht aerosol in de lucht en door druppeltjes overgedragen influenza A / Panama (Pan / 99) -virusinfectie tussen cavia's kunnen voorkomen. Het model voor transmissie via de lucht / druppeltjes werd in wezen tot stand gebracht zoals beschreven<sup>31</sup> met behulp van twee afzonderlijke kooien met de ionisator tussen de kooien (Fig. 3). Vier cavia's werden geïnfecteerd via intranasale route zoals beschreven met  $5 \times 10^3$  pfu van Pan / 99<sup>31</sup> en in kooi "A" geplaatst (Fig. 3). 30 uur na infectie (h p.i.) werden 4 niet-geïnfecteerde cavia's in kooi "B" geplaatst 15 cm van de kooi met geïnfecteerde dieren zoals geïllustreerd in figuur 3, zonder fysiek contact. De ionisator werd tussen kooien "A" en "B" geplaatst. Er werden twee identieke experimenten uitgevoerd, één met actieve ionisator tussen de kooien en één met een inactieve ionisator.

figuur 3





Actieve ionisator voorkomt door aerosol overgedragen influenza virus (H3N2, Pan / 99) infectie tussen cavia's. Terwijl de actieve ionisator verhinderde dat 4 van de 4 blootgestelde cavia's een immuunrespons op het influenzavirus ontwikkelden, werden 3 van de 4 dieren geïnfecteerd toen de inactieve ionisator werd gebruikt. Grafiek toont antilichaamtiter door ELISA vóór infectie (pre-serum 1, 2, 3 en 4) en op dag 21 na blootstelling aan het influenzavirus (post-serum 1, 2, 3 en 4). Kort samengevat: influenzavirus H1N1; (SBL Influenza Vaccine, Sanofi Pasteur, Lyon, Frankrijk) werden gecoat op ELISA-platen en geïncubeerd met tweevoudige verdunningen van pre- en post-cavia sera, gevolgd door gebiotinyleerd konijn-anti-cavia-antilichaam, HRP-geconjugeerd streptavidine en TMB substraat zoals beschreven in Methoden. Afgesneden (stippellijn) waarde (0,284 OD) was het gemiddelde van de negatieve controles + 2SD.

## Discussie

We beschrijven een eenvoudig ioniserend apparaat dat werkt op 12 volt dat verspreiding van via de lucht overgedragen virale infecties tussen dieren in een gecontroleerde omgeving kan voorkomen, terwijl het tegelijkertijd virus uit de lucht verzamelt voor snelle identificatie. In combinatie met gevoelige RT-qPCR-assays maakte deze bemonsteringsmethode snelle detectie en zeer gevoelige kwantificering van verschillende humaan klinisch belangrijke virussen mogelijk, zoals het influenzavirus, rotavirus en calicivirus. Het apparaat bestaat uit een kleine draagbare ionisator, waar een bemonsteringsbeker met positieve lading aan de ionisator is bevestigd die negatieve deeltjes uit de lucht aantrekt. Belangrijke voordelen van dit nieuwe ionisatieapparaat zijn de eenvoudige bediening, de hoge robuustheid en de brede toepasbaarheid op ziekteverwekkers in de lucht.

De waarneming dat significant hogere aantallen rotavirus- en CaCV-deeltjes werden gedetecteerd op de actieve ionisator in vergelijking met de inactieve ionisator (~ 1500-3000 keer), leidde tot de conclusie dat deze techniek virale deeltjes actief en efficiënt uit lucht kan verzamelen. Evenzo toonde visualisatie van latexdeeltjes door SEM aan dat latexdeeltjes van alle onderzochte groottes geconcentreerd waren op de actieve collector. Het is interessant op te merken dat een breed scala aan deeltjesgroottes, van 35 nm tot 10 µm, geconcentreerd was, wat een breed toepassingsgebied van de technologie suggereert. Te grote deeltjes kunnen het herstel echter verminderen, omdat wordt voorgesteld dat deze minder tijd in de lucht blijven<sup>33,34</sup>.

Interessant is dat we, toen we kleine hoeveelheden CaCV vernevelden (1,56 x 10<sup>4</sup> genkopieën en 1,87 x 10<sup>3</sup> genkopieën), een herstel van respectievelijk 10,6 en 21% zagen. Deze opmerkelijk verhoogde efficiëntie, met kleinere hoeveelheden virusverdeling in de lucht, kan te wijten zijn aan minder opeenhoping van virus- of viruscelafvaldeeltjes die langer in de lucht blijven en leidt dus tot een sterkere elektrostatische aantrekkingskracht door de verzamelaar. Bovendien is het waarschijnlijk dat veel deeltjes bij de wanden van de collectorplaat of op gebieden naast de collectorplaat op de ionisator terechtkomen; en worden vervolgens niet gekwantificeerd door real-time PCR; waardoor het elektrostatische effect wordt onderschat. Bij het vernevelen van hogere virusconcentraties kan dit effect dus leiden tot lagere schattingen van herstel. Met behulp van CaCV, rotavirus en influenza-virus hebben we drie onafhankelijke experimenten uitgevoerd voor elke concentratie van het aerosol-virus om de robuustheid van de assay in alle stappen te beoordelen (verzameling met actieve ionisator, RNA-extractie, cDNA-synthese en real-time PCR). Hoewel er verschillende stappen betrokken zijn, van verzameling tot detectie, vonden we dat de assay zeer robuust was, aangezien de minimale en maximale hoeveelheid virus van elke onafhankelijke meting altijd binnen een bereik van 1 log lag (figuur 2).

Inactivering van virussen door elektrostatische aantrekkingskracht is slechts kort onderzocht<sup>35</sup>. In de huidige studie verloren rotavirus en CaCV significante (> 97%) infectiviteit (ratio; CaCV van 3,0 × 10<sup>-2</sup>

tot  $<7,8 \times 10^{-4}$  en rotavirus van  $4,9 \times 10^{-1}$  tot  $<7,6 \times 10^{-3}$ ) in geïoniseerde lucht zoals bepaald door een verhouding van infectiviteit versus genkopieën. Het mechanisme van inactivering werd in dit onderzoek niet expliciet onderzocht, maar inactivatiemechanismen kunnen reactieve soorten en / of verhoogde eiwitladingsniveaus omvatten, die het virus zouden kunnen inactiveren zoals eerder beschreven<sup>36,37</sup>. Voorgesteld is dat de verminderde infectiviteit te wijten is aan reactieve zuurstofsoorten en ozon, door peroxidatiereacties van lipiden en eiwitten die schade en vernietiging van de virale lipidenomhulling en eiwitcapside kunnen veroorzaken<sup>36</sup>. In het bijzonder kan eiwitperoxidatie een sleutelrol spelen bij de inactivering van niet-omhulde virussen, zoals adenovirus, poliovirus en andere enterovirussen zoals rota- en calicivirussen. Omhulde virussen zouden de infectiviteit verliezen als gevolg van lipideperoxidatie. De cytotoxiciteit van ozon vormt echter een groot obstakel voor de klinische toepassing van ozon. Het is aangetoond dat het verhogen van de ionenconcentratie in de lucht kippen op efficiënte wijze beschermt tegen via de lucht geboren overdracht van dodelijke infectie met het virus van de ziekte van Newcastle<sup>23</sup>. Het exacte mechanisme van de inactivering van virussen door negatieve ionen is niet aangetoond en moet verder worden onderzocht. In een onderzoek waarbij negatieve en positieve ionen werden gegenereerd, werd het influenzavirus echter geïnactiveerd, hoewel het ozonniveau te verwaarlozen was (0,005 ppm of minder)<sup>37</sup>.

Ons apparaat heeft een constante ozonconcentratie onder de detectielimiet (0,002 ppm) afgegeven, zoals getest door VTT (Technical Research Center of Finland, Tampere, Finland) en door Air Resources Board in de VS, dus ozon kan in dit geval geen bijdrage leveren van virale inactivering. Er kunnen echter reactieve radicalen zoals  $\bullet O_2$ - worden gegenereerd, die kunnen bijdragen tot inactivering door schade aan het eiwit of de nucleïnezuurstructuur van de virussen<sup>37</sup>. Aangezien de infectiviteit niet verloren ging toen het virus zonder ionisatie in de lucht van de kamer werd verneveld en slechts licht verminderde wanneer het rechtstreeks op de positief geladen collectorplaat werd aangebracht, wordt gesuggereerd dat de meeste vermindering van infectiviteit het gevolg kan zijn van verhoogde negatief geladen niveaus, waarschijnlijk resulterend in veranderingen in iso-elektrisch punt en dus structurele veranderingen van de capsid. Aangezien de twee onderzochte virussen niet omhuld zijn, kan lipidenmodificatie worden uitgesloten.

Het meest interessante en van grote klinische betekenis van deze studie was de nieuwe bevinding dat het ioniserende apparaat een infectie met het influenzavirus kon detecteren en voorkomen in een gecontroleerde omgeving, waarbij 'authentieke' omstandigheden werden nagebootst. Ons intranasale infectieprotocol was in wezen zoals eerder beschreven<sup>31,33</sup> met Harley cavia's en  $5 \times 10^3$  plaquevormende eenheden (pfu) van het Pan / 99-influenzavirus. Aangezien cavia's van de Hartley-stam zeer vatbaar zijn voor humane influenza A-virusstam Pan / 99 (H3N2), met een infectieuze dosis (ID50) van 5 pfu<sup>31</sup>, maakt dit de virale stam het meest geschikt voor deze onderzoeken. Bovendien hebben Lowen en zijn collega's aangetoond dat Pan / 99 voor 100% door aerosol wordt overgebracht naar cavia's<sup>38,39</sup>. Eerdere studies hebben ook aangetoond dat de gebruikte infectieuze dosis rond dag 3 p.i. resulteert in een piek in virale groei. in zowel de longen als de neusgangen in dit diermodel<sup>31</sup>, een tijdstip waarop naïeve dieren in ons onderzoek werden blootgesteld aan lucht van de geïnfecteerde dieren.

Door de ontwikkeling van de immuunrespons te beoordelen, ontdekten we dat 3 van de 4 niet-geïnfecteerde cavia's geïnfecteerd raakten na blootstelling aan dieren die waren geïnoculeerd met  $5 \times 10^3$  pfu Pan / 99. Deze gevoeligheidscijfers zijn vergelijkbaar met die van Mubareka en collega's<sup>33</sup> die ontdekten dat 2 van de 3 cavia's besmet raakten na een aerosoltransmissie over korte afstand met een dosis van 103 pfu, terwijl 3 van de 3 dieren besmet raakten met een infectieuze dosis van 106 pfu. We onderzochten de immuunrespons op 21 dagen p.i., een tijdstip waarop Lowen en



collega's<sup>40</sup> eerder hadden vastgesteld dat van nature Pan / 99-geïnfecteerde cavia's een significante immuunrespons hadden ontwikkeld.

De wijze van overdracht van het influenzavirus omvat direct contact met individuen, blootstelling aan met virus besmette voorwerpen (fomites) en inademing van besmettelijke aerosolen. Eerdere studies met het cavia-diermodel hebben aangetoond dat aerosol en niet fomites de belangrijkste route is van Pan / 99-overdracht tussen cavia's<sup>33</sup>. Aërosol vrijgemaakt virus van geïnoculeerde dieren kon worden gedetecteerd op de actieve verzamelplaat door RT-qPCR, zij het met zeer lage genkopie aantallen. Lowen et al.<sup>38</sup> gebruikten de cavia als gastheermodel en toonden aan dat de verspreiding van aërosolen van het influenzavirus tussen dieren afhankelijk is van zowel de relatieve vochtigheid als de temperatuur. Ze ontdekten dat een lage relatieve vochtigheid van 20–30% en een temperatuur van 5 ° C het gunstigst was, zonder dat bij 30 ° C transmissie werd waargenomen. In ons installatiesysteem lag de temperatuur tussen 20 en 21 ° C en de relatieve vochtigheid tussen 35 en 36,2%.

Het beschreven ionisatie-apparaat in combinatie met RT-qPCR-assays heeft een duidelijk diagnostisch potentieel. De eenvoudige bediening, lage kosten, vrij van ozonproductie, robuustheid, hoge efficiëntie en laagspanning (12 volt) werking maken grootschalig gebruik mogelijk. Locaties die cruciaal zijn voor besmettelijke verspreiding, zoals vliegtuigen, ziekenhuizen, kinderdagverblijven, schoolomgevingen en andere openbare plaatsen, zouden dus kunnen worden bewaakt en gecontroleerd door de verzameling en analyse van in de lucht aanwezige virussen en andere pathogenen op de verzamelplaat. Het apparaat vertoont ook potentieel voor transmissiepreventie, hoewel de potentie verder moet worden onderzocht in de praktijk. We concluderen dat deze innovatieve technologie een groot potentieel heeft om virussen in de omgevingslucht te verzamelen en te identificeren.

## Methoden

### *Studieontwerp*

De experimenteerruimte heeft geaarde metalen wanden, met een inhoud van 19 m<sup>3</sup> (B250 \* L330 \* H235cm). Eén actief en één inactief ionisatieapparaat, ontworpen voor het verzamelen en analyseren van deeltjes in de lucht, werd in de kamer geplaatst op gelijke afstand (215 cm) van de vernevelaar (Aiolos Albatross, Aiolos, Zweden), met een afstand van 64 cm tussen de ionisatoren. Voor en tijdens het experiment werd een deeltjesteller (PortaCount Plus, TSI Incorporated, VS) gebruikt. Vóór het begin van aërosol experimenten werd de kamer door de actieve ionisator op deeltjes geleegd en werd de collectorplaat weggegooid voordat de experimenten begonnen en vervangen door een nieuwe collectorplaat. De experimenten werden voortgezet totdat de deeltjestellingen weer op basaal niveau waren, gewoonlijk binnen 40 minuten bereikt. Vochtigheids- en temperaturomstandigheden werden aanvankelijk gemeten bij elke aërosol experimenten.

### Ionisatietechnologie en apparaat

Het in dit onderzoek gebruikte ionisatieapparaat is ontwikkeld op basis van de ionenstroom-ionisatietechnologie van LightAir AB, Solna, Zweden ([www.lightair.com](http://www.lightair.com)) en is voor dit werk aangepast door de afdeling Microbiologie, Karolinska Institute, Stockholm, Zweden. Het apparaat (afmeting 13 × 35 cm) werd gemodificeerd door het installeren van een plastic beker met een geleidend oppervlak van 47 mm in diameter (GP plastindustri, Gislaved, Zweden) als verzamelplaat (Fig. 1). De collectorplaat heeft om veiligheidsredenen een zeer lage stroom, minder dan 80 µA, maar de ionisator versnelt een extreem hoge spanning van meer dan 200.000 eV. De ionisator creëert elektronen, die oppervlaktemoleculen van deeltjes in de lucht negatief geladen maken, waardoor ze

worden aangetrokken door de positief geladen collectorplaat. Dit apparaat genereert ongeveer 35 000 miljard elektronen per seconde ([www.lightair.com](http://www.lightair.com)) met een constante ozonconcentratie onder de detectielimiet (0,002 ppm) zoals getest door VTT Technical Research Center of Finland, Tampere, Finland. Het is ook getest op ozon en gecertificeerd door ARB (Air Resources Board) in de Verenigde Staten. Na het einde van de bemonsteringsperiode werd de ionisator uitgeschakeld en de verzamelplaat werd bedekt met een deksel en tot analyse bij -20 ° C bewaard. Op de collectorplaten gevangen virussen werden geanalyseerd met een RT-qPCR op rotavirus, CaCV en influenzavirus en de resultaten van de actieve en inactieve ionisatoren werden vergeleken. Scan- en transmissie-elektronenmicroscopie werd gebruikt voor het visualiseren van verzamelde virussen en latexdeeltjes.

#### *Aërosolexperimenten van virus- en latexdeeltjes*

Verschillende hoeveelheden rhesus rotavirus (genotype G3P [3]), influenzavirus (stam H1N1, Salomon Island, geïnactiveerd) en CaCV-stam 48 (geslacht Vesivirus) werden verdund in water tot een eindvolume van 5 ml. In aërosolexperimenten voor scanning-elektronenmicroscopie en infectiviteitsanalyse werd het virus verdund in Eagles MEM. Virussuspensies in verschillende concentraties werden als aerosolen in de kamer verdeeld door middel van een vernevelaar. Elk experiment werd uitgevoerd in drievoud en het verzamelen van aerosolized virus- en latexdeeltjes werd gedurende 40 minuten uitgevoerd.

#### *Transmissie-elektronenmicroscopie (TEM)*

Met koolstof / Formvar beklede kopernetwerken van 400 mesh werden op de collector geplaatst tijdens aërosolexperimenten met influenza- en rotavirus. Roosters werden vervolgens gerehydrateerd in Eagles MEM met 1% runderserumalbumine (BSA) voordat ze negatief werden gekleurd met 2% fosfotungstic zuur en geanalyseerd door TEM. Per monster werden tien rastervierkanten geanalyseerd en het aantal virusdeeltjes per oppervlakte-eenheid werd berekend.

#### *Scanning elektronenmicroscopie (SEM)*

Verzamelde monsters werden toegevoegd aan het oppervlak van een polycarbonaat 0,6 urn filter (Nucleopore, Inc) dat op een luchtdicht apparaat werd gemonteerd (GP Plastindustri AB, Gislaved, Zweden). Het filter werd gedroogd bij kamertemperatuur, gecoat met een 40 Å dikke laag geïnioniseerd goud en geanalyseerd door SEM (Philips High Resolution SEM 515). De methode is eerder gebruikt en gerapporteerd in onderzoeken naar cytomegalovirus en hersenvocht41,42,43.

#### *Extractie van viraal RNA uit collectorplaten*

De aangehechte virale deeltjes op de collectorplaten werden gelyseerd met 1 ml virale lysisbuffer (buffer AVL, QIAamp virale RNA-minikit) die rechtstreeks in de collectorplaat werd toegevoegd en ging onmiddellijk verder met extractie van viraal RNA met behulp van QIAamp Viral RNA-minikit (Cat. nr: 52906 Qiagen, Hilden, Duitsland) volgens de instructies van de fabrikant. Elk monster werd geëluëerd met 60 µL RNase-vrij water dat 0,04% natriumazide bevat (AVE-buffer; Qiagen, Hilden, Duitsland).

#### *Omgekeerde transcriptie van geëxtraheerd viraal RNA*

28 µL van het geëxtraheerde virale RNA werd gemengd met 50 pmol Pd (N) 6 willekeurige hexameerprimer (GE-Healthcare, Uppsala, Zweden) en snel gekoeld op ijs gedurende 2 minuten, gevolgd door de toevoeging van één Illustra Ready-To-Go omgekeerde transcriptase PCR (RT-PCR) kraal (GE-Healthcare, Uppsala, Zweden) en RNase-vrij water tot een eindvolume van 50 µL. Voor rotavirus werd een aanvankelijke denaturatiestap bij 97 ° C gedurende 5 minuten uitgevoerd om het

dsRNA te denatureren. De reactie van reverse transcriptie (RT) werd gedurende 40 minuten bij 42 ° C uitgevoerd om het cDNA te produceren dat later werd gebruikt voor real-time PCR.

#### *Kwantitatieve realtime PCR voor rotavirus*

Rhesus rotavirus werd gedetecteerd en gekwantificeerd met behulp van een LUX real-time PCR-assay zoals eerder beschreven<sup>7</sup>. Deze real-time PCR gebruikt gelabelde primers met verschillende fluoroforen voor elke VP6-subgroep en externe plasmidstandaarden voor semi-kwantificering<sup>44</sup>.

#### *Kwantitatieve real-time PCR voor CaCV*

CaCV werd gedetecteerd en gekwantificeerd met behulp van een SYBR-groene assay op een ABI-prisma 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) met primers; (eindconcentratie 200 nM) CaCV-3 (5'-ACCAACGGAGGATTGCCATC-3' (nucleotiden 393 tot 410 volgens GenBank-inschrijvingsnummer AF053720) en CaCV-4 (5'-TAGCCGATCCCACAAGAAGACA-3' (nucleotiden 452 tot 474), specifiek voor CaCV-stam 48. De reactie werd uitgevoerd met 2 µL cDNA in 10 µL 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en water tot een eindvolume van 20 µL. Het volgende cyclusprogramma werd gebruikt: 95 ° C gedurende 10 minuten gevolgd door 45 cycli van 95 ° C gedurende 15 seconden en 60 ° C gedurende 1 minuut. De analyse van de smeltcurve werd onmiddellijk na voltooiing van de PCR uitgevoerd door 15 seconden op 95 ° C te verwarmen, gevolgd door 1 minuut afkoelen tot 60 ° C en vervolgens verwarmen tot 95 ° C bij 0,8 ° C min<sup>-1</sup> met continue fluorescentie-opname. De smeltemperatures werden bepaald op alle monsters met behulp van de Sequence Detection Software versie 1.3.1 (Applied Biosystems) en gevisualiseerd door de negatieve derivaten uit te zetten tegen temperatuur.

#### *Bemonstering voor infectiviteitsonderzoeken met rotavirus en CaCV*

Om te bepalen of de ionisatietechnologie enige invloed heeft op de virusinfectiviteit, werden resus rotavirus en CaCV aerosol gemaakt en verzameld op actieve ionisatorcollectorplaten, bedekt met 1 ml Eagles MEM. Rotavirus (1 x 10<sup>6</sup> peroxidase-vormende eenheden) en CaCV (1 x 10<sup>6</sup> peroxidase-vormende eenheden) werden verneveld, elk in een totaal volume van 5 ml en verzameld gedurende 40 minuten, gevolgd door bepaling van virale infectiviteit en aantal genoomkopieën.

Om te bepalen of de elektrostatische aantrekking van de verzamelplaat de virale besmettelijkheid beïnvloedde, werden rotavirus (2 x 10<sup>5</sup> peroxidase vormende eenheden) en CaCV (2 x 10<sup>5</sup> peroxidase vormende eenheden) in 1 ml Eagles MEM gedurende 40 minuten toegevoegd aan inactieve en actieve collectorplaten. De platen werden vervolgens bewaard bij -20 ° C totdat de virale infectiviteit en het aantal genoomkopieën waren bepaald.

#### *Bepaling van rotavirus en CaCV-infectiviteit*

Rotavirusvoorraad en monsters werden 1:10 verdund in Eagles MEM en vervolgens verdund in tweevoudige verdunningen. Bepaling van virale infectiviteit werd uitgevoerd zoals eerder beschreven op confluente niercellen van groene aap (MA104) in platen met 96 putjes<sup>30</sup>. CaCV-infectiviteit werd in wezen bepaald zoals voor rotavirus met de modificatie dat monsters werden toegevoegd aan confluente Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) -cellen in platen met 48 putjes en de infectiviteit bepaald zoals eerder beschreven<sup>45</sup> en bevestigd door RT-qPCR. Om de afname van infectiviteit te bepalen, werd de verhouding tussen het aantal kopieën van het virale genoom en de infectiviteit vergeleken tussen het aerosol virus, het virus dat werd blootgesteld aan actieve en inactieve collectorplaten en de virale voorraad.

## *Dieren*

Cavia's, stam Hartley, vrouwtje, 300-350 g, werden gehuisvest in Astrid Fagraeus Laboratory, Karolinska Institute, volgens goedgekeurde richtlijnen van de Raad van Landbouw en het Verdrag van de Raad van Europa inzake gewervelde dieren die voor wetenschappelijke doeleinden worden gebruikt. Het experimentele protocol is goedgekeurd door de Animal Ethics Committee in Stockholm (vergunningnummer: N177 / 11).

### *Overdracht van het influenzavirus in de lucht*

We gebruiken een proefdiermodel voor cavia's om te onderzoeken of de ionisatietechniek de overdracht van een influenzavirusinfectie zou kunnen voorkomen, aangezien dit model met succes is gebruikt als model voor aërosoltransmissiestudies van het influenzavirus<sup>31,33</sup>. Humaan influenza A-virus, stam Pan / 99 (vriendelijk verstrekt door Peter Palese, New York, VS), werd gebruikt omdat is aangetoond dat deze stam effectief repliceert in de bovenste luchtwegen van de luchtwegen en effectief wordt overgedragen door aërosolen, maar niet door fomites bij cavia's. Vrouwelijke cavia's, 300–350 g, stam Hartley, werden gehuisvest in Astrid Fagraeus Laboratorium, Solna, Stockholm (Ethische toestemming N177 / 11). Vier dieren werden verdoofd door een intraperitoneale injectie van ketamine (Ketalar el Ketaminol) 50 mg / kg en xylazin (Rompun) 5 mg / kg en intranasaal geïnfecteerd met  $5 \times 10^3$  pfu Pan / 99-virus in 100  $\mu$ L (50  $\mu$ L in elk neusgat). Alle vier geïnfecteerde dieren werden in de experimentele kooi geplaatst (Fig. 3, kooi "A"). Om 30 uur p.i. werden vier naïeve niet-geïnfecteerde cavia's naast de transmissiekooi (Fig. 3, kooi "B") geplaatst op een afstand van 15 cm. Lucht stroomde vrij tussen kooien, maar direct contact tussen geïnoculeerde en blootgestelde dieren was verboden.

De vier naïeve cavia's werden 24 uur blootgesteld en vervolgens in afzonderlijk individueel geventileerde kooien geplaatst, om ervoor te zorgen dat er geen aërosoloverdracht tussen de dieren plaatsvond. Er werden twee identieke experimenten uitgevoerd, met een actieve en inactieve ionisator. De nasaal geïnfecteerde dieren werden verwijderd na de blootstellingsduur en long- en luchtpijpbiopsieën werden verzameld (54 uur p.i.) en onderzocht op influenzavirus door RT-qPCR. 21 dagen na blootstelling werd serum verzameld van de niet-geïnfecteerde blootgestelde cavia's en de prevalentie van antilichamen tegen influenza A-virus werd bepaald door ELISA. Sera die vóór blootstelling aan de geïnfecteerde cavia's (pre-sera) en 21 dagen na blootstelling (post-sera) werden genomen, werden van elk dier geanalyseerd.

### *ELISA-detectie van influenza A-antilichamen*

Kortom, 96-wells-platen (Nunc, 96 F MAXISORP, Roskilde, Denemarken) waar gecoat met formaline-geïnactiveerd influenza A-virus H1N1 (SBL Influenza Vaccine, Sanoil Pasteur, Lyon, Frankrijk) verdund in coatingbuffer (0,05 M natriumcarbonaatbuffer, pH 9,5-9,7) bij 5  $\mu$ g / ml en overnacht geïncubeerd bij +4 ° C. Putjes werden x3 (0,9% NaCl en 0,05% Tween-20) gewassen en 1 uur bij 37 ° C geblokkeerd met 3% BSA in PBS-buffer. Serummonsters werden 1: 100 verdund en verder in tweevoudige verdunningen in verdunningsbuffer (PBS met 0,5% BSA en 0,05% Tween-20) en 90 minuten bij 37 ° C geïncubeerd. De platen werden vervolgens x5 gewassen en 60 minuten bij 37 ° C geïncubeerd met secundair gebiotinyleerd geiten-anti-cavia-antilichaam (Vector, BA-7000) en mierikswortelperoxidase (HRP) geconjugeerd Streptavidin (DAKO, Denemarken, P0397), beide bij een verdunning van 1: 3000. Platen werden vervolgens x5 gewassen en 100  $\mu$ L tetramethylbenzidine (TMB) -substraat (Sigma Aldrich, T-0440-16) werd aan elk putje toegevoegd, de reactie ontwikkelde zich gedurende 10 minuten en stopte door toevoeging van 100  $\mu$ L 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. De absorptie werd gemeten bij 450 nm in een ELISA-lezer (VersaMax, Molecular Devices). Afkapwaarden werden berekend als de gemiddelde waarde van negatieve controles OD en 2 keer de SD.

### *Extractie van influenza-RNA uit guinea-varkensweefsel*

RNA werd geëxtraheerd uit de luchtpijp en het longweefsel van een geïnfecteerde cavia. Kort samengevat werd 100-250 mg weefsel gehomogeniseerd met een weefselhomogenisator en totaal RNA geëxtraheerd met RNeasy Midi Kit (Qiagen) volgens de instructies van de fabrikant.

### *Kwantitatieve realtime PCR voor influenzavirus*

Om influenza A-virus op de collectorplaten en in cavia-weefselmonsters te detecteren en te kwantificeren, gebruikten we een One-Step Taq Man real-time RT-PCR-test<sup>46</sup> met primers F1-mxA (150 nM) (5'-AAGACCAATYCTGTCACCTCTGA-3'), F3-mxA (150 nM) (5'-CAAGACCAATCTTGTACCTCTGAC-3') en R1-mxA (900 nM) (5'-TCCTCGCTCACTGGGCA-3') en sondes P1-Mx (110 nM) (5'-FAM-TTGTGTTACAGCTCACC-MGB-3') en P2-Mx (110 nM) (5'-FAM-TTTGTATTACAGCTCACCG-MGB-3'), met de Rotor-Gene Probe RT-PCR-kit (Qiagen). De real-time PCR-reactie werd uitgevoerd in een Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen) met het volgende cyclische protocol: 10 minuten bij 50 ° C, gevolgd door 45 cycli van 95 ° C gedurende 5 seconden en 57 ° C gedurende 15 seconden.

### **Extra informatie**

Citatie voor dit artikel: Hagbom, M. et al. Ioniserende lucht beïnvloedt de besmettelijkheid van het influenzavirus en voorkomt overdracht via de lucht. *Sci. Rep.* 5, 11431; doi: 10.1038 / srep11431 (2015).

### *Referenties*

---

Lipsitch, M. et al. Transmissiedynamiek en controle van ernstig acuut ademhalingsyndroom. *Science* 300, 1966–1970, (2003).

---

Tellier, R. Aërosoloverdracht van influenza A-virus: een overzicht van nieuwe onderzoeken. *J R Soc Interface* 6 Suppl 6, S783 – S790, (2009).

---

Stilianakis, N. I. & Drossinos, Y. Dynamica van overdracht van infectieziekten door inhaleerbare luchtwegdruppels. *J R Soc Interface* 7, 1355–1366, (2010).

---

Teunis, P.F., Brienen, N. & Kretzschmar, M. E. Hoge infectiviteit en pathogeniteit van influenza A-virus via aerosol en druppeloverdracht. *Epidemics* 2, 215–222, (2010).

---

Fowler, R.A., Scales, D.C. & Iwan, R. Bewijs van overdracht vanuit de lucht van SARS. *N Engl J Med* 351, 609–611; antwoord van de auteur 609-611, (2004).

---

Fiegel, J., Clarke, R. & Edwards, D. A. Infectieziekten in de lucht en de onderdrukking van pulmonale bioaerosolen. *Drug Discov Today* 11, 51–57, (2006).

---

Nordgren, J., Bucardo, F., Svensson, L. & Lindgren, P. E. Nieuwe licht-op-verlenging real-time PCR-assay voor gelijktijdige detectie, kwantificering en genogroepering van groep A rotavirus. *J Clin Microbiol* 48, 1859–1865, (2010).

---

Nordgren, J., Bucardo, F., Dienus, O., Svensson, L. & Lindgren, P.E. Nieuwe realtime PCR-tests op licht voor verlenging voor detectie en kwantificering van genogroep I en II norovirussen in klinische monsters. *J Clin Microbiol* 46, 164–170, (2008).

---

Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. Real-time PCR in virologie. *Nucleic Acids Res* 30, 1292–1305, (2002).

---

---

Booth, T. F. et al. Detectie van coronavirus in de lucht, ernstig acuut respiratoir syndroom (SARS) en milieuverontreiniging in SARS-uitbraakeenheden. *J Infect Dis* 191, 1472–1477, (2005).

---

Hermann, J. R. et al. Optimalisatie van een bemonsteringssysteem voor herstel en detectie van in de lucht verspreid voortplantings- en ademhalingsyndroomvirus en varkensgriepvirus. *Appl Environ Microbiol* 72, 4811-4818, (2006).

---

Pyankov, O. V. et al. Gebruik van een bioaerosol persoonlijke monsternemer in combinatie met real-time PCR-analyse voor snelle detectie van virussen in de lucht. *Environ Microbiol* 9, 992–1000, (2007).

---

Verreault, D., Moineau, S. & Duchaine, C. Methoden voor bemonstering van virussen in de lucht. *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 413–444, (2008).

---

Turgeon, N., Toulouse, M. J., Martel, B., Moineau, S. & Duchaine, C. Vergelijking van vijf bacteriofagen als modellen voor virale aerosolstudies. *Appl Environ Microbiol* 80, 4242–4250, (2014).

---

Verani, M., Bigazzi, R. & Carducci, A. Virale besmetting van aerosol en oppervlakken door toiletgebruik in de gezondheidszorg en andere instellingen. *Amerikaans tijdschrift voor infectiebeheersing* 42, 758–762, (2014).

---

Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z., Lemieux, C. & Gardam, M. Overdracht van influenza A bij mensen. *Lancet Infect Dis* 7, 257–265, (2007).

---

Sato, T. [Infectiebeheersing in ziekenhuizen]. *Masui* 59, 56-63, (2010).

---

Hans, C. Infectiebeheersingspraktijken voor vogelgriep in zorginstellingen. *J Indian Med Assoc* 104, 388, 390, 392 passim, (2006).

---

Hatagishi, E. et al. Opzetten en klinische toepassingen van een draagbaar systeem voor het opvangen van door hoesten vrijgekomen griepvirussen. *PloS one* 9, e103560, (2014).

---

Bergeron, V. et al. Aanvullende behandeling van lucht in in de lucht verspreide isolatiekamers met luchtverversingsinstallaties met hoge doorvoer in de kamer. *Amerikaans tijdschrift voor infectiebeheersing* 39, 314–320, (2011).

---

Hudson, J. B., Sharma, M. & Petric, M. Inactivering van Norovirus door ozongas in omstandigheden die relevant zijn voor de gezondheidszorg. *The Journal of hospital infectie* 66, 40-45, (2007).

---

Mitchell, B. W. & King, D. J. Effect van negatieve luchtionisatie op de overdracht van het virus van de ziekte van Newcastle. *Vogelziekten* 38, 725-732, (1994).

---

Estola, T., Makela, P. & Hovi, T. Het effect van luchtionisatie op de overdracht via de lucht van experimentele virusinfecties door de ziekte van Newcastle bij kippen. *The Journal of hygiene* 83, 59–67, (1979).

---

Escombe, A. R. et al. Ultraviolet licht in de bovenkamer en negatieve luchtionisatie om overdracht van tuberculose te voorkomen. *PLoS medicine* 6, e43, (2009).

---

Gast, R. K., Mitchell, B. W. & Holt, P. S. Toepassing van negatieve luchtionisatie voor het verminderen van experimentele overdracht via de lucht van Salmonella enteritidis op kuikens. *Poultry science* 78, 57-61, (1999).



---

Parvaneh, S. et al. Een nieuwe methode voor het verzamelen van allergenen in de lucht. *Allergy* 55, 1148-1154, (2000).

---

Mochizuki, M. et al. Een calicivirus geïsoleerd van een hond met dodelijke diarree. *Vet Rec* 132, 221-222, (1993).

---

Lee, B. Y. et al. Economische waarde van maatregelen ter beheersing van de uitbraak van norovirus in zorgomgevingen. *Klinische microbiologie en infectie: de officiële publicatie van de European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 17, 640-646, (2011).

---

Vesikari, T., Rautanen, T., Varis, T., Beards, G. M. & Kapikian, A. Z. Rhesus Rotavirus kandidaat-vaccin. Klinische proef bij kinderen die tussen 2 en 5 maanden oud zijn gevaccineerd. *Ben J Dis Child* 144, 285-289, (1990).

---

Istrate, C. et al. Beenmergdendritische cellen internaliseren levend RF-81 runderrotavirus en rotavirusachtige deeltjes (RF 2/6-GFP-VLP en RF 8 \* 2/6/7-VLP) maar worden alleen geactiveerd door levend runderrotavirus. *Scand J Immunol* 65, 494-502, (2007).

---

Lowen, A. C., Mubareka, S., Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. De cavia als transmissiemodel voor humane griepvirussen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9988-9992, (2006).

---

Pica, N., Chou, Y. Y., Bouvier, N. M. & Palese, P. Overdracht van influenza B-virussen bij de cavia. *J Virol* 86, 4279-4287, (2012).

---

Mubareka, S. et al. Overdracht van het influenzavirus via aerosolen en fomites in het cavia-model. *J Infect Dis* 199, 858-865, (2009).

---

Galton, J., Tovey, E., McLaws, M. L. & Rawlinson, W. D. De rol van deeltjesgrootte bij de overdracht van pathogenen in aerosolen: een overzicht. *J Infect* 62, 1-13, (2011).

---

Kettleleson, E. M. et al. In de lucht gevangen en geïnactiverd door een elektrostatische deeltjesverzamelaar. *Environ Sci Technol* 43, 5940-5946, (2009).

---

Murray, B. K. et al. Verstoring van virussen door ozon-gemedieerde reactieve zuurstofsoorten. *Journal of virologische methoden* 153, 74-77, (2008).

---

Nishikawa, K. & Nojima, H. Airborn-virusinactivatietechnologie met behulp van clusterionen gegenereerd door ontladingsplasma. *Sharp Tech J* 86, 10-15, (2003).

---

Lowen, A.C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. Influenza-virusoverdracht is afhankelijk van relatieve vochtigheid en temperatuur. *PLoS Pathog* 3, 1470-1476, (2007).

---

Lowen, A.C., Steel, J., Mubareka, S. & Palese, P. Hoge temperatuur (30 ° C) blokkeert aerosol maar geen contactoverdracht van influenzavirus. *J Virol* 82, 5650-5652, (2008).

---

Lowen, A. C. et al. Blokkering van overdracht van het influenzavirus door de gastheer door vaccinatie in het cavia-model. *J Virol* 83, 2803-2818, (2009).

---

Andersson, J. et al. Snelle detectie van cytomegalovirus met behulp van immuuscannende elektronenmicroscopie. *Journal of virological methods* 16, 253-262, (1987).

---

Wetterberg, L. et al. Micrometer-deeltjes in cerebrospinale vloeistof (CSF) bij patiënten met schizofrenie. *Neurosci Lett* 329, 91-95, (2002).

---

Johansson, V. et al. Microscopische deeltjes in twee fracties verse hersenvocht bij tweelingen met schizofrenie of bipolaire stoornis en bij gezonde controles. *PLoS one* 7, e45994, (2012).

---

Nordgren, J., Kindberg, E., Lindgren, P. E., Matussek, A. & Svensson, L. Norovirus gastro-enteritis-uitbraak met een secretor-onafhankelijk gevoeligheidspatroon, Zweden. *Opkomende infectieziekten* 16, 81–87, (2010).

---

San Gabriel, M. C. et al. Identificatie van capsid-eiwit van hondencalicivirus en de immunoreactiviteit ervan bij western blotting. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 59, 97–101, (1997).

---

Nilsson, A. C. et al. Longitudinale klaring van seizoensgebonden influenza A viraal RNA gemeten door middel van real-time polymerase kettingreactie bij patiënten die werden geïdentificeerd op de afdeling spoedeisende hulp van een ziekenhuis. *Scandinavisch tijdschrift over infectieziekten* 42, 679–686, (2010).

## **Dankwoord**

We erkennen Dr. Peter Palese voor het leveren van influenzavirusstam Pan / 99 en antisera voor deze studie. Dit werk werd ondersteund door de Zweedse Onderzoeksraad (LS) 320301.

## **Auteurs informatie**

Hagbom Marie en Nordgren Johan hebben in gelijke mate bijgedragen aan dit werk.

## **Samenwerkingen**

**Afdeling Moleculaire Virologie, Afdeling Klinische en Experimentele Geneeskunde, Universiteit van Linköping, Linköping, 581 85, Zweden**

Marie Hagbom, Johan Nordgren & Lennart Svensson

**Afdeling Microbiologie, Karolinska Institute, Stockholm, Zweden**

Rolf Nybom & Hans Wigzell

**Afdeling Diagnostiek en Vaccin, Zweeds Instituut voor overdraagbare ziektebestrijding, Stockholm, Zweden**

Kjell-Olof Hedlund

## ***Bijdragen***

L.S., H.W., R.N., M.H. en J.N. ontwierp de experimenten, R.N. ontwikkelde het ionisatieapparaat, bereidde de opstelling van de experimentele kamer voor en voerde de scanning-elektronenmicroscopie uit, L.S., M.H., J.N. en R.N. voerden de experimenten uit, K.O.H. de transmissie-elektronenmicroscopie, M.H. en J.N. voerde de laboratoriumanalyse uit, L.S. en H.W. interpreteerde de gegevens, L.S., H.W., M.H. en J.N. schreef het manuscript.

## **Ethische verklaringen**

Tegenstrijdige belangen

De auteurs verklaren geen concurrerende financiële belangen.

## **Rechten en toestemmingen**

Dit werk is in licentie gegeven onder een Creative Commons Attribution 4.0 International License. De afbeeldingen of ander materiaal van derden in dit artikel zijn inbegrepen in de Creative Commons-licentie van het artikel, tenzij anders aangegeven in de kredietlimiet; als het materiaal niet onder de Creative Commons-licentie valt, hebben gebruikers toestemming van de licentiehouder nodig om het materiaal te reproduceren. Ga naar <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> om een kopie van deze licentie te bekijken