

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Ioniserende lucht beïnvloedt Influenzavirus en voorkomt transmissie door lucht.

Marie Hagbom^{1,*}, Johan Nordgren^{1,*}, Rolf Nybom², Kjell-Olof Hedlund³, Hans Wigzell² & Lennart Svensson¹

ontvangen: 27 November
2014
13 May 2015 geaccepteerd
gepubliceerd: 23 Juni 2015

Wij beschrijven met behulp van een gemodificeerd ionisatie apparaat, de effectieve preventie van transmissie van het influenza virus A (strain Panama 99) tussen dieren en de inactivatie van het lucht gedragen virus (>97%). Actieve ionisatie voorkwam de infectie in cavia's 100% (4/4). Bovendien ving het apparaat op effectieve wijze lucht gedragen calcivirus, Rota virus en influenzavirus, met een terugwinning van 21% na 40 minuten in een kamer van 19 m³. Het ioniseer apparaat genereert negatief gelade ionen die lucht gedragen deeltjes negatief laden en ze vervolgens aantrekken naar een positief geladen plaat. Gevangen virussen kunnen dan door reverse transcriptie geïdentificeerd worden in realtime kwantitatieve PCR. Het apparaat opert unieke mogelijkheden voor snelle en simpele verwijdering van virussen in lucht en biedt de mogelijkheid om ze tegelijkertijd te identificeren en de transmissie van virussen door de lucht te verhinderen.

Er is een urgente behoefte aan simpele, hanteerbare en gevoelige apparatuur om virussen uit de lucht te verzamelen, identificeren en verwijderen, om snel uitbraken van infectieuze ziektes vroegtijdig te detecteren en te verhinderen. Elk jaar zijn infectieuze ziektes verantwoordelijk voor miljoenen sterfgevallen over de hele wereld en veel van de meest voorkomende pathogenen worden verspreid door druppels of aerosol afkomstig van niesen, hoesten of overgeven²⁻⁵. Kennis van aerosol en transmissie mechanismen zijn gelimiteerd voor de meeste pathogenen. Terwijl verspreiding door lucht een belangrijke transmissieroute is voor veel pathogenen inclusief virussen⁶.

Tot op heden bestaat er geen simpele, geverifieerde technologie die virussen uit de lucht kan vangen en identificeren. Het probleem is niet de analyseer methode, omdat biologische moleculaire technieken zoals realtime PCR een nauwkeurige detectie van meeste pathogenen kan verzorgen⁷⁻⁹. De moeilijkheid zit hem in het ontwikkelen van een effectieve sampling methode die snel lucht gedragen deeltjes, waaronder virussen, uit grote volumes lucht kunnen verzamelen. Hierbij komt dat de verzamel methode ook nog eens robuust en makkelijk handelbaar moet zijn om een wijde distributie en toepassing in verschillende omgevingen mogelijk te maken. Op dit moment zijn de meest gebruikte technieken gericht op het verzamelen van pathogenen uit de lucht, gebaseerd op (lucht)doorstroom en vloeistof modellen. Deze systemen zijn complex en hun efficiëntie is niet grondig geëvalueerd. De verspreiding van infectieziekten in ziekenhuizen kan hoogst significant zijn¹⁶⁻¹⁸. In veel situaties is er behoefte aan pathogeen- en deeltjes-vrije omgeving, in bijvoorbeeld operatiekamers, afdelingen, omgevingen voor immuun-onderdrukte patiënten en patiënten met ernstige allergieën. Dit maakt dat het wenselijk is om een methode te hebben niet alleen voor verzameling en identificatie, maar ook voor verwijdering van virussen en pathogenen in de lucht²⁰. Het is gebleken dat ozon gas norovirus inactieveert en gebruikt kan worden in lege kamers om oppervlakten te decontamineren. In kamers met patiënten kan ozon echter niet gebruikt worden dankzij de toxiciteit²¹ ervan. Van de opwekking van negatieve ionen is aangetoond dat het de transmissie van Newcastle disease virus^{22,23} en verschillende soorten bacteriën^{24,25} in dierproven reduceert. Het ioniseer apparaat wat gebruikt is in deze studie opereert bij 12 V en genereert negatieve ionisaties in een elektrisch veld, wat botst met aerosol deeltjes en ze een lading geeft. Die worden vervolgens gevangen door een positief geladen verzamelplaat.

¹Division of Molecular Virology, Department of Clinical and Experimental Medicine, University of Linköping, 581 85 Linköping, Sweden. ²Department of Microbiology, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. ³Department of Diagnostics and Vaccine, Swedish Institute for Communicable disease Control, Stockholm, Sweden. *These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.S. (email: lennart.t.svensson@liu.se)

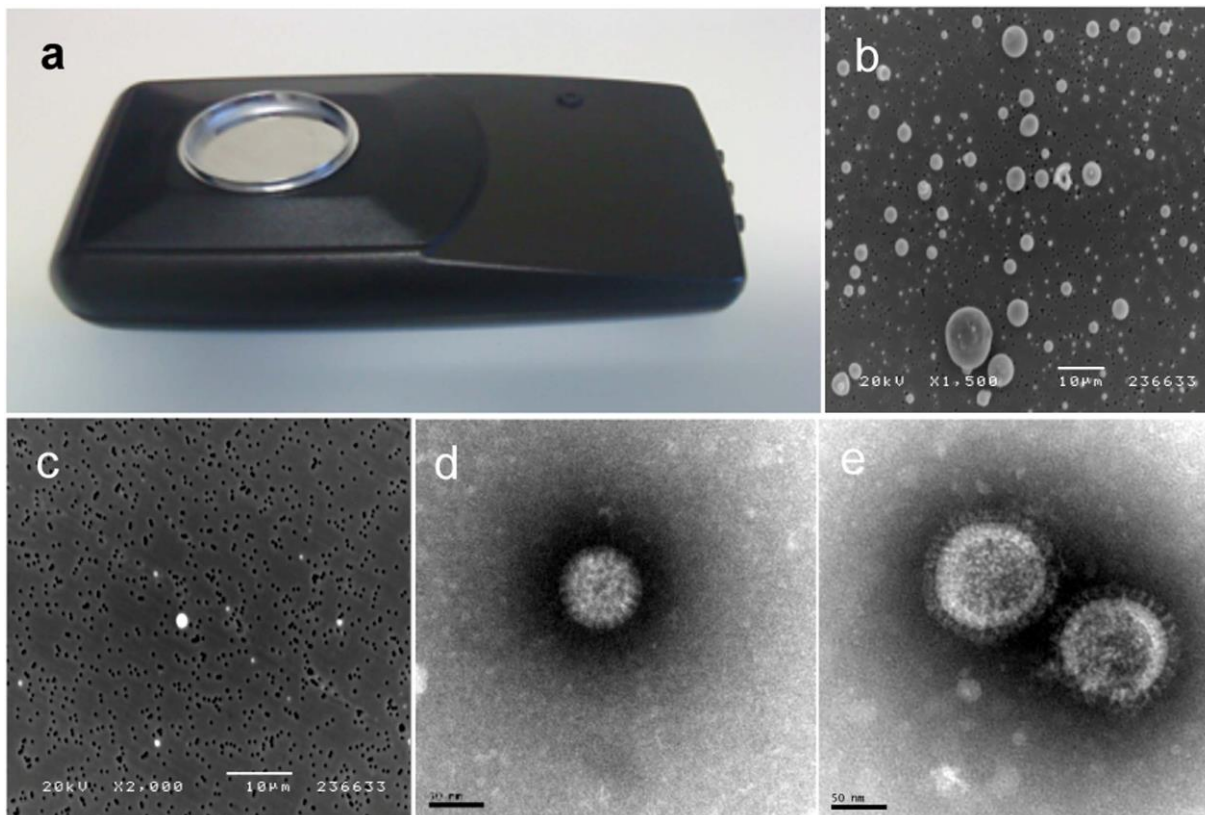


Figure 1. Airpoint ionizer met verzamelplaat (formaat 13×35 cm) (a). De ionisator wa ontwikkeld op basis van de Ion-Flow Ionizing Technology van LightAir AB, Solna, Sweden en is gemodificeerd door het installeren van een plastic beker met een geleidend oppervlak met een diameter van 47mm met een positieve lading als verzamel plaat; Aerosolvormige latex particles (>1 to $<10 \mu\text{m}$) werden gevangen op actieve (b) en inactieve (c), (bar = $10 \mu\text{m}$); Rotavirus (d); en influenza virus (H1N1; strain Salomon Island) (e) gevangen op een actieve ionisator. (Bar = 50 nm).

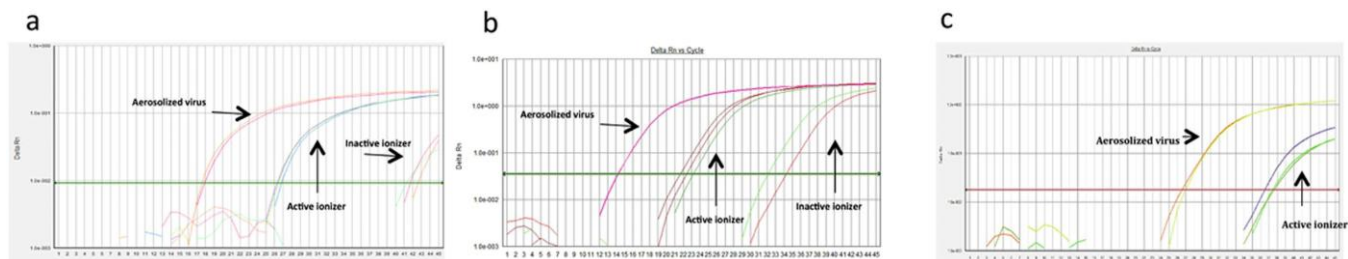
Voor veiligheid redenen heft de verzamelplaat een hele lage stroomsterkte, minder dan $80 \mu\text{A}$. Aan de andere kant accelereert de ionisatie machine een voltage van meer dan 200,000 eV. Wat ervoor zorgt dat er per seconde meerdere miljarden elektronen gegenereerd kunnen worden. Verder produceert dit apparaat geen waarneembare ozon, en het kan dus in alle omgevingen gebruikt worden. Het is van deze techniek bekend dat het effectief kat-allergenen uit de lucht verwijdert²⁶. Virussen in aerosol vorm zoals het Rota-, calci-, en influenzavirus die blootgesteld warden aan het apparaat warden aangetrokken tot de verzamelplaat en werden vervolgens door middel van elektron-microscopie en kwantitatieve realtime PCR geïdentificeerd. Wij laten zien dat deze technologie toegepast kan worden om luchtverbrenging van het influenzavirus tegen te houden.

Resultaten

Visualisatie en efficiënte van aerosol sampling zoals gedetermineerd door elektron microscopie.

Om een ionisatietechniek voor verzameling en identificatie van virale pathogenen te ontwikkelen en valideren, gebruikten wij verschillende virussen die van klinisch belang zijn; calcivirus, Rota virus, influenzavirus (H3N2, strain Salomon island) en latex deeltjes. Calici virus in honden (CaCV, strain 48) is gebruikt als surrogaat²⁷ voor humaan norovirus, het etiologisch middel achter de 'winter vomiting disease', een ziekte die van groot klinisch en economisch belang is²⁸. Resus rotavirus is gebruikt als surrogaatmarker voor humaan rotavirus²⁹.

Het apparaat (fig. 1a) bestaat uit een draagbare 12 volt ionisator, met een verzamelplaat met een positieve lading die aan de ionisator vastzit, die negatieve deeltjes uit de lucht aantrekt door middel van elektrostatische attractie. Om de optimale tijd-verzameling parameters te bepalen werden latex deeltjes van verschillende formaten (<1 tot >10 micrometer) werden verneveld in een kamer van 19 kubieke meter. Testen lieten zien dat 40-60 minuten nodig was om $>90\%$ van de vrije latex deeltjes uit de lucht te verwijderen zoals bepaald door realtime particle counting (PortaCount plus). De deeltjes teller kan alle deeltjes die groter zijn dan $0.02 \mu\text{m}$. Visualisatie door scanning elektron microscopie (SEM) op netwerken van de actieve en inactieve ionisatie-verzamel platen lieten zien dat accumulatie van latex deeltjes drastisch verhoogd werd op actieve platen ten opzichte van inactieve (Fig. 1b, c). Vervolgens werden grote hoeveelheden Rota virus en formaline-inactieve influenza virus in aerosolvorm gebracht onder dezelfde omstandigheden.



Figuur 2. Real-time PCR op gevangen rotavirus (a), calicivirus (b) en influenza virus (H1N1; strain Solomon Island) (c). Merk op dat geen influenzavirus gedetecteerd werd op de actieve ionisator.

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

Tabel 1. Verzamelings efficiëntie van aerosol CaCV, resus rotavirus (RRV) en influenzavirus in verschillende concentraties, zoals gedetermineerd door RT-qPCR. a) Dit experiment is maar een keer herhaald.

Terwijl, na 40 minuten de inactieve verzamel platen maar weinig (<5) rotavirus en influenzavirus verzameld had, had de actieve verzamelplaat > 50 virusdeeltjes, zoals bepaald door TEM-microscopie (Fig. 1d, e).

Lucht ioniseren en elektrostatische attractie verzamelt in aerosol vorm verspreide virussen zoals bepaald door RT-qPCR.

Vervolgens bepaalde wij de capaciteit van de RT-qPCR technologie om de capaciteit van de ionisatietechniek om virussen te verzamelen en concentreren te kwantificeren. Drie afzonderlijke experimenten met de drie virussen werden uitgevoerd met dezelfde virus concentraties in elk experiment (Fig. 2a–c). Hoewel er tussen de verzameling van de virussen en de detectie ervan meerder stappen zitten, was de herhaalbaarheid van het experiment hoog. De RT-qPCR data laat zien dat de actieve plaat 1500-3000 keer effectiever is in het concentreren en verzamelen van de virussen in vergelijking met de inactieve plaat (Tabel 1). Wanneer verschillende verdunningen van de virussen gebruikt werden voor de aerosol productie was de verhouding van het virus in aerosol vorm dat verzameld werd op de plaat normaal tussen de 0.1–0.6% voor CaCV, Rota virus en influenzavirus. A reproducible finding with

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

Table 2. Reduction of infectivity of Canine Calicivirus (CaCV) and Rhesus Rotavirus (RRV). ^aUnder detection limit (10 peroxidase forming units/mL) on the infectivity assay.

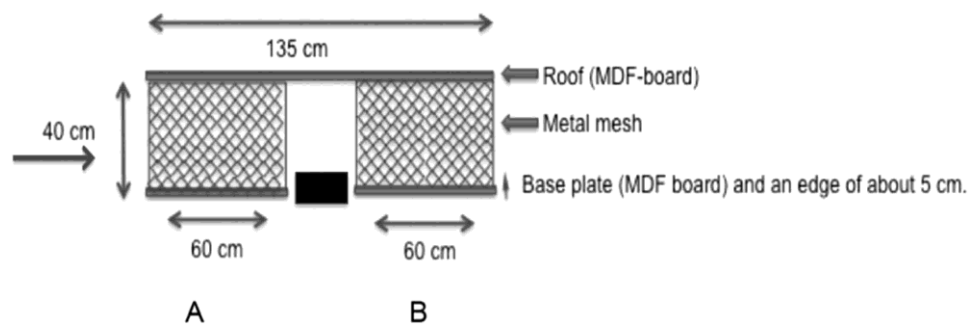


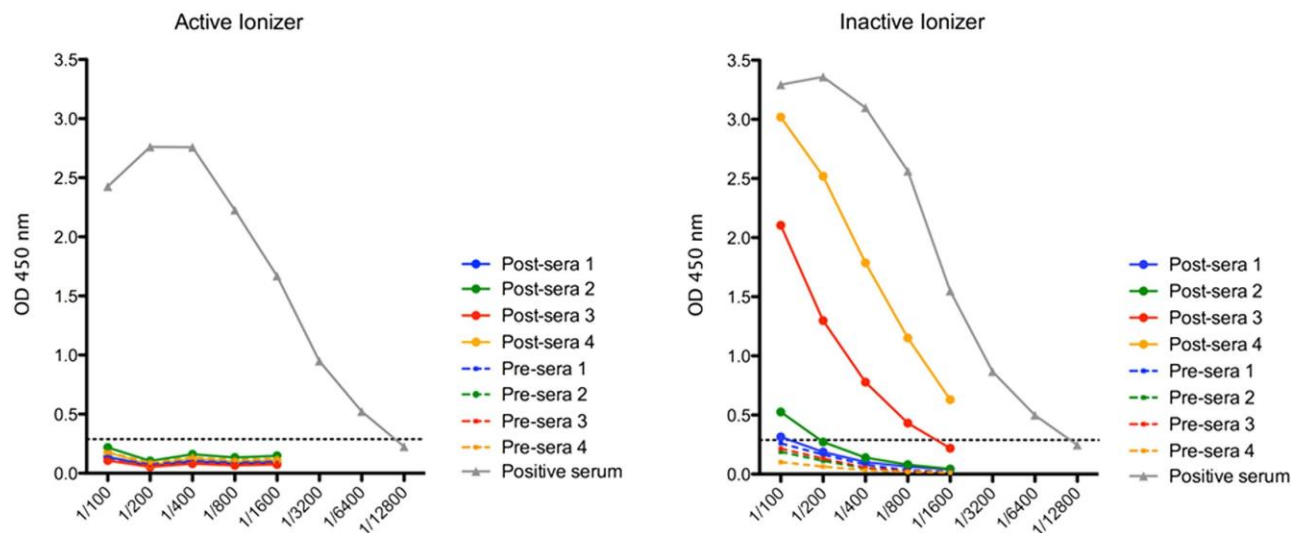
Figure 3. Set-up design of influenza virus (H3N2, Pan/99) aerosol-transmission experiments between guinea pigs. Guinea pigs ($n=4$) were intranasally infected with 5×10^3 pfu of Pan/99 virus in 100 μ L (50 μ L in each nostril). All four infected animals were placed into an experimental cage “A”. At 30 h p.i. four naïve uninfected guinea pigs were placed in cage “B”. Air-flow from left to right. Air exchanged 17x/day. Filled rectangle = ionizer.

Een reproduceerbare vinding met betrekking tot CaCV was een significant verhoging in relatieve winning bij de laagste concentraties die opliepen tot 10-20% van de totale hoeveelheid virus wat in aerosolvorm gebracht was (Tabel 1).

Lucht ioniseren verlaagt infectiviteit van calicivirus en rotavirus. Hierna bepaalden wij of de gevangen virussen hun infectiviteit behielden nadat zij blootgesteld waren aan negatief geladen ionen en/of de geladen verzamelplaat. 5mL van een celcultuur medium (Eagles Minimal Essential Media (Eagles MEM)) wat 1×10^6 peroxidase forming units van Rota virus of CaCV bevatte, werd in aerosol vorm gebracht en verzameld gedurende 40 minuten bij een actieve verzamelplaat, die 1 ml Eagles MEM bevatte. CaCV in de celcultuur medium werd ook direct blootgesteld aan inactieve en actieve verzamel platen, zonder eerst in aerosol vorm gebracht te worden. Virale infectiviteit werd bepaald zoals beschreven³⁰ bepaald en de verhouding tussen virale genoom kopie nummers ten opzichte van infectiviteit werd vergeleken bij virussen in aerosol vorm en virussen die blootgesteld waren aan actieve en inactieve platen en de virale voorraad oplossingen. CaCV dat was blootgesteld aan een actieve verzamelplaat, zonder in aerosol vorm te zijn gebracht, toonde een kleine reductie in infectiviteit (~40%) in vergelijking met virus dat was gevangen op een inactieve verzamelplaat(tabel2). Daartegen had het virus in aerosol vorm een grote reductie in infectiviteit van $>97\%$, wat indiceert dat de ionisatie van de aerosol voor het overgrote deel zorgt voor de reductie in infectiviteit, en niet de blootstelling aan de geladen verzamelplaat.

Verdere ondersteuning voor ionisatie als het mechanisme achter de reductie in infectiviteits verlies komt van de experimenten waar Rota virus werd verneveld zonder ionisatie en waar het op een inactieve verzamelplaat gevangen werd. Verzamel platen waren 30 cm van de vernevelaar geplaatst. Het resultaat liet zien dat de genoom kopie tegen infectiviteit verhouding onveranderd was gebleven van het oorspronkelijke virus, wat aangeeft dat de inactivatie van het virus geassocieerd wordt met de ionisatie van de lucht.

Lucht ioniseren en elektrostatische attractie weerhouden lucht gedragen influenza A/Panama virusinfectie tussen cavia's. Wij hebben gebruikt gemaakt van een bestaand influenza cavia model³¹⁻³³ om te bestuderen of de ionisatie van lucht en de elektrostatische attractie, infectie van lucht gedragen, aerosolvormig of druppelvormig influenzavirus A/Panama(pan/99) kon tegenhouden bij cavia's. De lucht gedragen/druppelvormig transmissie model werd opgezet zoals beschreven door gebruik te maken van twee losse hokken met het ionisatieapparaat tussen de twee hokken geplaatst³¹ (figuur 3). Vier cavia's werden intrasaaal geïnfecteerd zoals beschreven met 5×10^3 pfu Pan/99³¹ en werden in hok A (Fig. 3) geplaatst. Bij 30 uur na infectie werden de 4 geïnfecteerde cavia's in hok B geplaatst, 15cm van het hok met de geïnfecteerde cavia's, zoals in figuur 3 geïllustreerd staat, met geen mogelijkheid tot lichamelijk contact. De ionisator werd tussen de twee hokken geplaatst. Twee identieke experimenten werden uitgevoerd, een met de actieve ionisator tussen de twee hokken en een met een inactieve ionisator.



Figuur 4. Actieve ionisator weerhoudt aerosol transmissie van influenza virus (H3N2, Pan/99) infectie tussen cavia's. Terwijl de actieve ionisator 4 van de 4 blootgestelde cavia's weerhield van het ontwikkelen van een immuun response voor het influenza virus, werden bij de inactieve ionisator 3 van de 4 dieren geïnfecteerd. De grafiek toont antilichaam titers, gemeten met ELISA voor infectie (pre-serum 1, 2, 3 en 4) en bij dag 21 na blootstelling voor influenza virus (post-serum 1, 2, 3 en 4). Briefly, influenza virus H1N1; (SBL Influenza Vaccine, Sanofi Pasteur, Lyon, France) were coated on ELISA plates and incubated with two-fold dilutions of pre- and post- guinea pig sera, followed by biotinylated rabbit-anti-guinea pig antibody, HRP conjugated streptavidin and TMB substrate as described in Methods. Cut off (dashed line) value (0.284 OD) was the mean of the negative controls +2SD.

On geïnfecteerde dieren in hok B werden 24 uur blootgesteld aan luchtstroom afkomstig van hok A met de geïnfecteerde dieren en werden vervolgens 21 dagen in individueel geventileerde hokken geplaatst, om er zeker van te zijn dat de enige mogelijke infectie periode de 24 uur was waarin ze blootgesteld waren aan lucht van hok A. RT-qPCR van long en trachea biopsieën van de experimenteel nasaal geïnfecteerde cavia's, 54 uur na mogelijke infectie bekeken, toonde dat 3 van de 4 cavia's in beide experimenten positief scoorden voor influenza virus. Wij beoordeelden transmissie van infectie tussen dieren van hok A en blootgestelde, on-geïnfecteerde dieren in hok B door mogelijke immuun response op het virus te observeren 21 dagen na blootstelling. De resultaten die in figuur 4 getoond zijn illustreren dat wanneer de ionisator inactief was, 3 van de 4 on-geïnfecteerde, blootgestelde cavia's een serum IgG influenza specifiek immuun response ontwikkelden. In tegenstelling daarmee ontwikkelden van de 4 cavia's in hok B waar een actieve ionisator tussen de hokken geplaatst was, geen van de cavia's een immuunrespons. Verder kon er doormiddel van RT-qPCR lage concentraties influenza virus RNA gedetecteerd worden op de verzamel plaat bij een actieve ionisator maar niet bij een inactieve, wat laat zien dat da actieve ionisator inderdaad virus uitgescheiden door geïnfecteerde dieren verzamelde.

Discussie

Wij beschrijven een simpel ionisator apparaat wat opereert bij 12 volt, welk de verspreiding van lucht gedragen, overdraagbare virussen tussen dieren in een gecontroleerde omgeving kan verhinderen terwijl het tegelijkertijd virus verzameld uit de lucht voor snelle identificatie. Gepaard met gevoelige RT-qPCR assay, maakte deze sampling methode het mogelijk om snel meerdere soorten humane virussen van groot klinisch belang te detecteren en op hoog gevoelige wijze te kwantificeren, waaronder influenza virus, Rota virus en calcivirus. Het apparaat bestaat uit een kleine draagbare ionisator, waar een sampling beker met een positieve lading die negatief geladen deeltjes uit de lucht van halen, vastzit aan de ionisator. Belangrijke voordelen van deze nieuwe ionisator apparaat, zijn dat het apparaat gemakkelijk te gebruiken is, erg robuust is en de brede toepasbaarheid op lucht gedragen pathogenen. De waarneming dat een actieve ionisator 1500 tot 3000 keer zoveel Rota virus en CaCV deeltjes uit de lucht, dan een inactieve ionisator, bracht ons tot de conclusie dat deze techniek actief en efficiënt, virale deeltjes uit de lucht kan verzamelen. Op dezelfde manier liet visualisatie van latex deeltjes door SEM zien dat latex deeltjes van alle geïnstigeerde groottes (35 nm tot 10 micrometer) geconcentreerd waren op de verzamelplaat. Dit suggereert een brede inzetbaarheid van deze technologie omdat het blijkbaar geschikt is om veel verschillende soorten deeltjes uit de lucht kan verzamelen. Aan de andere kant zouden te grote deeltjes de recovery van deeltjes uit de lucht kunnen verhinderen omdat zij minder lang in de lucht blijven^{33,34}.

Opmerkelijk is dat wanneer we lage hoeveelheden CaCV (1.56×10^4 gen kopieën en 1.87×10^3 Gen kopieën) in aerosol vorm brachten, wij verzamel hoeveelheden waarnamen van 10.6% en 21% respectievelijk. Deze duidelijke verhoging in efficiëntie, bij kleinere hoeveelheden virus distributie in de lucht, zou het resultaat kunnen zijn van minder aggregatie van virus-virus of virus-cel afval deeltjes die langer in de lucht zijn, en zo leiden tot sterkere elektrostatische attractie tot de verzamelplaat.

Verder is het waarschijnlijk dat veel deeltjes eindigen tegen de muren van de verzamelplaat of op gebieden naast de plaat op de ionisator; en vervolgens niet gekwantificeerd worden door RT-pcr; zodoende, de elektrostatische attractie onderschattend. Wanneer hoger concentraties van het virus in aerosol vorm gebracht worden kan dit leiden tot lagere schattingen van de efficiëntie.

Gebruik makend van Rota virus, influenzavirus en CaCV deeltjes voerden wij drie experimenten uit voor elke concentratie van het virus in aerosol vorm om de robuustheid van het assay gedurende de verschillende stappen te onderzoeken (verzameling met actieve ionisator, RNA-extractie, cDNA synthese en real time PCR). Hoewel er veel stappen plaatsvinden tussen verzameling en detectie vonden wij dat de assay erg robuust was omdat de minimum en maximum hoeveelheid virus van elke concentratie voor elke losse meting altijd binnen het gebodeid was van 1 log (figuur 2).

Inactivatie van virussen door elektrostatische attractie is allen kort onderzocht³⁵. In de huidige studie verloren Rota virus en CaCV significant hun infectiviteit (>97%) (ratio; CaCV van 3.0×10^{-2} tot $<7.8 \times 10^{-4}$ en Rota virus van 4.9×10^{-1} tot $<7.6 \times 10^{-3}$) in geïoniseerde lucht, zoals bepaald door een verhouding van infectiviteit tegen gen kopieën. Het mechanisme van inactivatie is niet expliciet vermeld maar inactivatie mechanismen zouden onder ander reactieve soorten of verhoogde eiwit lading niveaus kunnen zijn, deze zouden het virus zoals beschreven kunnen inactiveren^{36,37}.

Verminderde infectiviteit is als resultaat voorgesteld van reactieve zuurstof soorten en ozon, door lipide en eiwit peroxidatie reacties die zouden resulteren in schade en verwoesting aan de virale lipide omhulsel en eiwitmantel³⁶. In het bijzonder zou eiwit peroxidatie een rol kunnen spelen bij de inactivatie van eiwit mantel loze virussen zoals het adenovirus, poliovirus en andere enterovirussen zoals Rota en calicivirussen. Van virussen met eiwitmantel wordt gesuggereerd dat zij hun infectiviteit verliezen door lipide peroxidatie. Maar, de cytotoxiciteit van ozon is een groot obstakel voor klinische toepasbaarheid. Het is aangetoond dat het verhogen van de ion concentratie in de lucht kippen efficiënt beschermt voor lucht gedragen transmissie van het lethale Newcastle disease virus²³. De exacte mechanisme achter negatieve ion inactivatie van virussen is niet aangetoond en moet verder onderzocht worden. Maar, in een studie die gebruik maakte van generatie van negatieve en positieve ionen, werd influenzavirus geïnactiveerd ondanks het feit dat de ozonconcentratie verwaarloosbaar was (0.005 PPM of minder)³⁷.

Ons apparaat liet een steady state ozonconcentratie onder detectie niveau vrij (0.002 PPM) zoals getest door VTT (technical research centre of finland, tampere, finland) en door de Air Resources Board in de VS, zodoende kan ozon in dit geval geen contributie leveren aan de inactivatie van het virus. Maar, reactieve radicalen zoals zuurstof zouden wel gegenereerd kunnen zijn, wat wel bij zou kunnen dragen aan de inactivatie door schade aan de eiwit of nucleïnezuur structuren in de virussen³⁷. Omdat infectiviteit niet verloren ging wanneer het virus in de lucht van de kamer verneveld werd en weinig reduceerde wanneer het direct op het positief geladen verzamelplaat geplaatste werd, wordt er gesuggereerd dat het waarschijnlijk dat de meeste reductie van infectiviteit gevolg is van de verhoogde negatieve lading, wat waarschijnlijk resulteert in een veranderen van iso-electrisch punt en zodoende in veranderingen in de structuur van de eiwitmantel. Omdat de twee onderzochte virussen geen eiwitmantel hebben kan dit worden uitgesloten.

Het interessante en klinisch belangrijke aan deze studie is de nieuwe ontdekking dat het ionisatieapparaat influenzavirus kon detecteren en dat het infectie in een gecontroleerde omgeving, die 'authentieke' omstandigheden nabootste, kon verhinderen. Onze intranasale infectie protocol was zoals beschreven, gebruik makend van Hartley^{30,33} cavia's en 5×10^3 plaque forming units (pfu) van pan/99 influenzavirus. Omdat cavia's van de hartley strain heel ontvankelijk zijn voor humaan influenza A virus strain Pan/99, met een effectieve infectie dosis (ID₅₀) of 5 pfu³¹, is deze strain van het virus het meest geschikt voor deze studie. Bovendien hebben Lowen en zijn medewerkers 100% transmissie van Pan/99 in aerosol vorm laten zien^{38,39}. Eerder studies hebben aangetoond dat in dit dierlijk model³¹, de gebruikte infectieuze dosis resulteert in een virale groei piek rondom dag 3 p.i. (post-infectie) in beide de longen en de nasale gangen. Een tijdstip waarbij naïeve dieren in onze studie blootgesteld werden aan lucht van de geïnfecteerde dieren. Wij vonden, door de ontwikkeling van de immuun respons, dat 3 van de 4 cavia's geïnfecteerd raakten na blootstelling aan dieren die geïnoculeerd waren met 5×10^3 pfu of Pan/99. Deze vatbaarheid figuren zijn vergelijkbaar met die van Mubareka en medewerkers³³, die vonden dat 2 van de 3 cavia's geïnfecteerd werden na korte afstand aerosol transmissie met een dosis van 10^3 pfu, terwijl 3 van de 3 dieren geïnfecteerd raakte bij een dosis van 10^6 pfu. Wij bekeken het immuunrespons bij 21 dagen na infectie, een tijdstip waarbij Lowen en zijn medewerkers vonden dat natuurlijk Pan/99 geïnfecteerde cavia's een duidelijke immuun response ontwikkeld hadden. De vormen van influenzavirus transmissie omvat direct contact tussen individuen, blootstelling aan virus-gecontamineerde objecten en inhalatie van infectieuze aerosollen. Voorgaande studie die gebruik maakten van het cavia model hebben aangetoond dat aerosol en niet fomiten de voornaamste route van Pan/99 is tussen cavia's³³. Als aerosol vrijgelaten virus van geïnoculeerde dieren kon worden gedetecteerd op de actieve verzamelplaat door RT-qPCR, zij het op hele lage hoeveelheden gen kopie nummers. Gebruik makend van de cavia als een gastheer model lieten Lowen *et al.*³⁸ zien dat aerosol verspreiding van influenzavirus tussen dieren afhankelijk is van beide de relatieve luchtvochtigheid en de temperatuur. Zij vonden dat lage luchtvochtigheid van rond de 20-30% en een temperatuur van 5 graden Celsius het meest geschikt was, met geen enkele overdracht bij 30 graden Celsius. In onze opgezette systeem lag de temperatuur tussen de 20 en de 21 graden Celsius en was de luchtvochtigheid tussen de 35-36.2%. De beschreven ionisatieapparaat, gekoppeld met RT-qPCR assay heeft een duidelijke potentie. De makkelijke hanteerbaarheid, lage kosten, ozonvrij, robuust, hoogst efficiënt en lage voltage (12 Volt) operatie zorgen er allemaal voor dat het een hoge mate van inzetbaarheid heeft. Vooral voor locaties die cruciaal zijn voor infectie verspreiding zoals vliegtuigen, ziekenhuizen kinderopvangen, scholen en andere publieke ruimten zouden op deze manier gemonitord en gecontroleerd kunnen worden door verzameling en analyse van lucht gedragen virussen en ander pathogenen op de verzamelplaat.

Het apparaat toont ook potentie voor verhinderen van transmissie, hoewel de potentie verder onderzocht moet worden in 'real life' omstandigheden. Wij concluderen dat deze innovatieve technologie grote potentie houdt om virussen te verzamelen en identificeren in omgevingen lucht.

Methode

Studieontwerp. De experiment kamer heeft geaarde metalen muren met een volume van 19 vierkante meter (B250*L330*H235cm). Een actieve en een inactief ionisatie apparaat, ontworpen voor verzameling en analyse van deeltjes in de lucht, werden in de kamer geplaatst op een gelijke afstand (215cm) van de vernevelaar (Aiolos Albatross, Aiolos, Sweden), met een afstand van 64 cm tussen de twee ionisatie apparaten. Een deeltjes teller (PortaCount Plus, TSI Incorporated, USA) werd gebruikt voor en tijdens het experiment. Voor de start van de aerosol experimenten, werd de kamer gelegeerd van alle deeltjes door de actieve ionisator en de verzamelplaat werd verwijderd voordat de experimenten begonnen en verwisseld met een nieuwe verzamelplaat. De experimenten werden vervolgd totdat de deeltjes teller terug was op een basaal niveau, welk meestal bereikt werd na 40 minuten. Luchtvochtigheid en temperatuur omstandigheden werden eerst gemeten bij de aerosol experimenten.

Ionisatie technologie en apparaat. Het ionisatie apparaat wat gebruik is in deze studie was ontwikkeld op basis van de ion-flow ionisatie technologie van LightAir AB, Solna, Sweden (www.lightair.com) en was gemodificeerd voor dit werk door de afdeling van microbiologie Karolinska Institute, Stockholm, Sweden. Het apparaat (grootte van 13 × 35 cm) was gemodificeerd door een plastic beker met een geleidend oppervlak van 47 mm in diameter (GP plastindustri, Gislaved, Sweden) als verzamelplaat vast te maken aan het apparaat (Fig. 1). De verzamelplaat heeft voor veiligheids redenen een hele lage stroomsterkte, minder dan 80 µA, maar, de ionisator accelereert een extreem hoge voltage van meer dan 200,000 eV. De ionisator maakt elektronen die de oppervlak moleculen van deeltjes in de lucht negatief laden, en ze zodoende aantrekking tot de positief geladen verzamelplaat. Dit apparaat genereert ongeveer 35 000 miljard elektronen per seconde (www.lightair.com) met een steady state ozon concentratie onder de detectielimiet (0.002PPM) zoals getest door VTT Technical Research Center of Finland, Tampere, Finland. Het is ook ozon getest en gecertificeerd door ARB (Air Resources Board) in de VS. Na afloop van de sampling periode werd de ionisator uit gezet en met een deksel bedekt en opgeslagen bij -20 graden Celsius tot analyse. Virussen die op de verzamelplaat gevangen waren werden geanalyseerd door RT-qPCR voor Rota virus, CaCV en influenzavirus, en de resultaten van de actieve en inactieve ionisators werden vergeleken. Scanning en transmissie elektron microscopie werden gebruikt voor de visualisatie van de verzamelde virussen en latex deeltjes.

Aerosol experimenten van virus en latex deeltjes. Verschillende hoeveelheden van resus Rota virus (geno- type G3P[3]), influenzavirus (strain H1N1, Salomon Island, inactivated) en CaCV strain 48 (genus *Vesivirus*) werden verdunde in water tot een volume van 5 ml. In aerosol experimenten voor scanning electron microscopy en infectiviteits analyse, werd virus verdund in Eagles MEM. Virus suspensies in verschillende concentraties werden verdeel als aerosol in de kamer met behulp van een vernevelaar. Elk experiment werd uitgevoerd in triplo en een verzameling van de virussen en latex deeltjes werd gedurende 40 minuten uitgevoerd.

Transmission electron microscopy (TEM). Carbon/Formvar-coated 400 mesh koper grids werden op de verzamelplaat geplaatst tijdens de aerosol experimenten met influenza- en Rota virus. De grids werden vervolgens gerehydrateerd in Eagles MEM wat 1% bovine serum albumin (BSA) bevatte voordat het negatief gestained werd met 2% phosphotungstic zuur en geanalyseerd door TEM. Tien grid squares werden per exemplaar geanalyseerd en het aantal virus deeltjes werd uitgerekend in partikels per eenheid.

Scanning electron microscopy (SEM). Verzamelde samples werden toegevoegd op het oppervlak van een polycarbonaat 0.6µm filter (Nucleopore, Inc) welke was vastgemaakt aan een luchtdichte gadget (GP Plastindustri AB, Gislaved, Sweden). De filter werd opgedroogd op kamer temperatuur, en vervolgens gecoat met een 40 Å dikke laag van geïoniseerd goud en geanalyseerd door SEM (Philips High Resolution SEM 515). De methode is eerder gebruikt en gerapporteerd in studies over cytomegalovirus alsoo ook cerebrospinale vloeistof⁴¹⁻⁴³.

Extractie van viraal RNA van de verzamelplaten. De verbonden virale deeltjes op de verzamelplaten werden geanalyseerd met 1 ml lysis buffer (buffer AVL, QIAamp viral RNA mini kit) die direct in de verzamelplaat toegevoegd was. Direct daarop ging de plaat door naar de extractie van viraal RNA met QIAamp Viral RNA Mini Kit (Cat.no: 52906 Qiagen, Hilden, Germany) in overeenstemming met de gebruiksaanwijzing van de fabrikant. Elke sample werd geelueerd met 60 microliter RNase vrij water met 0.04% sodium azide (AVE buffer; Qiagen, Hilden, Germany).

Reverse transcriptie van viraal RNA extract. 28 µL van het viraal RNA extract werd gemengd met pmol Pd(N)₆ random hexamer primer (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) en snel gekoeld op ijs voor 2 minuten, gevolgd door additie met een Illustra Ready-To-Go reverse transcriptase PCR (RT-PCR) bead (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) en RNase-vrij water tot een eindvolumen van 50 µL. Voor Rota virus, werd een initiële denaturatie stap bij 97 graden Celsius voor 5 minuten uitgevoerd om de dsRNA te denatureren. De reverse transcriptie (RT) reactie werd uitgevoerd voor 40 minuten bij 42 graden Celsius om het cDNA te produceren wat later voor RT-PCR gebruikt ging worden.

Kwantitative real-time PCR voor Rota virus. Resus Rota virus werd gedetecteerd en gekwantificeerd door een LUX real-time PCR assay zoals hiervoor beschreven⁷. Deze realtime PCR gebruikt gelabelde primers met verschillende fluorophores voor elke VP6 subgroep en uiterlijke plasmide standaarden voor semi kwantificatie⁴⁴.

Kwantitative real-time PCR voor CaCV. CaCV werd gedetecteerd en gekwantificeerd met een SYBR green assay op een ABI prisma 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) met primers; (laatste concentratie 200 nM) CaCV-3 (5-ACCAACGGAGGATTGCCATC-3' (nucleotides 393 to 410 in overeenstemming met GenBank accession no. AF053720) en CaCV-4 (5'TAGCCGATCCCAAGAAGACA-3' (nucleotides 452 tot 474), specifiek voor CaCV strain 48. De reactie werd uitgevoerd met 2 µL cDNA in 10 µL 2X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en water tot een laatste volume van 20 µL. De volgende cycling programma werd gebruikt: 95 °C voor 10 min gevolgd door 45 cycles van 95 °C voor 15 seconden en 60 °C voor 1 min. Melting curve analysis was gelijk aansluitend uitgevoerd na afronding van PCR, door te verhitten bij 95 °C voor 15 seconden, gevolgd door koeling tot 60 °C voor 1 min en vervolgens weer te verhitten tot 95 °C bij 0.8 °C min⁻¹ met continue fluorescentie opname. Melting temperature werden bepaald bij alle samples met de Sequence Detection Software version 1.3.1 (Applied Biosystems) en visualisatie door de negatieve derivaten te plotten tegen de temperatuur.

Sampling voor infectiviteits studie met Rota virus en CaCV. Om te bepalen of de ionisatie technologie enige invloed heeft over de infectiviteit van het virus, warden Rota virus en CaCV in aerosol vorm gebracht met behulp van een vernevelaar en vervolgens gevangen op een actieve ionisatie verzamelplaat die bedekt waren met 1 ml Eagles MEM. Rota virus (1×10^6 peroxidase forming units) en CaCV (1×10^6 peroxidase forming units) werd in aerosol vorm gebracht, elk met een volume van 5 ml en verzameld gedurende 40 minuten gevolgd door een bepaling van de infectiviteit en het aantal gen kopieën. Om te bepalen of de geïoniseerde lucht *an sich* een effect had op de virale infectiviteit werd resus Rota virus in aerosol vorm gebracht en gevangen op een plaat met 1 ml Eagles MEM zonder ionisatie, 30 cm van de vernevelaar vandaan.

Om te bepalen of de elektrostatische attractie van de verzamelplaten de infectiviteit van het virus verlaagde werd Rota virus (2×10^5 peroxidase forming units) en CaCV (2×10^5 peroxidase forming units) in 1 ml Eagles MEM toegevoegd en warden zij gedurende 40 minuten op inactieve en actieve verzamelplaten geplaatst. De platen warden vervolgens bij -20 °C bewaard totdat de infectiviteit en het aantal gen kopieën bepaald kon worden.

Bepaling van Rota virus en CaCV infectiviteit. Rotavirus standard oplossing en samples werden 1:10 verdund in Eagles MEM en vervolgens verdunde in tweevoud verdunningen. Bepaling van de virale infectiviteit werd uitgevoerd zoals eerder beschreven bij confluente Groene aap niercellen (MA104) in 96-well platen³⁰. CaCV infectiviteit werd bepaald op dezelfde manier als voor rotavirus met de uitzondering dat sample toegevoegd warden aan confluente Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cellen in 48-well platen en infectiviteit bepaald werd zoals eerder beschreven⁴⁵ en bevestigd door RT-qPCR. Om de reductie in infectiviteit te bepalen werd de verhouding tussen virale gen kopie nummers en infectiviteit vergeleken tussen virus in aerosol vorm, virus dat was blootgesteld aan actieve en inactieve ionisatie verzamel platen en de virale standaard oplossing.

Dieren. Cavia's strain Hartley, vrouwelijk, 300–350 g, warden gehuisvest bij Astrid Fagraeus Laboratory, Karolinska Institute, in overeenstemming met de goedgekeurde richtlijnen van de Board of Agriculture and the Council of Europes Convention on vertebrate animals used for scientific purpose. Het experimentele protocol is goed gekeurd door de Animal Ethics Committee in Stockholm (Permit Number: N177/11).

Lucht gedragen transmissie van influenzavirus. Wij gebruiken een cavia dierlijk model om verder uit te zoeken of de ionisatie techniek, transmissie van influenza virus kon verhinderen omdat dit model succesvol gebruikt is als model voor aerosol transmissie studies van influenza virus^{31,33}. Humaan influenza A virus, strain Pan/99 (beschikbaar gemaakt door Peter Palese, New York, USA) werd gebruikt omdat gebleken is dat deze strain effectief replicateert in de bovenste respiratoire luchtwegen en omdat het effectief overgebracht wordt als aerosol en niet als fomieten in cavia's. Vrouwelijke cavia's, 300–350 g, strain Hartley, warden gehuisvest bij Astrid Fagraeus Laboratorium, Solna, Stockholm (Ethical permission N177/11). Vier dieren werden verdoofd door intra peritoneale injectie van ketamine (Ketalar el Ketaminol) 50 mg/kg en xylazin (Rompun) 5 mg/kg en intranasaal geïnfecteerd met 5×10^3 pfu Pan/99 virus in 100 µL (50 µL in elk neusgat). Alle vier geïnfecteerde dieren warden in een experimentele kooi geplaatst (Fig. 3, cage "A"). bij 30 h na infectie werden 4 naïeve on geïnfecteerde cavia's ernaast geplaatst in de transmissie kooi (Fig. 3, cage "B") op een afstand van 15 cm. Lucht stroomde vrij tussen de twee kooien maar direct contact tussen geïnculeerde dieren en geïnfecteerde dieren werd verhinderd. De vier naïeve cavia's werden 24 uur lang blootgesteld en vervolgens in afzonderlijk geventileerde hokken geplaatst om aerosol transmissie tussen de dieren uit te sluiten. Twee identieke experimenten werden uitgevoerd met een actieve en een inactieve ionisator. De nasaal geïnfecteerde dieren werden verwijderd na de blootstellings periode en de long en trachea biopsieën werden verzameld en onderzocht voor influenzavirus door RT-qPCR, 54 uur na infectie. 21 dagen na blootstelling werd serum gecollecteerd van de geïnfecteerde, blootgestelde cavia's en de aanwezigheid van antilichamen tegen influenza A-virus werd bepaald met ELISA.

Sera werd voor blootstelling aan de geïnfecteerde cavia's en 21 dagen na de blootstelling geanalyseerd voor elk dier.

ELISA-detectie van influenza A antilichamen. 96-well platen (Nunc, 96F MAXISORP, Roskilde, Denmark) werden kort gecoat met formaline-inactiverende Influenza A virus H1N1 (SBL Influenza Vaccine, Sanoil Pasteur, Lyon, France), verdund in coating buffer (0.05 M sodium carbonate buffer, pH 9.5–9.7) bij 5 µg/mL en geïncubeerd bij +4 °C gedurende de nacht. De wells werden 3x gewassen in (0.9% NaCl en 0.05% Tween-20) en geblokt met 3% BSA in PBS buffer voor 1 uur bij 37 °C. Serum samples werden 1:100 verdund en verder in tweevoud verdunningen in oplosbuffer (PBS bevattende 0.5% BSA en 0.05% Tween-20), en geïncubeerd voor 90 min bij 37 °C. Platen werden daarna 5x gewassen en geïncubeerd voor 60 min bij 37 °C met secundair biotinylerd geit-anti cavia antilichaam (Vector, BA-7000) en horseradish-peroxidase (HRP) conjugated Streptavidin (DAKO, Denmark, P0397), beide bij een verdunning van 1:3000. Platen werden daarna 5x gewassen en 100 µL tetramethyl benzidine (TMB) substraat (Sigma Aldrich, T-0440-16) werd aan elke well de reactie ontwikkelde voor 10 minuten en werd gestopt door toevoegen van 100 µL 2 M H₂SO₄. Absorbantie werd bij 450 nm gemeten in een ELISA-reader (VersaMax, Molecular Devices). Cutoff values werden uitgerekend als de gemiddelde waarde van de negatieve controles OD en 2 keer de SD.

Extractie van influenza RNA uit cavia weefsel. RNA werd verkregen uit trachea en longweefsel van geïnfecteerde cavia's. 100–250 mg weefsel werd kort gehomogeniseerd met een weefsel homogenisator en het totale RNA werd verkregen met RNeasy Midi Kit (Qiagen) in overeenstemming met de aanwijzingen van de fabrikant.

Kwantitatieve realtimePCR voor influenzavirus. Om Influenza A-virus te detecteren en kwantificeren op de verzamelplaten zowel als in de cavia weefsel samples, gebruikten wij een One-Step Taq Man real-time RT-PCR assay⁴⁶ met primers F1-mxA (150 nM) (5'-AAGACCAATYCTGTCACCTCTGA-3'), F3-mxA (150 nM) (5'-CAAGACCAATCTTGTCACCTCT GAC-3') en R1-mxA (900 nM) (5'-TCCTCGCTCACTGGGCA -3') en probes P1-Mx (110 nM) (5'-FAM-TTGTGTTACGCTCACC-MGB-3') en P2-Mx (110 nM) (5'-FAM-TTTGTATTACGCTACCG-MGB -3'), met de Rotor-Gene Probe RT-PCR Kit (Qiagen). De realtime PCR reactie werd uitgevoerd in een Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen) met de volgende cycling protocol: 50 °C voor 10 min, gevolgd door 45 cycles van 95 °C voor 5 seconden en 57 °C voor 15 seconden.

Referenties

1. Lipsitch, M. *et al.* Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome. *Science* **300**, 1966–1970, (2003).
2. Tellier, R. Aerosol transmission of influenza A virus: a review of new studies. *J R Soc Interface* **6 Suppl 6**, S783–S790, (2009).
3. Stilianakis, N. I. & Drossinos, Y. Dynamics of infectious disease transmission by inhalable respiratory droplets. *J R Soc Interface* **7**, 1355–1366, (2010).
4. Teunis, P. F., Brienens, N. & Kretzschmar, M. E. High infectivity and pathogenicity of influenza A virus via aerosol and droplet transmission. *Epidemics* **2**, 215–222, (2010).
5. Fowler, R. A., Scales, D. C. & Ilan, R. Evidence of airborne transmission of SARS. *N Engl J Med* **351**, 609–611; author reply 609–611, (2004).
6. Fiegel, J., Clarke, R. & Edwards, D. A. Airborne infectious disease and the suppression of pulmonary bioaerosols. *Drug Discov Today* **11**, 51–57, (2006).
7. Nordgren, J., Bucardo, F., Svensson, L. & Lindgren, P. E. Novel light-upon-extension real-time PCR assay for simultaneous detection, quantification, and genogrouping of group A rotavirus. *J Clin Microbiol* **48**, 1859–1865, (2010).
8. Nordgren, J., Bucardo, F., Dienus, O., Svensson, L. & Lindgren, P. E. Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J Clin Microbiol* **46**, 164–170, (2008).
9. Mackay, I. M., Arden, K. E. & Nitsche, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* **30**, 1292–1305, (2002).
10. Booth, T. F. *et al.* Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *J Infect Dis* **191**, 1472–1477, (2005).
11. Hermann, J. R. *et al.* Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Appl Environ Microbiol* **72**, 4811–4818, (2006).
12. Pyankov, O. V. *et al.* Using a bioaerosol personal sampler in combination with real-time PCR analysis for rapid detection of airborne viruses. *Environ Microbiol* **9**, 992–1000, (2007).
13. Verreault, D., Moineau, S. & Duchaine, C. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 413–444, (2008).
14. Turgeon, N., Toulouse, M. J., Martel, B., Moineau, S. & Duchaine, C. Comparison of five bacteriophages as models for viral aerosol studies. *Appl Environ Microbiol* **80**, 4242–4250, (2014).
15. Verani, M., Bigazzi, R. & Carducci, A. Viral contamination of aerosol and surfaces through toilet use in health care and other settings. *American journal of infection control* **42**, 758–762, (2014).
16. Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z., Lemieux, C. & Gardam, M. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis* **7**, 257–265, (2007).
17. Sato, T. [Infection control in hospitals]. *Masui* **59**, 56–63, (2010).
18. Hans, C. Infection control practices for avian influenza in healthcare facilities. *J Indian Med Assoc* **104**, 388, 390, 392 passim, (2006).
19. Hatagishi, E. *et al.* Establishment and clinical applications of a portable system for capturing influenza viruses released through coughing. *PLoS one* **9**, e103560, (2014).
20. Bergeron, V. *et al.* Supplemental treatment of air in airborne infection isolation rooms using high-throughput in-room air decontamination units. *American journal of infection control* **39**, 314–320, (2011).
21. Hudson, J. B., Sharma, M. & Petric, M. Inactivation of Norovirus by ozone gas in conditions relevant to healthcare. *The Journal of hospital infection* **66**, 40–45, (2007).
22. Mitchell, B. W. & King, D. J. Effect of negative air ionization on airborne transmission of Newcastle disease virus. *Avian diseases* **38**, 725–732, (1994).
23. Estola, T., Makela, P. & Hovi, T. The effect of air ionization on the air-borne transmission of experimental Newcastle disease virus infections in chickens. *The Journal of hygiene* **83**, 59–67, (1979).

24. Escombe, A. R. *et al.* Upper-room ultraviolet light and negative air ionization to prevent tuberculosis transmission. *PLoS medicine* **6**, e43, (2009).
25. Gast, R. K., Mitchell, B. W. & Holt, P. S. Application of negative air ionization for reducing experimental airborne transmission of *Salmonella enteritidis* to chicks. *Poultry science* **78**, 57–61, (1999).
26. Parvaneh, S. *et al.* A new method for collecting airborne allergens. *Allergy* **55**, 1148–1154, (2000).
27. Mochizuki, M. *et al.* A calicivirus isolated from a dog with fatal diarrhoea. *Vet Rec* **132**, 221–222, (1993).
28. Lee, B. Y. *et al.* Economic value of norovirus outbreak control measures in healthcare settings. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **17**, 640–646, (2011).
29. Vesikari, T., Rautanen, T., Varis, T., Beards, G. M. & Kapikian, A. Z. Rhesus Rotavirus candidate vaccine. Clinical trial in children vaccinated between 2 and 5 months of age. *Am J Dis Child* **144**, 285–289, (1990).
30. Istrate, C. *et al.* Bone marrow dendritic cells internalize live RF-81 bovine rotavirus and rotavirus-like particles (RF2/6-GFP-VLP and RF8*2/6/7-VLP) but are only activated by live bovine rotavirus. *Scand J Immunol* **65**, 494–502, (2007).
31. Lowen, A. C., Mubareka, S., Tumpey, T. M., Garcia-Sastre, A. & Palese, P. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9988–9992, (2006).
32. Pica, N., Chou, Y. Y., Bouvier, N. M. & Palese, P. Transmission of influenza B viruses in the guinea pig. *J Virol* **86**, 4279–4287, (2012).
33. Mubareka, S. *et al.* Transmission of influenza virus via aerosols and fomites in the guinea pig model. *J Infect Dis* **199**, 858–865, (2009).
34. Gralton, J., Tovey, E., McLaws, M. L. & Rawlinson, W. D. The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: a review. *J Infect* **62**, 1–13, (2011).
35. Kettleson, E. M. *et al.* Airborne virus capture and inactivation by an electrostatic particle collector. *Environ Sci Technol* **43**, 5940–5946, (2009).
36. Murray, B. K. *et al.* Virion disruption by ozone-mediated reactive oxygen species. *Journal of virological methods* **153**, 74–77, (2008).
37. Nishikawa, K. & Nojima, H. Airborn virus inactivation technology using cluster ions generated by discharge plasma. *Sharp Tech J* **86**, 10–15, (2003).
38. Lowen, A. C., Mubareka, S., Steel, J. & Palese, P. Influenza virus transmission is dependent on relative humidity and temperature. *PLoS Pathog* **3**, 1470–1476, (2007).
39. Lowen, A. C., Steel, J., Mubareka, S. & Palese, P. High temperature (30 degrees C) blocks aerosol but not contact transmission of influenza virus. *J Virol* **82**, 5650–5652, (2008).
40. Lowen, A. C. *et al.* Blocking interhost transmission of influenza virus by vaccination in the guinea pig model. *J Virol* **83**, 2803–2818, (2009).
41. Andersson, J. *et al.* Rapid detection of cytomegalovirus using immune scanning electron microscopy. *Journal of virological methods* **16**, 253–262, (1987).
42. Wetterberg, L. *et al.* Micrometer-sized particles in cerebrospinal fluid (CSF) in patients with schizophrenia. *Neurosci Lett* **329**, 91–95, (2002).
43. Johansson, V. *et al.* Microscopic particles in two fractions of fresh cerebrospinal fluid in twins with schizophrenia or bipolar disorder and in healthy controls. *PloS one* **7**, e45994, (2012).
44. Nordgren, J., Kindberg, E., Lindgren, P. E., Matussek, A. & Svensson, L. Norovirus gastroenteritis outbreak with a secretor-independent susceptibility pattern, Sweden. *Emerging infectious diseases* **16**, 81–87, (2010).
45. San Gabriel, M. C. *et al.* Identification of canine calicivirus capsid protein and its immunoreactivity in western blotting. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* **59**, 97–101, (1997).
46. Nilsson, A. C. *et al.* Longitudinal clearance of seasonal influenza A viral RNA measured by real-time polymerase chain reaction in patients identified at a hospital emergency department. *Scandinavian journal of infectious diseases* **42**, 679–686, (2010).

Erkenning

We erkennen Dr Peter Palese voor het verzorgen van influenza virus strain Pan/99 en antiserum voor deze studie.

Dit werk was ondersteunt door de Swedish Research Council (LS) 320301.

Author Contributions

L.S., H.W., R.N., M.H. and J.N. designed the experiments, R.N. developed the ionizer device, prepared the set-up of the experimental room and performed the scanning electron microscopy, L.S., M.H., J.N. and R.N. performed the experiments, K.O.H. performed the transmission electron microscopy, M.H. and J.N. performed the laboratory analysis, L.S. and H.W. interpreted the data, L.S., H.W., M.H. and J.N. wrote the manuscript.

Additional Information

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Hagbom, M. *et al.* Ionizing air affects influenza virus infectivity and prevents airborne-transmission. *Sci. Rep.* **5**, 11431; doi: 10.1038/srep11431 (2015).



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>