



STABILITEIT VAN RESPIRATOIRE VIRUSSEN IN AEROSOLEN

Programmalijn VI

Projectnummer 060.51323

DATUM

9 september 2025

AUTEURS

Luc Hornstra (TNO), Abilash Ravi (EMC, TNO), Suzanne Mijnhardt (EMC),
Sander Herfst (EMC)

MANAGEMENT SAMENVATTING

Respiratoire ziekteverwekkende virussen zijn een bron van zorg voor de volksgezondheid. Covid-19 heeft laten zien dat een pandemie de maatschappij ontwricht en een enorme druk op de gezondheidszorg veroorzaakt. Kennis over de transmissie van deze virussen via de lucht is essentieel om beter voorbereid te zijn, en pandemieën te kunnen voorkomen.

In de experimenten werd de stabiliteit van verschillende virussen in aerosolen bepaald, om beter het risico van deze virussen door aerogene overdracht te kunnen inschatten. Influenza virus in aerosolen laat gedurende minimaal een half uur geen verlies van infectiviteit zien bij de binnenshuis gebruikelijke relatieve luchtvochtigheden van 40 en 60%. Dit betekent dat het virus in aerosolen na lange tijd in de lucht te hebben doorgebracht nog steeds een ander persoon kan besmetten. De SARS-CoV-2 delta variant laat een iets snellere inactivatie zien van 0,5-1,0 log in 30 min net als humaan parainfluenzavirus 3, humaan metapneumovirus (hMPV) en het respiratoir syncytieel virus (RSV). Opvallend is verder dat in de aanwezigheid van mucus en saliva RSV snel inactieveert. Waar dit door wordt veroorzaakt moet nog verder worden onderzocht.

In deze studie is aangetoond dat alle virussen minimaal korte tijd infectieus blijven in aerosolen, en daarmee overdraagbaar zijn door de lucht, maar dat ieder virus een eigen stabiliteit vertoont. Hoe lang deze virussen infectieus blijven is een combinatie van eigenschappen van het virus zelf, en van omgevingsfactoren die daar een invloed op hebben. De huidige wetenschappelijke consensus stelt dat vrijwel alle respiratoire virussen via de lucht kunnen worden overgedragen van een geïnficeerd individu naar een vatbare gastheer, en de resultaten van deze studie ondersteunen deze consensus.

In dit project hebben TNO, Erasmus MC en RIVM de experimentele aanpak afgestemd, zodat de resultaten, waarbij iedere partner de eigen expertise inbrengt, onderling beter aan elkaar gerelateerd konden worden. Dit opent de mogelijkheid naar een verdere samenwerking om systematisch respiratoire virussen en (omgevings)variabelen betrokken bij de aerogene transmissieroute verder te onderzoeken en zo bij te dragen aan de kennis. Met deze kennis kan adequater worden gereageerd op nieuwe en bestaande respiratoire ziekteverwekkende virussen, en is de samenleving beter beschermt tegen mogelijke pandemieën.

INHOUD

Management samenvatting	2
1 Introductie	4
1.1 Lessen van de COVID-19 pandemie	4
1.2 Transmissie van virussen door de lucht.	5
1.3 Het effect van relatieve luchtvochtigheid op het Influenza virus	5
1.4 Stabiliteit van verschillende SARS-CoV-2 varianten in aerosolen	6
2 Experimenten	7
2.1 Gebruik van de aerosol testkamer voor virusstabiliteitsmetingen	7
2.2 Aanpassing van de aerosol kamer voor relatieve luchtvochtigheidsmetingen	7
2.3 Stabiliteit experimenten met SARS-CoV-2	8
2.4 Overzicht uitgevoerde testen en gebruikte virusstammen	9
3 Resultaten	10
3.1 Evaluatie van de aerosol testkamer na aanpassingen om de RH te controleren	10
3.2 Het bepalen van de stabiliteit van Influenza A-virus subtype H1N1 bij verschillende relatieve luchtvochtigheden	11
3.3 Het bepalen van de stabiliteit van SARS-CoV-2 in de aerosoltestkamer	12
3.4 Stabiliteit van IAV pH1N1, hPIV3, HMPV B2 en RSV in lucht en het effect van medium op virusstabiliteit.	13
4 Conclusie	17
5 Discussie	18
6 Referenties	19

1 INTRODUCTIE

1.1 Lessen van de COVID-19 pandemie

De mensheid wordt voortdurend geconfronteerd met opkomende microbiologische dreigingen, waarbij virussen een prominente rol spelen. Virale pathogenen kunnen zich ontwikkelen tot ziekteverwekkende varianten of als zoönotische agentia overspringen van dierlijke reservoirs naar de mens. Reeds vóór de uitbraak van de COVID-19-pandemie zijn meerdere incidenten gedocumenteerd waarbij nieuwe of gemuteerde virussen in staat bleken menselijke infecties te veroorzaken, soms met fatale afloop (Zaki et al, 2012; Herfst et al, 2018; Fouchier et al, 2004; Department of State Health Services 2024). Dit heeft in de afgelopen eeuw geleid tot 4 grote influenzavirus pandemieën. In het afgelopen jaar alleen al zijn er in de Verenigde Staten 70 laboratorium bevestigde gevallen van zoönotische infecties met H5N1 influenzavirus geregistreerd. Het werkelijke aantal is waarschijnlijk vele malen hoger (Mellis et al, 2024). Gezien de mondiale mobiliteit en de hoge bevolkingsdichtheid in stedelijke gebieden was het dan ook niet onverwacht dat een virus zich snel wereldwijd zou kunnen verspreiden. De COVID-19-pandemie, die eind 2019 in China aanving, bevestigde deze verwachting helaas en illustreerde op indringende wijze de maatschappelijke ontwrichting die een pandemie in de hedendaagse samenleving teweeg kan brengen.

Tijdens de pandemie werd al snel duidelijk dat overheidsinstanties, maar ook de bevolking onvoldoende voorbereid waren op een dergelijke crisis. Hoewel wetenschappers, artsen en virologen werden geconsulteerd, ontbrak het aan robuuste, evidence-based informatie over cruciale aspecten van de virusoverdracht. In de vroege fase van de pandemie was er bijvoorbeeld onduidelijkheid over de transmissieroutes van SARS-CoV-2. Aanvankelijk werd aangenomen dat indirecte transmissie via besmette oppervlakken dominant was, terwijl de mogelijkheid van aerogene overdracht via aerosolen werd onderschat. Het ontbreken van solide wetenschappelijke onderbouwing dwong beleidsmakers tot het nemen van ingrijpende maatregelen met grote maatschappelijke impact op basis van onvolledige gegevens. Dit leidde in sommige gevallen tot ineffectieve interventies en droeg bij aan een afnemend vertrouwen van de bevolking in het overheidsbeleid.

Een belangrijk kennishiaat betreft de relatieve bijdrage van verschillende transmissieroutes van respiratoire virussen aan verspreiding in de populatie: aerogene transmissie, directe overdracht via fysiek contact, en indirecte overdracht via fomieten. De huidige wetenschappelijke consensus stelt dat vrijwel alle respiratoire virussen potentieel via de lucht kunnen worden overgedragen van een geïnfecteerd individu naar een vatbare gastheer, maar voor het ene virus is deze transmissieroute waarschijnlijk belangrijker dan voor het andere (Kutter et al, 2018). Om de volksgezondheidsimpact van deze transmissieroute adequaat te kunnen inschatten, is kwantitatieve dosis-responsinformatie essentieel. Dit vereist inzicht in de minimale infectieuze dosis die nodig is om een infectie te initiëren bij blootgestelde individuen, hetgeen cruciaal is voor risicobeoordeling en het ontwikkelen van effectieve preventiestrategieën, zoals bijvoorbeeld door het aanpassen van ventilatie. Hiervoor is inzicht in de inactivatiekarakteristieken van de verschillende virussen noodzakelijk.

1.2 Transmissie van virussen door de lucht.

Respiratoire virussen worden verspreid via deeltjes die vrijkomen bij ademen, spreken, zingen, hoesten niezen, etc.. Deze deeltjes variëren in grootte van grotere druppels, die snel neerslaan onder invloed van de zwaartekracht, tot kleinere aerosolen die langdurig aanwezig kunnen blijven in de lucht. Van veel virussen is echter onvoldoende bekend hoe lang zij, eenmaal aanwezig in een aerosol, onder verschillende omgevingsomstandigheden infectieus blijven (inactivatiekarakteristiek). Dit gebrek aan kennis belemmert een accurate inschatting van de risico's die gepaard gaan met aerogene transmissie. De infectiviteit van virussen in aerosolen wordt beïnvloed door een complex samenspel van factoren. Aerosolen ontstaan in verschillende delen van het respiratoire systeem, en hun samenstelling varieert afhankelijk van hun oorsprong—bijvoorbeeld uit de longen versus de keelholte. Deze verschillen in samenstelling zijn van invloed op de stabiliteit van het virus in de aerosol, maar er is nog erg weinig informatie hierover.

Na uitscheiding worden aerosolen blootgesteld aan omgevingsfactoren die hun fysisch-chemische eigenschappen snel kunnen veranderen. Luchtvochtigheid speelt hierin een cruciale rol, met name door de invloed op de verdampingssnelheid. Bij lage relatieve luchtvochtigheid verdampen aerosolen snel, wat leidt tot een afname in diameter binnen enkele seconden, soms resulterend in volledig uitgedroogde deeltjes. Bij hoge luchtvochtigheid verloopt de verdamping trager of blijft zelfs uit, waardoor de deeltjes hun oorspronkelijke grootte behouden of zelfs in grootte toenemen. Verdamping beïnvloedt ook de interne pH van aerosolen. Naast water verdampt ook bicarbonaat (HCO_3^-), wat leidt tot een stijging van de pH richting basische waarden. De snelheid waarmee HCO_3^- verdampt, wordt mede bepaald door de omgevingsconcentratie van CO_2 . Voor SARS-CoV-2 is aangetoond dat het virus langer infectieus blijft in een omgeving met verhoogde CO_2 -concentratie (>800 ppm), vermoedelijk doordat de verminderde verdamping van HCO_3^- de stijging van de interne pH afremt (Haddrell et al, 2024). Dit wijst op een mogelijk beschermend effect van een hogere CO_2 -concentratie op de virale stabiliteit van SARS-CoV-2 in aerosolen. Of de CO_2 -concentratie in de lucht ook een effect heeft op de stabiliteit van andere respiratoire virussen is tot op heden niet onderzocht. Op dit moment is van respiratoire virussen onvoldoende bekend hoe de samenstelling van een aerosol, de verdamping en de daarmee gepaard gaande veranderingen in fysisch-chemische eigenschappen, evenals de invloed van omgevingscondities een positief of negatief effect kunnen hebben op de overleving van deze respiratoire virussen. Ook de eigen viruseigenschappen spelen een belangrijke rol, en de respons van virussen op bovengenoemde parameters is virusspecifiek. Verdere experimentele studies zijn noodzakelijk om deze dynamiek beter te begrijpen en om de risico's van aerogene transmissie van respiratoire virussen nauwkeuriger te kunnen modelleren.

1.3 Het effect van relatieve luchtvochtigheid op het Influenza virus

Influenza is een respiratoir virus dat kan worden overgedragen via de aerogene route. Het effect van relatieve luchtvochtigheid (RV) op de stabiliteit van influenzavirus in aerosolen is in verschillende

publicaties beschreven, maar desondanks nog niet opgehelderd. Een belangrijke reden is het opmerkelijke u of v vormige patroon dat wordt beschreven, met de hoogste inactivatie van influenzavirus bij gemiddelde RV, en een betere overleving in aerosolen bij juist een hoge of lage RV. Zo heeft Motos et al beschreven dat de t_{99} tijd (de tijd die het kost om een reductie te verkrijgen van infectieus virus van 99% oftewel 2 log) bij een RV van 10% 12 uur bedroeg, terwijl die tijd bij een RV van 55% nog maar 20 minuten bedroeg (Motos et al, 2024). Bij een RV van 95% was deze tijd weer opgelopen tot 35 minuten. Vergelijkbare data werden eerder al verkregen met studies in cavia's, waarbij virusoverdracht via de lucht van donor naar ontvanger dieren werd onderzocht onder verschillende klimatologische omstandigheden (Lowen et al, 2007). In deze studie werd een vergelijkbaar U patroon gevonden voor de efficiëntie van luchtverdraagbaarheid, maar dit bleek wel sterk afhankelijk van de temperatuur.

1.4 Stabiliteit van verschillende SARS-CoV-2 varianten in aerosolen

Aerogene transmissie via inademing van met virusbevattende aerosolen vormt een van de belangrijkste verspreidingsroutes van SARS-CoV-2. Omgevingsfactoren zijn van invloed op de fysisch-chemische eigenschappen van de aerosol, en dit is weer van invloed op de snelheid van verlies van infectiviteit van virussen in het aerosol.

Zo is beschreven dat een hoge CO₂-concentratie in de omgeving resulteert in een hogere stabiliteit van SARS-CoV-2 in het aerosol. Het stabiliserende effect van CO₂ op SARS-CoV-2 lijkt verband te houden met de invloed ervan op de pH van de aerosolen. Hogere CO₂-concentraties beperken het verlies van bicarbonaat uit aerosoldeeltjes, waardoor de stijging van de pH wordt geremd en voorkomen wordt dat het aerosol alkalisch wordt. Hierdoor kan een verhoogde CO₂-concentratie de virusstabiliteit in de tijd bevorderen door de duur van blootstelling aan hoge pH-waarden te verkorten (Hadrell et al; 2024).

Ook een lage relatieve luchtvochtigheid (circa 40%) draagt bij aan het verlies van infectieuze virusdeeltjes. Zo treedt bij een relatieve luchtvochtigheid van 40% een snelle virale afbraak op van ongeveer 0,5 log binnen slechts 5 seconden, terwijl de afbraaksnelheden op latere tijdstippen (1, 5 en 10 minuten) bij 40% RV vergelijkbaar zijn met die bij 90% RV (Oswin et al; 2022)

Deze bevindingen zijn verkregen met behulp van de CELEBS-levitator, een apparaat dat gebruikmaakt van een elektrodynamisch veld om geladen aerosol deeltjes in de lucht zwevend vast te houden voor nauwkeurige analyse.

2 EXPERIMENTEN

2.1 Gebruik van de aerosol testkamer voor virusstabiliteitsmetingen

Bij Erasmus MC was voorafgaande aan het P3Venti project al een aerosolkamer ontworpen waarin artificieel geaerosoliseerde virussen voor een vooraf bepaalde tijdsperiode in de lucht gehouden kunnen worden, gevolgd door opvangen met een luchtmonsteringsapparaat, in dit geval de impinger (Fig 1). Honderd microliter van een virussuspensie wordt verneveld met een Aeroneb solo in de aerosolkamer, waarna de aerosolen 1 minuut worden gecirculeerd door de kamer met behulp van een ventilator. Daarna wordt de ventilator uitgezet, en worden de virusbevattende aerosolen voor een bepaalde tijd in de lucht gehouden. Na deze periode worden beide kogelkranen (in rood op de foto) opengezet en wordt de impinger 5 minuten aangezet om de virusbevattende aerosolen weer op te vangen. Vervolgens wordt in deze luchtmonsters met behulp van een virusspecifieke qPCR de totale hoeveelheid opgevangen virus bepaald, en met behulp van plaque assays (pfu: plaque forming units) de hoeveelheid infectieus virus.

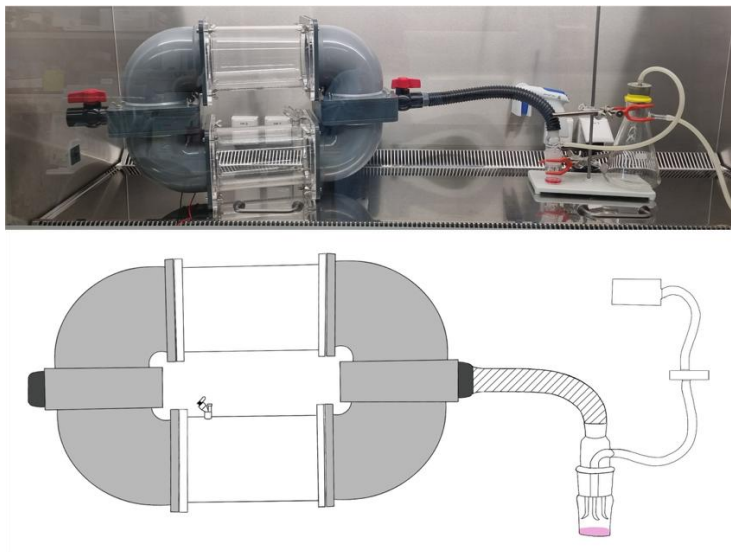
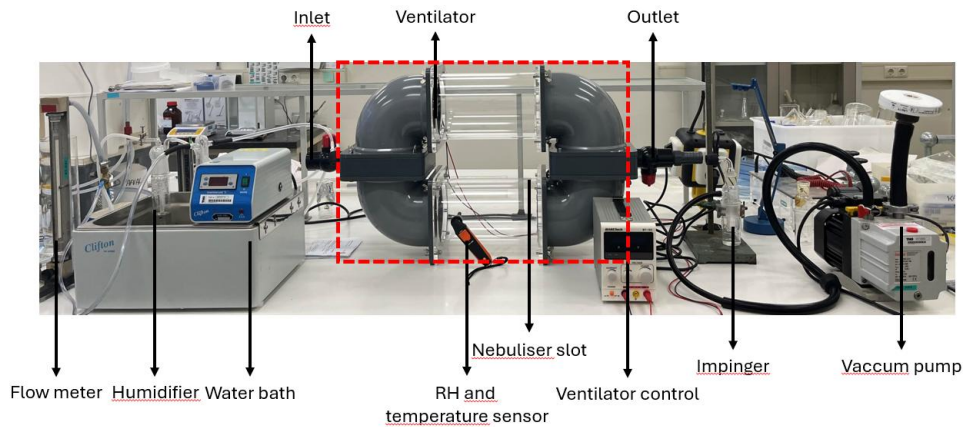


Fig 1: In-huis ontwikkelde aerosolkamer om de infectiviteit van respiratoire virussen in de lucht te bestuderen.

2.2 Aanpassing van de aerosol kamer voor relatieve luchtvochtigheidsmetingen

Bij TNO zijn experimenten uitgevoerd waarbij het effect van de relatieve luchtvochtigheid (RV) op de stabiliteit van Influenza A virus H1N1 in aerosolen is onderzocht. Hiervoor is aerosoltestkamer aangepast om een nauwkeurige regeling van de relatieve luchtvochtigheid (RV) tijdens experimenten mogelijk te maken (Figuur 2). Voor het verhogen van de RV is een luchtbevochtiger geïntegreerd in het systeem, waarmee vochtige lucht direct in de kamer wordt ingebracht. Omgekeerd is een aansluiting voor geperste droge lucht toegevoegd om de RV te kunnen verlagen wanneer dat nodig is.

Ter bewaking en handhaving van de gewenste luchtvochtigheid is een RV-sensor geplaatst in de directe nabijheid van de vernevelaar. Deze positionering maakt real-time metingen mogelijk van de RH op het punt van aerosol generatie, wat een betrouwbare weergave biedt van de omgevingscondities die direct van invloed zijn op de vorming en stabiliteit van aerosolen.



Figuur 2: De aerosol testkamer met de aanpassingen die noodzakelijk zijn voor het uitvoeren van experimenten bij een gecontroleerde luchtvochtigheid.

2.3 Stabiliteit experimenten met SARS-CoV-2

Met behulp van de aerosoltestkamer (Figuur 1) is een eerste beoordeling uitgevoerd om vast te stellen of de aerostabiliteit van SARS-CoV-2 onder gecontroleerde omstandigheden kan worden geanalyseerd. Voor deze verkennende studie is gekozen voor de Delta-variant, waarvan eerder is gerapporteerd dat deze een grotere aerostabiliteit vertoont dan de Omikron-variant (Bushmaker et al, 2023). In totaal werd 100 μL van een SARS-CoV-2 Delta-variant (B.1.617.2) stockoplossing met een concentratie van $8,5 \times 10^6$ PFU/mL verneveld met behulp van een Aerogen-vernevelaar. Geaerosoliseerde virusdeeltjes werden op vooraf gedefinieerde tijdstippen (1, 10 en 30 minuten na suspensie in lucht) uit de kamer verzameld met een impinger en vergeleken met een directe bemonstering die onmiddellijk na verneveling werd uitgevoerd (ongeveer 20 seconden post-verneveling). Daarnaast werd de virusconcentratie van de stock bepaald om de maximale concentratie infectieus virus te bepalen. Na afloop van de bemonstering op 30 minuten werd de kamer gespoeld met PBS en opnieuw bemonsterd met een impinger om na te gaan of residuele afkomstig van de wand van de kamer virusdeeltjes aanwezig waren. Alle verzamelde monsters werden geanalyseerd met behulp van TaqMan-PCR voor kwantificering van het totale virale RNA, en plaque-assays voor bepaling van de hoeveelheid infectieus virus.

2.4 Overzicht uitgevoerde testen en gebruikte virusstammen

Bij Erasmus MC zijn met de onder 2.3 beschreven opstelling stabiliteitstesten gedaan met IAV pH1N1, hPIV3, HMPV B2 en RSV A11, waarbij de invloed van verschillende aerosol media zoals virus culture medium, humaan mucus en saliva op de overleving van virussen is onderzocht.

Daarnaast zijn bij Erasmus MC experimenten uitgevoerd om de stabiliteit van SARS-CoV-2 delta variant te bepalen.

Bij TNO is het effect van een RV van 40, 60 en 90% bepaald op de stabiliteit van influenza virus in aerosolen. Deze experimenten zijn in vijfvoud uitgevoerd.

Tabel 1: Gebruikte virusstammen

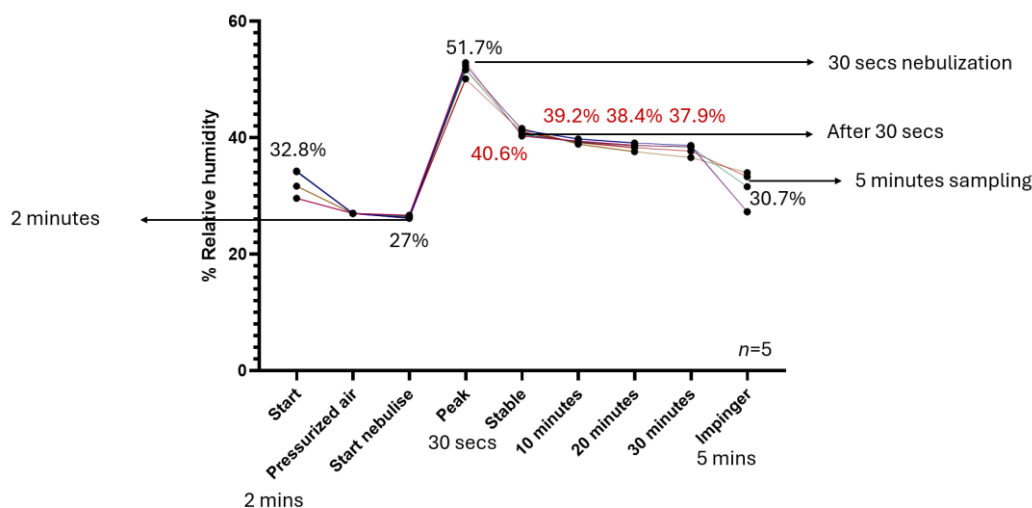
Virus (afkorting)	Virusnaam	Organisatie	
SARS-CoV-2	SARS-CoV-2 delta	EMC	
IAV pH1N1	influenza A Virus	EMC en TNO	
hPIV3	humaan parainfluenzavirus 3	EMC	
HMPV	humaan metapneumovirus	EMC	
RSV	respiratoir syncytieel virus	EMC	

3 RESULTATEN

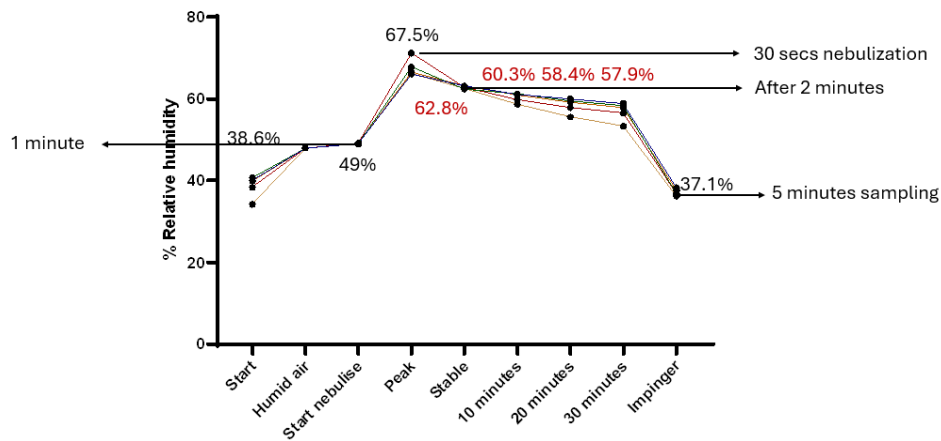
3.1 Evaluatie van de aerosol testkamer na aanpassingen om de RH te controleren

Als eerste stap is onderzocht of de experimentele aerosoltestkamer betrouwbaar in staat is om vooraf ingestelde waarden voor relatieve luchtvochtigheid (RV) te handhaven: 40%, 60% (tot 30 minuten), en 90% (tot 60 minuten). Tijdens deze tests werd waargenomen dat verneveling van 100 μL vloeistof leidde tot een onmiddellijke stijging van de basis-RV in de kamer, als gevolg van de toegevoegde vochtigheid. Om dit effect te compenseren en de beoogde RV-waarden nauwkeurig te bereiken, werd de initiële RV vooraf aangepast naar iets lagere waarden vóór aanvang van de verneveling. Deze voorafgaande kalibratie maakte het mogelijk om de gewenste RV-condities gedurende de volledige duur van elk experiment te bereiken en te behouden. De specifieke RV-waarden die voor elke doelconditie zijn gerealiseerd en gehandhaafd, worden hieronder nader gespecificeerd.

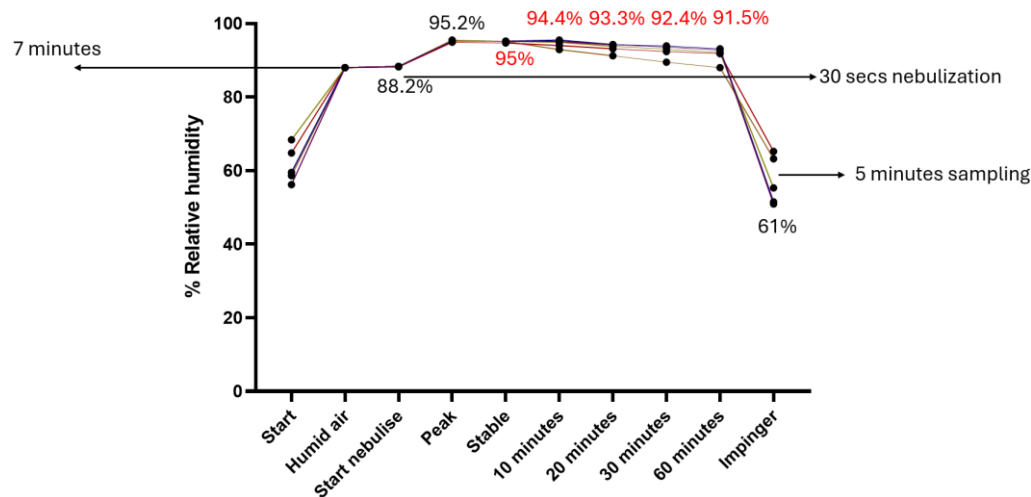
40%



60%



90%



Figuur 3: De gemeten relatieve luchtvochtigheid (RV) in de aerosol kamer bij een beoogde RG van 40, 60 en 90%.

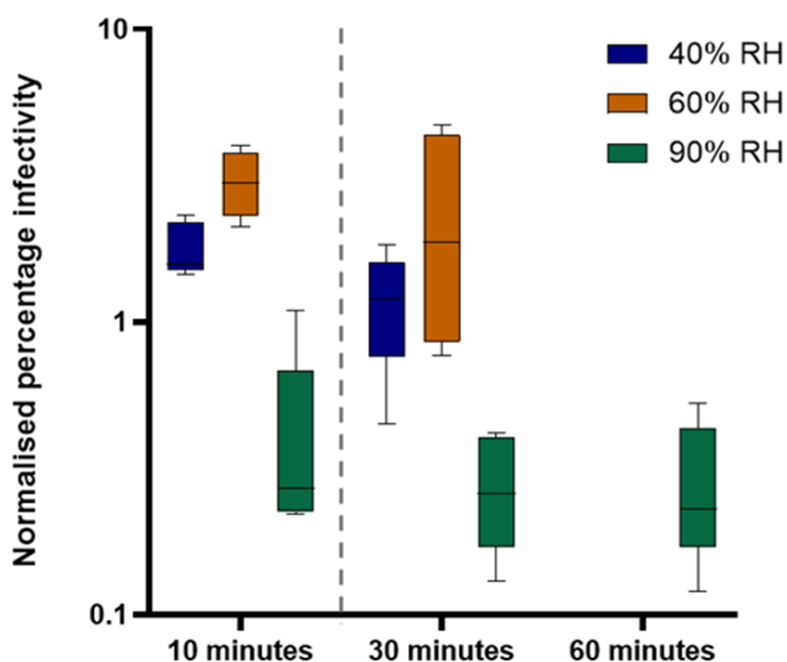
3.2 Het bepalen van de stabiliteit van Influenza A-virus subtype H1N1 bij verschillende relatieve luchtvochtigheden

Voor deze experimenten is een klinisch relevante influenzastam gebruikt om vergelijkingen mogelijk te maken die beter aansluiten bij reële transmissiescenario's. Voor deze experimenten is 100 µL van H1N1 influenza A-virus A/Netherlands/602/2009 geaerosoliseerd, met een concentratie van $6,4 \times 10^7$ PFU/ml. De geaerosoliseerde virusdeeltjes werden, na de vereiste verblijftijd uit de testkamer teruggewonnen met behulp van een impinger. Vervolgens is het totaal aantal virussen, en het infectieuze deel van de viruspopulatie bepaald.

De gegevens zijn genormaliseerd op basis van het totale volume van het met de impinger verzamelde aerosolmonster, het volume lucht dat op elk tijdstip werd bemonsterd, en het percentage infectieus

virus aanwezig in de stockcontrole op dezelfde experimentele dag. Hierdoor kunnen de resultaten onderling met elkaar worden vergeleken.

Zoals geïllustreerd in onderstaande figuur 4, was er geen duidelijke afname van infectieus virus bij 40% en 60% RV. Wel werd een significante afname in het percentage infectieuze virusdeeltjes waargenomen bij een relatieve luchtvochtigheid (RH) van 90% na 10, 30 en 60 minuten.



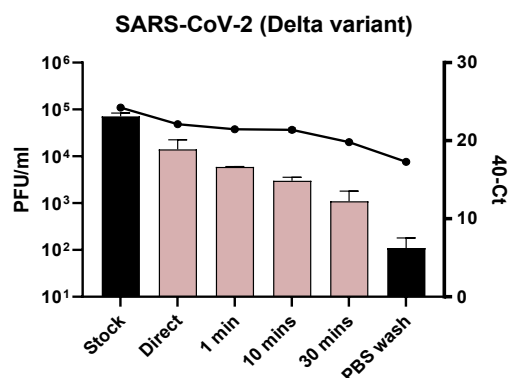
Figuur 4: Het effect van de relatieve luchtvochtigheid van 40, 60 en 90% op de stabiliteit van H1N1 influenza virus bij drie verschillende verblijftijden.

Hieruit kan worden geconcludeerd dat H1N1 influenza virus subtype H1N1 onder de meest gangbare RV condities erg stabiel is wanneer het zich in een aerosol in de lucht bevindt. Dat betekent ook dat het virus nog lang in een ruimte infectieus aanwezig blijft, en dus dan in staat is om anderen te besmetten.

3.3 Het bepalen van de stabiliteit van SARS-CoV-2 in de aerosoltestkamer

Het bepalen van de aerostabiliteit van SARS-CoV-2 is uitgevoerd in de aerosoltestkamer. Als gevolg van het aerosoliseringsproces met de Aerogen-vernevelaar en/of de verzameling via de impinger, treedt een reductie van ongeveer een halve log in het totale aantal virusdeeltjes op. Zoals weergegeven in onderstaande figuur, neemt de infectiviteit van SARS-CoV-2 (delta) geleidelijk af met meetbare reducties na 1, 10 en 30 minuten aerosolcirculatie tot ongeveer 1,5 log na 30 min.

Daarnaast werd na afloop van het experiment een spoeling van de kamer met PBS uitgevoerd, waarbij residuele virusdeeltjes werden aangetroffen ($\sim 10^2$ PFU/mL). Dit wijst erop dat een kleine hoeveelheid virus mogelijk aan de oppervlakken van de kamer blijft hechten na aerosolisatie. Dit is de laatste kolom in figuur 5, maar is niet van invloed op de resultaten.



Figuur 5: De stabiliteit van SARS-CoV-2 delta variant gemeten in de aerosol testkamer. De zwarte lijn geeft het maximaal aantal aanwezige virusdeeltjes aan, gemeten met Q-PCR, en het aantal infectieuze virussen is weergegeven in kolommen in pfu/ml.

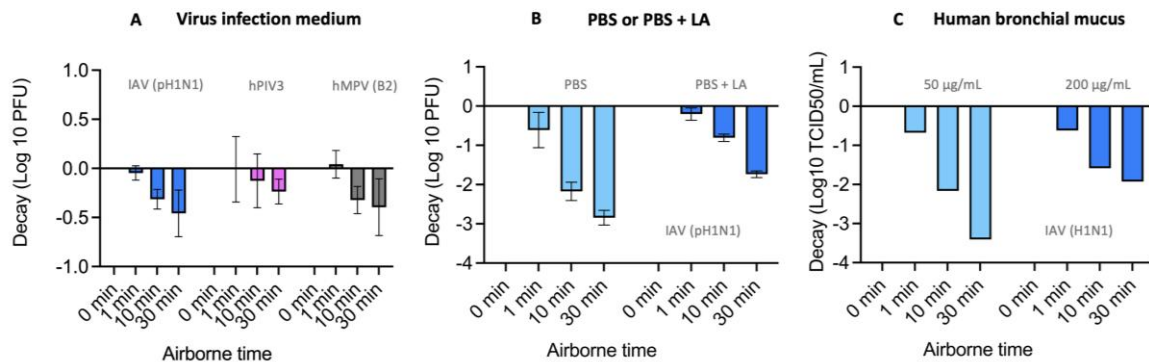
Deze experimenten zullen in een ander project worden voortgezet. Daarvoor zijn stocks van SARS-CoV-2-varianten Omikron (JN.1), Omikron BA.1.1.529, Omikron BA.2.86.1, Alpha (B.1.1.7, VK), Beta (Zuid-Afrikaanse variant) en D614G BavPat-1 beschikbaar, maar nog niet vergeleken met SARS-CoV-2 delta. Een vergelijkende analyse kan bijdragen aan het verklaren waarom bepaalde varianten, zoals Omikron JN.1, Alpha, Beta en D614G BavPat-1, zich snel hebben kunnen verspreiden, terwijl andere, zoals Omikron BA.1.1.529 en BA.2.86.1, hierin minder succesvol waren.

3.4 Stabiliteit van IAV pH1N1, hPIV3, HMPV B2 en RSV in lucht en het effect van medium op virusstabiliteit.

Veel onderzoek naar de infectiviteit van virussen in de lucht wordt gedaan met virussen geaerosoliseerd in het medium waarin ze gekweekt zijn. Dit medium bevat supplementen om een goede celgroei te garanderen, maar deze supplementen -en het medium- kunnen een (de)stabiliserend effect hebben op de virusinfectiviteit.

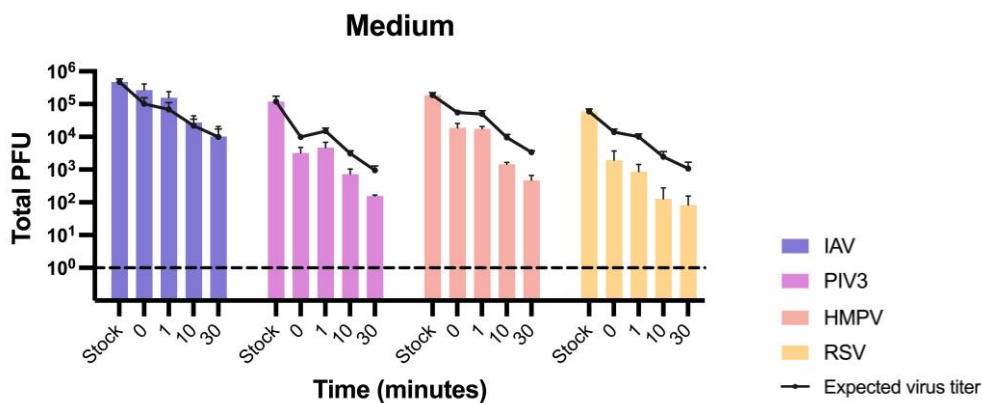
In een eerste experiment zijn influenza A Virus (IAV pH1N1), humaan parainfluenzavirus 3 (hPIV3) en humaan metapneumovirus (hMPV B2) in infectiemedium geaerosoliseerd en voor 1, 10 of 30 minuten in de lucht gehouden, gevolgd door collectie met een impinger. Voor alle virussen is het verlies (virus decay) gemeten ten opzichte van de verwachte hoeveelheid infectieus virus (gecorrigeerd voor virusverlies door zogenaamde 'tubing losses' en precipitatie op de aerosolkamer), en gerelateerd aan het totaal aantal virusdeeltjes berekend met behulp van totaal RNA en qPCR (panel A). Voor de drie virussen is de virus decay over vier tijdstippen gedurende een half uur bepaald, met als resultaat een maximaal verlies van log 0.5 plaque forming units (pfu). In een vervolgonderzoek is het effect van het infectiemedium op de virusinfectiviteit bepaald, en is influenza A-virus geaerosoliseerd in Phosphate-Buffered Saline (PBS). Dit resulteerde in een verlies van log 3 over 30 minuten, wat deels kon worden gecompenseerd door toevoeging van lactalbumine (panel B). Dit betekent dat influenza A virus in PBS

snel infectiviteit verliest, maar dat de aanwezigheid van eiwit deze infectiviteit gedeeltelijk kan behouden. Dit blijkt ook uit een volgend experiment waarin de aanwezigheid van een hoge concentratie mucus (200ug/ml) -gemeten aan de hand van totaal eiwitgehalte- in de aerosolen een lagere infectiviteitsverlies oplevert dan een lagere mucus concentratie (50ug/ml) (Panel C) (Figuur 6).



Figuur 6: Het verlies van infectiviteit van IAV (pH1N1), hPIV3 en hMPV (B2) in virus infectie medium (Panel A). Het effect van lactalbumine op het verlies van infectiviteit van IAV (pH1N1) (Panel B). Het effect van 2 verschillende concentraties mucus op het verlies van infectiviteit van IAV (pH1N1) (Panel C).

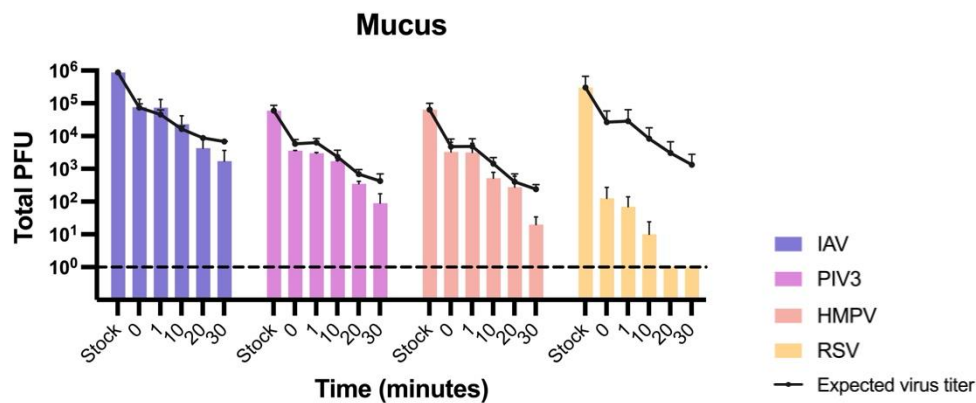
Vanwege het geobserveerde aanzienlijke effect van het aerosoliseringsmedium op het behoud van virale infectiviteit in de lucht, zijn experimenten vervolgens uitgevoerd met vier verschillende respiratoire virussen (influenza A Virus (IAV pH1N1), humaan parainfluenzavirus 3 (hPIV3), humaan metapneumovirus (hMPV) en respiratoir syncytieel virus (RSV) in virusspecifieke vernevelvloeistoffen. Eerst zijn de virussen in drievoud verneveld in infectiemedium. De weergave in de figuren is nu anders dan in figuur 6. De zwarte lijn geeft de maximale hoeveelheid infectieus virus aan die theoretisch opgevangen kon worden, gebaseerd op de hoeveelheid RNA die werd gemeten met qPCR. De staven geven vervolgens aan hoeveel infectieus virus daadwerkelijk kon worden aangetoond met behulp van een plaque-assay. Het verschil tussen de zwarte lijn en de staven laat zien hoeveel infectieus virus in de loop van de tijd is verloren gegaan (Figuur 7).



Figuur 7: Het verlies van infectiviteit van IAV, PIV3 hMPV en RSV in virus infectie medium. De zwarte lijn geeft het totaal aantal virussen weer, en de kolommen laten het totaal aantal infectieuze virussen zien.

Uit dit experiment blijkt dat IAV zeer stabiel is in de lucht en dat de drie paramyxovirussen over een half uur max één log aan virus infectiviteit verliezen.

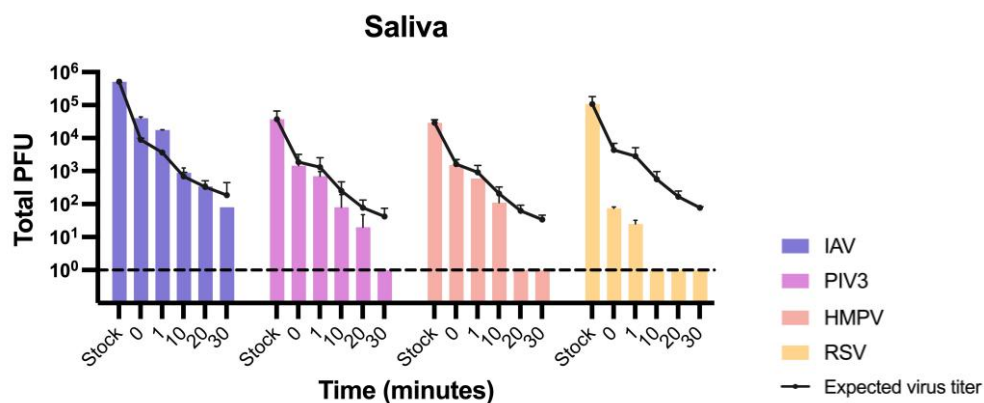
Vervolgens zijn de virussen verneveld in een mucussuspensie in PBS (Figuur 8).



Figuur 8: Het verlies van infectiviteit van IAV, PIV3 hMPV en RSV in mucus. De zwarte lijn geeft het totaal aantal virussen weer, en de kolommen laten het totaal aantal infectieuze virussen zien.

In de mucussuspensie bleken IAV, PIV3 en hMPV hun infectiviteit te behouden, met een gering verlies aan infectiviteit na 30 minuten. Echter, voor RSV werd al een groot verlies van 2 log gevonden na het direct bemonsteren van virus (tijdstip 0), dat wil zeggen zonder circulatie en verblijftijd in de aerosolkamer. Dit verlies loopt verder op naar >3 log na 10 minuten verblijftijd in de aerosolkamer. RSV is in een mucusbevattende oplossing minder stabiel dan in het virus infectiemedium.

Als laatste werd het experiment herhaald met een commercieel verkregen speeksel dat is verzameld van gezonde donoren en gepooled (Figuur 9).



Figuur 9: Het verlies van infectiviteit van IAV, PIV3 hMPV en RSV in saliva. De zwarte lijn geeft het totaal aantal virussen weer, en de kolommen laten het totaal aantal infectieuze virussen zien.

In het speeksel was IAV wederom het meest stabiel, met een minimaal verlies van infectiviteit na 30 minuten. PIV3 verliest ongeveer 2 log aan infectiviteit na 30 minuten, terwijl HMPV ongeveer 2 log aan infectiviteit verliest na 20 minuten. Voor RSV was het verlies van infectiviteit ongeveer vergelijkbaar met het verlies in de mucus oplossing, met 2 log verlies na 0 en 1 minuut en >3 log na 10 minuten. RSV blijkt een zeer onstabiel virus te zijn wanneer het aanwezig is in mucus of saliva bevattende aerosolen.

4 CONCLUSIE

Tijdens P3 venti zijn experimenten uitgevoerd waarin de stabiliteit van een aantal virussen is onderzocht tijdens een passagefase door de lucht. Hierbij is effect van relatieve luchtvochtigheid op influenza virus onderzocht, en bleek dat influenza een stabiel virus is dat nagenoeg geen verlies laat zien bij binnenshuis gebruikelijke relatieve luchtvochtigheid van 40 en 60%. Bij een luchtvochtigheid van 90% was IAV minder stabiel, en liet een verlies van infectiviteit zien van ongeveer 1 log. Opvallend was verder dat metingen lieten zien dat de stabiliteit van influenza beter is in virusmedium waaraan lactalbumine of mucus is toegevoegd. Dit is een indicatie dat het virus stabiel is in natuurlijk mucus, zoals dat door besmette personen wordt uitgescheiden. Uit de dosis response informatie die is afgeleid vanuit de literatuur blijkt dat influenza een wat hogere dosis nodig heeft om een besmetting te kunnen veroorzaken dan adenovirus en rhinovirus, waar ongeveer 10 infectieuze virussen al een besmetting kunnen veroorzaken.

Een eerste meetreeks met SARS-CoV-2 delta laat zien dat SARS-CoV-2 minder stabiel is dan influenza virus, en een afname laat zien van infectieuze virussen van ongeveer 0,5-1,0 log. Het is bekend dat de CO₂ concentratie in de omgeving een belangrijke rol speelt bij de snelheid van afname van infectiviteit van SARS-CoV-2. De invloed van andere parameters zoals RV is nog niet goed onderzocht. Omdat de dosis response informatie van SARS-CoV-2 nog erg onduidelijk is, is het lastig om de impact hiervan op de overdracht van SARS-CoV-2 te duiden. Wel is aan te nemen dat overdracht via de lucht gemakkelijk kan plaatsvinden, en dit wordt ondersteunt door publicaties waarin overdracht van SARS-CoV-2 wordt beschreven.

In een vergelijkingsreeks met influenza A Virus (IAV pH1N1), humaan parainfluenzavirus 3 (hPIV3), humaan metapneumovirus (hMPV) en respiratoir syncytieel virus (RSV) werd waargenomen dat het influenza virus van deze virussen het meest stabiel is na aerogeen transport. hPIV3, hMPV en RSV laten na een half uur verblijftijd in de aerosolkamer meer verlies van infectiviteit zien. Opvallend hier is dat een experimenten met mucus en saliva vooral bij RSV een groot en snel verlies van infectiviteit laat zien. Deze waarneming, en een mogelijke oorzaak daarvan moet nog verder worden onderzocht.

Deze experimenten die zijn beschreven in deze rapportage laten zien dat een gestructureerde aanpak informatie oplevert over hoe lang virussen in aerosolen infectieus kunnen blijven. Ook laten deze experimenten zien dat omgevingsfactoren van invloed zijn hierop, en dat ook de viruseigenschappen per virus verschillen. Dat betekent dat resultaten niet algemeen toepasbaar zijn, maar per virus en conditie moeten worden onderzocht. De huidige wetenschappelijke consensus stelt dat vrijwel alle respiratoire virussen potentieel via de lucht kunnen worden overgedragen van een geïnfecteerd individu naar een vatbare gastheer, waardoor meer gedegen kennis over deze transmissieroute essentieel is om effectief maatregelen te kunnen nemen om besmettingen via deze route te reduceren.

5 DISCUSSIE

Ten tijde van de COVID-19 pandemie werd snel duidelijk dat cruciale informatie over hoe het virus werd overgedragen van mens op mens ontbrak. Lange tijd werd beweerd dat de aerogene transmissieroute niet van belang was, en het virus door middel van direct contact en oppervlakten werd overgedragen.

P3 venti heeft een start gemaakt met een systematische aanpak om de aerogene stabiliteit van respiratoire virussen te bepalen. Bij aanvang van het project werd duidelijk dat onderzoek naar virussen in aerosolen te maken heeft met enorm veel experimentele variabelen. Dit betreft de fase aerosolisatie; waar het type aerosolgenerator, het medium en het virus van belang zijn. Het type aerosol generator kan bijvoorbeeld van invloed zijn op het virus, en het beschadigen, waardoor een deel van de viruspopulatie zijn infectiviteit verliest als gevolg van de aerosol generatie. Vervolgens worden de gegenereerde aerosolen in de lucht gebracht en gehouden gedurende een vooraf vastgestelde tijd. Ook hiervoor zijn verschillende systemen mogelijk, en tijdens deze studie is vooral gebruik gemaakt van de door Erasmus MC ontwikkelde circulaire aerosol testkamer. Daarnaast is een aerosol levitator ontwikkeld, en is bij TNO een 12 m³ aerosol testkamer voorhanden. Veel in de literatuur beschreven experimenten zijn uitgevoerd met een rotating drum systeem. Voor het opvangen van de aerosolen wordt bij de meeste testopstellingen gebruik gemaakt van een impinger. Deze ‘vangt’ de aerosolen door middel van vloeistof, en daarna wordt in de vloeistof het totaal aantal en het infectieus aantal virussen bepaald. Virussen kunnen ook uit de lucht worden verzameld door middel van cycloon collectors, zoals de NIOSH en de Coriolis, collectors met filters, of die werken op basis van condensatie van in de lucht aanwezige deeltjes (Biospot Vivas). Ook deze apparaten hebben een impact op de infectiviteit van de te verzamelen virussen. Om deze redenen is in samenwerking met Erasmus MC en RIVM gezocht naar een gezamenlijke setup voor de experimenten. Op dit moment hebben Erasmus MC en TNO de experimenten afgestemd rondom het door EMC ontworpen aerosol testsysteem. TNO heeft dit uitgerust met de mogelijkheid om experimenten uit te voeren onder verschillende relatieve luchtvochtigheidscondities.

Door deze samenwerking is het nu mogelijk om op een gestandaardiseerde manier de stabiliteit van virussen in aerosolen te bestuderen. Dit rapport beschrijft de 1^e resultaten van deze aanpak. Op deze wijze kan in mogelijke toekomstige projecten volgens dezelfde systematische aanpak de stabiliteit van verschillende soorten virussen onder verschillende omgevingscondities worden bepaald. Het is aan te bevelen om een (nationale) database aan te leggen met daarin de inactivatiekarakteristieken van bekende respiratoire virussen met als variabelen tijd, temperatuur, luchtvochtigheid, CO₂ concentratie en andere relevante parameters volgens de werkwijze ontwikkeld door Erasmus MC, RIVM en TNO.

Dit biedt de mogelijkheid om bij een toekomstig ziekteverwekkend respiratoir virus snel een juiste inschatting te maken over de luchtstabiliteit van hiervan, om zo feitelijk onderbouwde interventiemaatregelen te kunnen adviseren, en een toekomstige uitbraak effectief onder controle te kunnen houden.

6 REFERENCES

Zaki, Ali Moh, Sander van Boheemen, Theo M. Bestebroer, Albert D.M.E. Osterhaus, and Ron A.M. Fouchier. 2012. Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia, n engl j med 367;19 nejm.1814 org november 8, 2012

Herfst S, Mok CKP, van den Brand JMA, van der Vliet S, Rosu ME, Spronken MI, Yang Z, de Meulder D, Lexmond P, Bestebroer TM, Peiris JSM, Fouchier RAM, Richard M. 2018. Human clade 2.3.4.4 A/H5N6 influenza virus lacks mammalian adaptation markers and does not transmit via the airborne route between ferrets. mSphere 3:e00405-17. [https://doi.org/ 10.1128/mSphere.00405-17](https://doi.org/10.1128/mSphere.00405-17).

Fouchier Ron A.M, Peter M. Schneeberger, Frans W. Rozendaal, Jan M. Broekman, Stiena A. G. Kemink, Vincent Munster, Thijs Kuiken, Guus F. Rimmelzwaan, Martin Schutten, Gerard J. J. van Doornum, Guus Koch, Arnold Bosman, Marion Koopmans, and Albert D. M. E. Osterhaus. 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome PNAS, February 3, 2004 vol. 101 no. 5 1356–1361

Department of State Health Services 2024; [DSHS reports first human case of avian influenza in Texas | Texas DSHS](#)

Mellis AM, Coyle J, Marshall KE, et al. Serologic Evidence of Recent Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5) Virus Among Dairy Workers — Michigan and Colorado, June–August 2024. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2024;73:1004–1009. DOI: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm7344a3>

Kutter Jasmin S, Monique I Spronken, Pieter L Fraaij, Ron AM Fouchier and Sander Herfst. (2018). Transmission routes of respiratory viruses among Humans. Current Opinion in Virology 2018, 28:142–151

Haddrell Allen, HenryOswin, Mara Otero-Fernandez, Joshua F. Robinson, Tristan Cogan, Robert Alexander, Jamie F. S. Mann, Darryl Hill, Adam Finn, Andrew D. Davidson, Jonathan P. Reid. (2024). Ambient carbon dioxide concentration correlates with SARS-CoV-2 aerostability and infection risk. Nature Communications 15:3487

Motos G, Schaub A, David SC, Costa L, Terrettaz C, Kaltsonoudis C, Glas I, Klein LK, Bluvstein N, Luo B, Violaki K, Pohl MO, Hugentobler W, Krieger UK, Pandis SN, Stertz S, Peter T, Kohn T and Nenes A (2024). Dependence of aerosol-borne influenza A virus infectivity on relative humidity and aerosol composition. Front. Microbiol. 15:1484992. doi: 10.3389/fmicb.2024.1484992

Lowen Anice C., Samira Mubareka, John Steel1, Peter Palese. 2007. Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. PLoS Pathogens October 2007 | Volume 3 | Issue 10 | e151

Oswin, Henry P, Allen E. Haddrell, Mara Otero-Fernandez, Jamie F. S. Mann, Tristan A. Cogan, Thomas G. Hilditch, Jianghan Tian, Daniel A. Hardy, Darryl J. Hill, Adam Finn, Andrew D. Davidson and Jonathan P. Reid. 2022. The dynamics of SARS-CoV-2 infectivity with changes in aerosol microenvironment. PNAS 2022 Vol. 119 No. 27 <https://doi.org/10.1073/pnas.2200109119>

Bushmaker Trenton, Claude Kwe Yinda, Dylan H. Morris, Myndi G. Holbrook, Amandine Gamble, Danielle Adney, Cara Bushmaker, Neeltje van Doremalen, Robert J. Fischer, Raina K. Plowright, James O. Lloyd-Smith, Vincent J. Munster. 2023. Comparative Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 Variants of Concern. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 29, No. 5, May 2023

