

Schlüsselwörter

Influenza
H1N1
Hygiene
Pandemie
Virus
Händewaschen

Keywords

Influenza
H1N1
Hygiene
Pandemic
Virus
Hand washing

Korrespondierende Autorin:*PD Dr. rer. nat. Maren Eggers**

Labor Prof. G. Enders & Partner
Rosenbergstrasse 85
70193 Stuttgart

E-Mail: eggers@labor-enders.de**Maren Eggers*, Elena Terletskaia-Ladwig, Martin Enders**

Labor Prof. G. Enders & Partner und Institut für Virologie, Infektiologie und Epidemiologie e.V.,
Stuttgart

Wie wirksam ist Händewaschen gegen Influenzaviren?

How effective is hand washing against influenza virus?

Zusammenfassung

Hintergrund: Influenzaviren werden nicht nur aerogen – beispielsweise durch Husten oder Niesen – von Mensch zu Mensch übertragen, sondern auch indirekt durch das Anfassen von mit Virussekret kontaminierten Oberflächen. Über die kontaminierten Hände können dann die Influenzaviren in Nasen-, Augen- oder Mundschleimhäute gelangen und eine Infektion verursachen. Mit einer adäquaten Händehygiene kann einer solchen Kontaktinfektion vorgebeugt werden. In dieser Arbeit sollte daher in einer praxisnahen Untersuchung geprüft werden, ob durch das Händewaschen die Influenzaviruslast auf den Händen effektiv reduziert werden kann.

Methode: Hierfür wurde die Fingerkuppe oder die Handinnenflächen von Probanden mit einem Influenza A/H1N1-Impfstamm (ein A/H1N1/Brisbane/59/2007-ähnliches Virus) kontaminiert. Das Influenzavirus wurde zuvor mit einer Dreifach-Proteinbelastung versetzt, die das Nasensekret imitieren sollte.

Ergebnisse: Der Virustiter, der nach dem Verreiben und Antrocknen von den Händen bzw. Fingerkuppen der Probanden eluiert wurde, zeigte eine Reduktion von 1–2 \log_{10} -Stufen (im Median $10^{5.8}$ PFU/ml). Ohne Stabilisierung fiel der Virustiter um 3,5 \log_{10} -Stufen ab ($10^{3.9}$ PFU/ml). Nach artifizierlicher Kontamination von Handinnenflächen und Fingerkuppen mit Influenza A-Viren und anschließendem 20-sekündigen Händewaschen mit Seife konnte bei allen Probanden kein infektiöses Influenzavirus mehr nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Regelmäßiges Händewaschen könnte daher bei der Bewältigung einer Influenza-Epidemie oder Pandemie eine wichtige Rolle spielen.

Hyg Med 2009; 34 [12]: 492–498

Summary

Background: Influenza viruses are primarily spread from person to person aerogenically, for instance, via coughing or sneezing. However, the virus may also be transmitted indirectly by touching surfaces contaminated with viral secretions. Via the contaminated hands influenza viruses may then be transferred to the mucous membranes of nose, eyes or mouth, thereby causing an infection. Adequate hand hygiene can prevent infection by this mode of transmission. This paper investigates the effectiveness of hand washing on reducing the viral burden on hands in a test design simulating practical conditions.

Methods: The fingertips and/or the palms of test subjects were contaminated with a live influenza A/H1N1 virus vaccine strain (similar to A/H1N1/Brisbane/59/2007). Prior to this contamination, the virus had been stabilised with a threefold protein load mimicking nasal secretions.

Results: The virus titres eluted from the fingertips or palms of the test subjects after rubbing and drying showed a 1–2 \log_{10} reduction (median $10^{5.8}$ PFU/ml). Without protein load the virus titre was reduced by 3.5 \log_{10} units ($10^{3.9}$ PFU/ml). After artificial contamination of palms and fingertips with influenza A viruses and subsequent hand washing with liquid soap for 20 s no infectious influenza virus was detected on any of the test subjects.

Conclusions: These findings suggest that hand washing may prevent the spread of influenza viruses during epidemic or pandemic periods.

Einleitung

Ende April 2009 wurde zum ersten Mal über das Auftreten einer neuen Influenzavariante berichtet: Die ersten Infektionen mit dem neuen Grippevirus traten Ende Februar in Mexiko auf. Im April betrug die Infektionsrate (attack rate) in der Bevöl-

kerung bereits 60 %. Die mexikanische Regierung berichtete von 2155 Patienten, zum Teil mit schwerer Pneumonie, und 100 Todesfällen, die innerhalb eines Monats aufgetreten waren. Am 15. April wurde ein 10-jähriger Junge in Kalifornien, USA, positiv für das H1-Antigen, aber negativ für die saisonalen H1N1- und H3N2-Varianten getestet. Ende April 2009 veröffentlichten die amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention, dass es sich um ein neues Influenzavirus A vom Subtyp H1N1 (kurz: Influenza A/H1N1-Virus) handelt und dieses Virus eine so genannte Triple-Reassortante ist, d. h. es enthält genetische Abschnitte von Influenzaviren, die bei Vögeln, Schweinen und Menschen vorkommen [1]. Das neue Influenza A/H1N1-Virus zeichnet sich durch eine äußerst effiziente Mensch-zu-Mensch-Übertragung aus und breitete sich innerhalb kürzester Zeit auf allen anderen Kontinenten aus. Die WHO rief daher am 11.06.2009 die höchste Pandemiestufe (Stufe 6) aus.

In den Monaten Juni bis Mitte November diagnostizierte das Labor Enders bei 1702 von 5060 Patienten eine Infektion mit dem neuen Influenza A/H1N1-Virus. Dies entspricht einer Gesamtpositivrate von 33,6 %, wobei ein deutlicher Anstieg von 5,2 % im Juni, auf 21,4 % im September und auf 51,1 % Anfang November zu verzeichnen war.

Auffällig war die hohe Positivrate bei Teenagern und jungen Erwachsenen unter 30 Jahren im Vergleich zu Erwachsenen über 35 Jahren im September (32,1 % vs. 8,1 %). Anfang November haben wir weiterhin aus der Altersgruppe der 5- bis 20-Jährigen die meisten positiven Proben erhalten (69 % der positiv getesteten Proben), gefolgt von 42,7 % bei den 20- bis 30-Jährigen. Aber auch die Altersgruppe > 30 Jahre war zu 30 % infiziert und bei Personen > 60 Jahre waren es immerhin noch 14,7 %.

Waren in den Sommermonaten ausschließlich Reiserückkehrer (v. a. aus USA, Spanien) von der Neuen Grippe betroffen, so handelt es sich jetzt überwiegend um Personen, die Kontakt zu Influenza A/H1N1-Erkrankten hatten. Die meisten Infektionen mit dem neuen Influenza A/H1N1-Virus haben derzeit einen milden Verlauf, dennoch sind insbesondere bei Schwangeren, Kindern unter zwei Jahren sowie bei Personen mit Asthma oder Adipositas tödliche Verläufe zu beobachten. In den USA waren 13 Prozent aller Fälle

mit Todesfolge schwangere Frauen [2]. In der soeben beendeten Grippe-Saison 2009/10 auf der Südhalbkugel traten in Australien und Neuseeland bei jungen, gesunden Erwachsenen schwere virale Pneumonien nach einer Infektion mit dem pandemischen Influenza A/H1N1-Virus auf. Daher empfiehlt die WHO eine rasche Therapie mit den Neuraminidase-Inhibitoren Oseltamivir und Zanamivir [3].

Für Influenzaviren werden folgende Übertragungswege diskutiert: Zum einen werden Influenzaviren durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen (zum Beispiel beim Husten oder Niesen), wobei bereits 0,6 bis 3 TCID₅₀/ml (TCID₅₀: tissue culture infective dose, d. h. die Virusverdünnung, bei der 50 % der Zellen infiziert werden) Influenzaviren im Aerosol zu einer Ansteckung führen können [4,5]. Andererseits können Influenzaviren auch indirekt über kontaminierte Oberflächen übertragen werden, was als Kontaktinfektion bezeichnet wird. Durch das Berühren von Gegenständen, die mit virushaltigem Sekret kontaminiert sind, können die Influenzaviren leicht von den Händen auf Nasen-, Augen- oder Mundschleimhäute gelangen. Nach neueren Erkenntnissen scheint dieser Übertragungsweg eine wichtige Rolle zu spielen [6]. Für diesen Ansteckungsweg wurde experimentell eine Virusmenge von 127 bis 320 TCID₅₀/ml ermittelt [7].

Vor allem mit Nasensekret angeschnittene Gegenstände – wie z. B. Geldscheine [8] – stellen eine besondere Infektionsquelle dar, denn die mit dem Schleimhautprotein Mucin umgebenen Influenzaviren (Nasensekret) zeichnen sich durch eine erhöhte Überlebensfähigkeit auf Oberflächen aus, und zwar von bis zu 24 bis 48 Stunden [8,9]. Bean et al. gehen davon aus, dass ein Influenza-Infizierter andere Personen über kontaminierte Oberflächen innerhalb von zwei bis acht Stunden und über Papiertücher innerhalb weniger Minuten anstecken kann [9]. Im Mittel werden im Nasensekret 10³ bis 10⁷ TCID₅₀/ml Influenzaviren ausgeschieden [10].

Im Gegensatz zur Tröpfcheninfektion kann eine Kontaktinfektion über die Hände durch ein schnelles Inaktivieren der Influenzaviren auf den Händen vermieden werden [11]. Daher könnte eine gute Händehygiene zur Bekämpfung einer Influenza-Pandemie bzw. -Epidemie beitragen. Regelmäßiges gründliches Händewaschen mit Seife ist seit Semmelweis ein bewährtes Mittel zur Händehygiene [12] und wird auch vom Robert Koch-Institut zur Bewältigung der Influenza-Pandemie empfohlen (www.wir-gegen-viren.de). Da Bakterien methodisch einfacher zu handhaben sind, wurde bisher nur in sehr wenigen Studien untersucht, welche Rolle das Händewaschen mit Wasser und Seife bei der Prävention einer Influenzavirus-Übertragung spielt. Diese Studie sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Händewaschen und verschiedene Abtrocknungsmethoden auf die Influenzaviruslast auf den Händen hat.

Material und Methoden

Herstellung der Testvirus suspension

Das Testvirus, ein Influenzavirus A/H1N1/Brisbane/59/2007-ähnliches Influenzavirus, das als Impfstamm eingesetzt wird, wurde von Novartis Behring (Novartis Vaccines and Diagnostics GmbH & Co. KG, Marburg, Deutschland) bezogen. Die MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney) stammten von der European Collection of Cell Cultures (ECACC, Wiltshire, UK).

Zur Herstellung der Virussuspension wurden konfluente Monolayer von MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney) verwendet, die in 175-cm²-Roux-Flaschen (Nunc GmbH & Co, Wiesbaden) mit Minimum Essential Medium (MEM, Biochrom AG, Berlin) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS, Biochrom, Berlin), Natriumpyruvat, Glutamin und nicht essentiellen Aminosäuren kultiviert worden waren. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3 ml Impfvirus in FKS-freiem Medium mit 2 µg/ml n-Tosyl-L-phenylalanin-chloromethylketon (TPCK) (Sigma Aldrich Chemie AG, Steinheim, Germany) infiziert. Nach Ausbildung eines zytopathischen Effekts wurde der Zellkulturüberstand für 10 Minuten bei 2.500 rpm zentrifugiert, aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Nachweis der Influenzavirus-Anzucht in der Zellkultur

Der Nachweis infektiöser Influenzaviren erfolgte nach der kürzlich von Terletskaja-Ladwig et al. beschriebenen Methode [13]. MDCK-Zellen, die auf einer 96-well-Platte konfluent gewachsen waren, wurden mit 0,1 ml pro well der Virussuspension in-

okuliert und die Platte bei $1.200 \times g$ für 30 Minuten zentrifugiert. Nach 60 Minuten erfolgte die Zugabe einer Carboxymethylcellulose-Lösung (CMC, mittlere Viskosität, Sigma) bis zu einer Endkonzentration von 0,8 %. Die beimpften Zellkulturen wurden für 10 bis 18 Stunden bei 37°C mit 5 % CO_2 in der feuchten Kammer inkubiert. Nach der Bebrütung wurde das Medium von den Zellkulturplatten abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem Aceton-Methanol-Gemisch (40:60) fixiert. Dann erfolgte die Zugabe eines Influenza A-spezifischen monoklonalen Antikörpers [25 μl /well] (Chemicon, Temecula, CA) in einer Verdünnung von 1:1.000 in Blocking-Puffer (1 % BSA in PBS). Nach 30 Minuten Inkubation wurde die Antikörpermischung verworfen und $3\times$ mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einem Anti-Ziege-Horse-Radish-Peroxidase (HRP)-markierten Konjugats (Sigma-Aldrich, Deutschland) in der Verdünnung 1:500. Das im anschließenden Schritt zugefügte Substrat (AEC) reagiert mit dem HRP und es kam zu einer sichtbaren Farbumwandlung (Rotfärbung). Die virusinfizierten Zellen ließen sich mikroskopisch anhand der spezifischen Färbung der Zellen erkennen. Eine gefärbte Zelle entsprach einem infektiösen Viruspartikel (plaque forming unit, PFU). Diese Plaques-Färbungsmethode wird häufig für die Virusquantifizierung eingesetzt [14,15,16].

Die Auswertung der Platten erfolgte unter einem Lichtmikroskop sowie automatisch im EliSpot-Reader. Der verwendete AID EliSpot Reader (AID, Deutschland) besteht aus einer Leseinheit für das Photographieren von 24-, 48- als auch 96-Well-Platten sowie einer Computer-, Auswertungs- und Kontrolleinheit. Die Readereinheit besteht aus einer high-end Videokamera sowie einer zweiachsigen Scanning-Platte, die die Wells der Mikrotiterplatte exakt für die Kamera positioniert. Die im EliSpot-Reader abgelesenen Platten wurden mit Hilfe des Software-Programms „VirusSpot“ (AID) ausgewertet. Die Berechnung des Titters (PFU/ml) anhand der Anzahl gefärbter Zellen erfolgte nach folgender Formel [17]:

$$\text{PFU}/t = \frac{\sum c_1 + c_2 \dots c_n}{(n_1 + n_2 \times v_2 + \dots n_n + n_n \times v_n) \times d}$$

t = Testvolumen pro Vertiefung (0,2 ml)
 $c_{1 \text{ bis } n}$ = Anzahl der PFU der $10^{-1 \text{ bis } n}$ Verdünnung
 $n_{1 \text{ bis } n}$ = Anzahl der Wells der ersten bzw. bis letzten Verdünnungsstufe mit nicht konfluierenden Plaques
 $v_{1 \text{ bis } n}$ = Verdünnungsfaktor von n_1 zu n_n
 d = Verdünnungsstufe von c_1

Berechnung des Reduktionsfaktors

Die Beurteilung der Reduktion erfolgte durch die Berechnung des Titerabfalls ($\Delta \lg \text{PFU}$) gegenüber der jeweils parallel mitgeführten Viruskontrolle.

Finger-Pad-Methode nach Sattar

Alle Probanden wuschen sich vor Beginn der Experimente die Hände mit lauwarmen Wasser. Nach dem gründlichen Abtrocknen rieben sich die Probanden mit 70%igem Ethanol für 15 Sekunden die Hände ein. Die Hände wurden dann an der Luft getrocknet.

Die Applikationsstelle auf der Fingerkuppe wurde mit einem leeren Cryotube markiert. In die Mitte dieses kreisförmigen Abdrucks wurden 10 μl Testvirussuspension ($10^{7.3}$ PFU/ml) appliziert, die als Zusatz Mucin, bovines Serumalbumin (BSA) und Hefeextrakt enthielt [18]. Diese sogenannte Proteinbelastung nach Sattar, die neben dem Schleimhautprotein Mucin auch Kohlenhydrate und Zucker enthielt, sollte das Nasensekret imitieren. Für 500 μl Inokulum wurden 340 μl Influenzavirus in folgendem Mischungsverhältnis gemischt: 100 μl Mucin von bovinen submaxillären Drüsen Type I-S, 25 μl BSA Fraktion V und 35 μl Hefeextrakt. Die Stammlösungen zur Herstellung des Proteingemisches wurden wie folgt hergestellt: Je 0,5 g BSA Fraktion V (Sigma Aldrich, Deutschland), 0,04 g Mucin (Sigma Aldrich, Deutschland) bzw. 0,5 g Hefeextrakt (Sigma Aldrich, Deutschland) wurden in 10 ml PBS gelöst, sterilfiltriert (außer Mucin) und aliquotiert.

Die applizierte Testvirussuspension auf der Fingerkuppe trocknete unter der Laminar-Air-Flow für 10 Minuten. Die Elution erfolgte mit 1 ml Medium in einem Cryotube. Das Gefäß wurde auf die Applikationsstelle gebracht und 20 mal geschüttelt. Das Eluat wurde sofort in 10er-Schritten mit eisgekühltem MEM titriert und die Verdünnungsreihe umgehend auf eine konfluent gewachsene MDCK-Zellkultur übertragen.

Ganze-Hand-Protokoll

Das Kontaminationsexperiment der ganzen Hand wurde in Anlehnung an eine von Sattar und Mitarbeitern im Jahre 1993 beschriebene Methode durchgeführt [19].

Die Handinnenflächen von zehn freiwilligen Probanden wurden mit 250 μl Testvirussuspension mit Proteinbelastung ($10^{7.3}$ PFU/ml) kontaminiert. Die Probanden verrieben das Virus auf den Handflächen und ließen die Anschmutzung antrocknen. Anschließend wurden die Hände mit 10 ml Medium (MEM) $3\times$ gespült. Dies diente der Rückgewinnung des eingesetzten Virus sowie der Bestimmung des Einflusses der Antrocknung auf die Infektiosität des Testvirus.

Im zweiten Versuchsteil wurden die Hände der Probanden mit 250 μl Testvirussuspension mit Proteinbelastung ($10^{7.3}$ PFU/ml) kontaminiert. Nach dem Verreiben und Antrocknen wurden die Hände für 20 Sekunden mit 2 ml Waschlotion (Seraman medical, Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland) gewaschen. Die noch feuchten Hände wurden mit 10 ml Medium (MEM) $3\times$ gespült. Die 10 ml Spülflüssigkeit wurden jeweils in einer sterilen Petrischale aufgefangen und danach auf eine 96-well-Platte mit konfluenten MDCK-Zellen verimpft.

Händewaschung

Die Händewaschung erfolgte für 20 Sekunden mit 2 ml Waschlotion (Seraman medical, Ecolab Deutschland GmbH, Düsseldorf, Deutschland).

Handabtrocknung

Zur Verfügung standen vier Abtrocknungsmöglichkeiten:

- Tork Advanced Papierhandtuch mit Lagenfaltung C Fold H3 Classic System (SCA, Göteborg, Schweden) aus einem Handtuchspender der Fa. Tork,
- Papiertücher Kleenex Ultra Super Soft 6761 (Kimberley-Clark Limited/ Professional Section, Surrey, UK) aus einem Handtuchspender der Fa. Tork,
- mit Silberionen antibakteriell veredelte Stoffhandtuchrolle sowie Stoffhandtuchspender von CWS (CWS-Boco Deutschland GmbH, Dreieich, Deutschland),
- Air-Wolf Warmlufthändetrockner Typ A 60 (Air-Wolf, München, Deutschland).

Ergebnis

Die Tenazität des A/H1N1-Influenzavirus auf der Haut

Die Fingerspitzen von geimpften Probanden wurden mit 10 µl der Testvirussuspension ohne Proteinzusatz ($10^{7.4}$ PFU/ml) kontaminiert. Die Testvirussuspension wurde ohne Antrocknungszeit durch 20maliges Schütteln eines Plastikgefäßes (Cryotube) in 1 ml Zellkulturmedium eluiert. Die Antrocknung der Testvirussuspension auf den Fingerkuppen führte nach 10 Minuten zu einem Verlust von 3,5 \log_{10} -Stufen: Der Virustiter betrug nur noch $10^{3.9}$ PFU/ml. War die Testvirussuspension dagegen mit der Proteinbelastung nach Sattar versetzt ($10^{7.3}$ PFU/ml), die das Schleimhautprotein Mucin, bovines Serumalbumin sowie Hefeextrakt enthielt [18], verbesserte sich die Stabilität des Virus erheblich. Mit dieser Proteinbelastung, die das Nasensekret imitieren sollte, konnten nach der Antrocknung auf den 40 untersuchten Fingerkuppen im Median $10^{5.8}$ PFU/ml nachgewiesen werden. Der initiale Virustiter der Testvirussuspension mit Proteinbelastung wurde im Schnitt von $10^{7.3}$ PFU/ml pro Fingerkuppe um 1,5 \log_{10} -Stufen auf $10^{5.8}$ PFU/ml reduziert.

Händewaschen und verschiedene Trocknungsmethoden

In diesem Versuchsteil wurden die Fingerkuppen der Probanden mit 10 µl der Testvirussuspension mit Proteinbelastung ($10^{7.3}$ PFU/ml) kontaminiert. Nach einer Antrocknungszeit wurden die Viren durch 20maliges Schütteln eines Plastikgefäßes (Cryotube) in 1 ml Medium eluiert. Von jedem Probanden wurde zunächst eine Kontrolle abgenommen. Danach wuschen sich die Probanden für 20 Sekunden mit 2 ml Waschlotion die Hände. Eine Virustiterbestimmung wurde mit jeweils mit dem feuchten Finger und eine nach der Abtrocknung durchgeführt. Bei allen 40 Fingerkuppen konnte vor dem Waschen ein Virustiter von $10^{3.8}$ bis $10^{6.1}$ PFU (im Median $10^{4.8}$ PFU/ml) bestimmt werden. Nach dem Waschen war jedoch kein infektiöses Testvirus mehr auf den 40 überprüften Fingerkuppen vorhanden. Auch nach dem Händewaschen sowie den verschiedenen Handabtrocknungsmethoden (45 Sekunden Heißluft, Einmalstoffhandtuch, zwei unterschiedlichen Papierqualitäten) war kein infektiöses Testvirus

mehr nachweisbar. Dies ist in Abbildung 1 exemplarisch gezeigt für eine Viruskontrolltitration in Dreifachbestimmung (A) sowie der dazugehörigen Virustritation des Restvirustiter, der nach dem Händewaschen auf der Fingerkuppe verblieben ist (B).

Entfernung von Restschmutz

Falls nach dem Waschen noch ein Restvirus auf den Händen vorhanden sein sollte, so könnte diese Restanschmutzung mit dem Handtuch abgewischt werden. Um zu eruieren, ob bei den einzelnen Materialien eine unterschiedliche Reduktion des Vi-

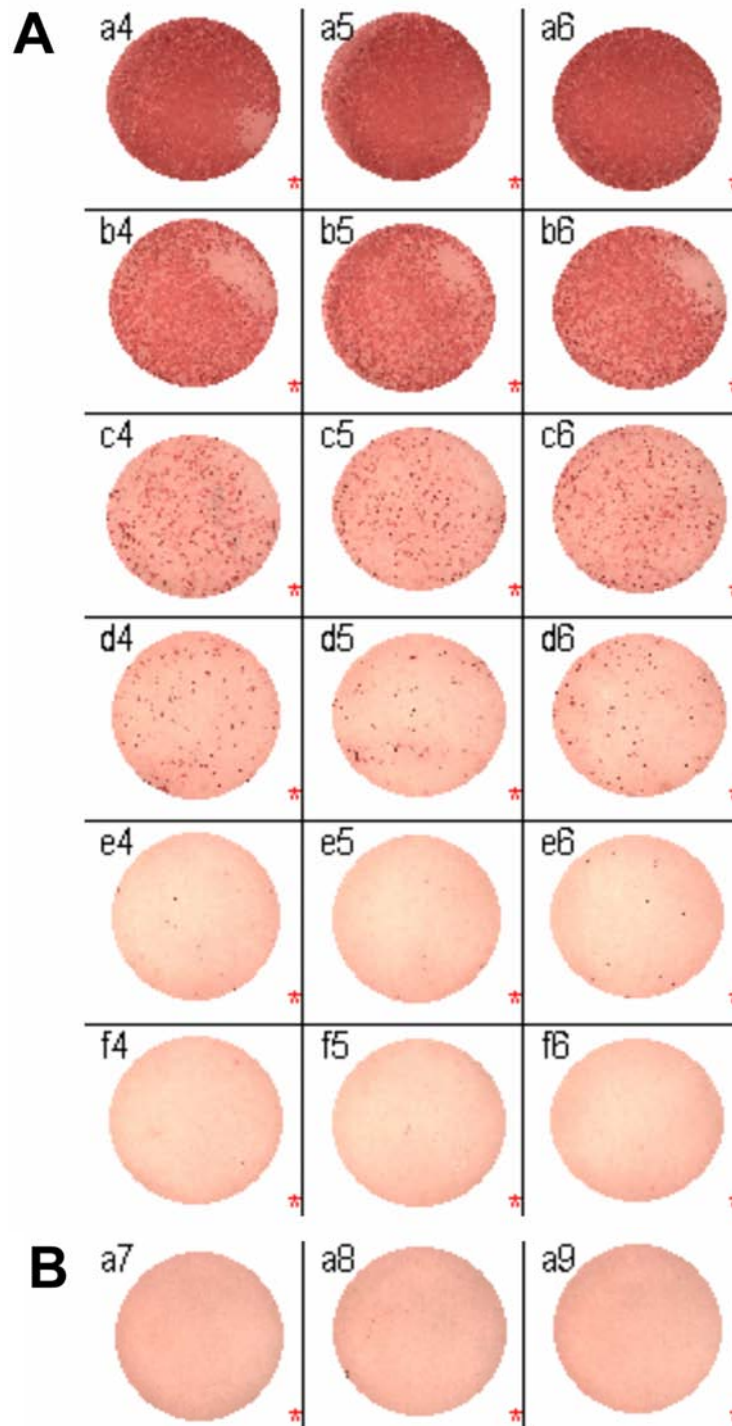


Abbildung 1: Finger-Pad-Methode, Exemplarische Darstellung einer MDCK-Zellkultur, die mit Influenzavirus inokuliert wurde. Die Influenzaviren bilden Plaques (PFU), die immunohistochemisch angefärbt worden sind. A zeigt die Viruskontrolltitration vor dem Händewaschen. Der Titer der Viruskontrolle beträgt $10^{6.3}$ PFU/ml. Die Reihen a bis f stellen die Verdünnungsstufen dar, wobei die Zahl der jeweiligen Einzeltitration entspricht. Nach dem Händewaschen konnten keine Plaques in der Virustritation mehr detektiert werden, daher wurde nur die erste Verdünnungsstufe gezeigt (B).

Tabelle 1: Virustiter nach Abwischen auf Papier.

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontroll-Virustiter log ₁₀ PFU/ml	5,3	5,1	6,3	5,7	6,3	6,0	5,3	5,1	6,3	5,1
Virustiter in log ₁₀ PFU/ml nach Abwischen	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	2,8	keine PFU nachweisbar	1,8	keine PFU nachweisbar

Tabelle 2: Virustiter nach Abwischen aufsehr saugfähigem Papier.

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontroll-Virustiter log ₁₀ PFU/ml	5,9	5,3	5,4	4,8	6,3	6,3	6,5	6,3	6,3	6,3
Virustiter in log ₁₀ PFU/ml nach Abwischen	keine PFU nachweisbar	2,0	keine PFU nachweisbar	2,3	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar

Tabelle 3: Virustiter nach Abwischen auf Stoff.

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontroll-Virustiter log ₁₀ PFU/ml	5,4	5,2	4,1	5,4	5,4	6,2	5,8	6,2	6,3	5,4
Virustiter in log ₁₀ PFU/ml nach Abwischen	4,4	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	2,6	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar	keine PFU nachweisbar

Tabelle 4: Virustiter vor und nach Händewaschung (Ganze-Hand-Protokoll).

Proband	Aufgetragen Virusmenge (log ₁₀ PFU/ml)	PFU nach Händewaschen	Reduktion
1	5,4	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
2	6,0	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
3	5,2	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
4	6,0	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
5	5,3	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
6	5,5	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
7	5,9	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
8	6,0	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
9	5,2	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %
10	5,2	Keine PFU nachweisbar	> 99,99 %

rustiters messbar ist, wurden Fingerkuppen mit 10 µl einer Testvirussuspension mit Proteinbelastung nach Sattar kontaminiert (10^{7,3} PFU/ml) und anschließend sofort ohne Antrocknung auf Stoff bzw. zwei verschiedenen Papierhandtuchqualitäten unterschiedlicher Saugfähigkeit abgewischt. Danach wurde der verbleibende Restvirustiter mittels Finger-Pad-Methode untersucht. In unseren Experimenten fanden wir bei allen drei Materialien in 80 % der Fälle kein Virus mehr (Tabelle

1–3). Damit konnten wir zeigen, dass sich die hier untersuchten Materialien bei der Aufnahmefähigkeit der Influenza-Restschmutzung nicht wesentlich unterscheiden haben.

Verbleibende Virusmenge in der Restfeuchte der Haut

Da die ersten Untersuchungen nur auf einer kleinen Hautfläche durchgeführt worden waren, wurde zur Sicherheit noch in einer weiteren Versuchsreihe die kom-

plette Handinnenfläche mit einem größerem Inokulum (250 µl) kontaminiert. Zu diesem Zweck wurde die Ganze-Hand-Methode angewendet. Der Titer der eingesetzten Virussuspension betrug 10^{7,3} PFU/ml; 250 µl Virusinokulum enthielten somit 10^{6,7} PFU. Der Virustiter, der nach dem Verreiben und Antrocknen von den Händen der Probanden eluiert wurde, zeigte eine Reduktion von 1–2 log₁₀-Stufen (Tabelle 4). Dennoch war die absolute Titerhöhe des verbleibenden Virus ausreichend hoch, um bei allen Probanden nach 20-sekündigem Händewaschen mit 2 ml Waschlotion eine Reduktion der Virusinfektiosität über vier Zehnerpotenzen in der Restfeuchte der Haut zu demonstrieren (> 99,99 %). Dies verdeutlicht auch Abbildung 2, die die immunohistochemische Anfärbung der Influenza-infizierten Zellen zeigt.

Diskussion

Händewaschen gilt als unzureichende Maßnahme in der Händehygiene von medizinischem Personal. Dies wurde vor allem für bakterielle Erreger gezeigt. Verschiedene Keime wie z. B. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Staphylococcus*

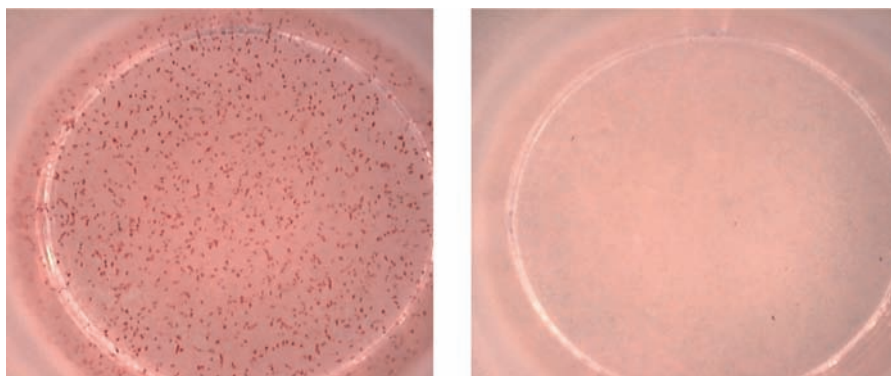


Abbildung 2: Exemplarische Darstellung einer Zellkultur, die mit dem Eluat eines Probanden vor dem Waschen und nach dem Waschen, inokuliert wurde. Während im rechten Bild die Influenzaviren als Plaques (PFU) angefärbt worden sind, konnte nach dem Waschen keine PFU mehr detektiert werden (linkes Bild).

aureus werden durch Waschen mit Seife nur um 2–2,5 \log_{10} -Stufen reduziert [20]. Vergleichbare Untersuchungen mit dem felinen Calicivirus, einem Surrogatvirus für das humane Norovirus, führten zu einer Reduktion von 1,26 \log_{10} -Stufen durch Flüssigseife [21]. Basierend auf diesen Studiendaten kann der Effekt des Händewaschens zur Prävention von Influenzaviren kontrovers diskutiert werden.

Die Wirkung von Desinfektionsmitteln gegen behüllte Viren ist jedoch unbestritten und konnte bereits in den 80er Jahren in praxisnahen in-vivo-Versuchen mit Influenza A-Viren gezeigt werden. Nach artifizieller Kontamination von Händen und Fingerkuppen mit Influenza A-Viren und anschließender Händedesinfektion mit einem ethanolischen Präparat konnten die Autoren Schürmann und Eggers kein infektiöses Influenzavirus mehr nachweisen [22]. Dennoch stellt Händewaschen mit Seife eine einfache Verhaltensregel dar, die von jedem Bürger als Schutz vor einer Ansteckung durchgeführt werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden praxisnahen Studie sollte der Effekt des Händewaschens auf die Influenzaviruslast der kontaminierten Haut untersucht werden. Bei allen Probanden konnten sowohl im Fingerkuppen-Versuch als auch bei der Ganze-Hand-Methode nach dem Waschen kein infektiöses Influenzavirus mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der kürzlich veröffentlichten Studie von Grayson et al. aus Australien war in allen Versuchen ein ausreichender Influenzattiter in der Viruskontrollprobe messbar, der eine Aussage über 4 \log_{10} -Stufen ermöglichte [23]. In der australischen Studie konnte jedoch nach einer kurzen Antrocknungszeit von 2 Minuten

eine Reduktion des initialen Influenzattiters um 3–4 Zehnerpotenzen festgestellt werden. Bei sechs von 20 Probanden war sogar kein infektiöses Influenzavirus mehr nachweisbar. Bei den verbliebenen 14 Probanden konnte, in Übereinstimmung mit unseren Experimenten, nach dem Waschen mit Seife kein Influenzavirus mehr nachgewiesen werden. Der Unterschied zu unserer Untersuchung liegt darin, dass wir das Influenzavirus mit einer Dreifach-Proteinbelastung versetzt haben, die zu einer besseren Überlebensdauer der Viren durch Stabilisierung führte. Ohne die Proteinbelastung betrug der Verlust der Infektiosität nach 10 Minuten Trocknungszeit 3,5 \log_{10} -Stufen. Hingegen war die Wiederfindungsrate des Influenzavirus-Gemischs mit der Dreifach-Proteinbelastung, die u. a. das Schleimhautprotein Mucin enthielt, sehr gut: Nach einer Antrocknungszeit von 10 Minuten betrug der Abfall des Virustiters 1–2 Zehnerpotenzen.

Die Frage, ob in unseren Experimenten das Influenzavirus nur abgespült oder inaktiviert worden ist, konnte nicht geklärt werden. Aber schon 1940 zeigten Stock und Francis die inaktivierende Wirkung von Seife auf Influenzaviren im Tierversuch [24,25]. Auch die systematische Literaturanalyse von Jefferson et al. stellt den Nutzeffekt des Händewaschens bzgl. einer verminderten Influenza-Übertragungsrate innerhalb einer Familie nicht in Frage [26].

Das Fazit der vorliegenden Untersuchung ist, dass gründliches Waschen mit Seife effizient Influenzaviren von den Händen entfernt und dadurch eine Ausbreitung der Influenzaviren durch Kontaktinfektion vermieden werden könnte. Die unterschiedlichen Abtrocknungsmethoden sind vergleichbar, jedoch sollten

Einmalhandtücher verwendet werden. Falls Wasser und Seife nicht verfügbar sind, wie z. B. beim Benutzen öffentlicher Verkehrsmittel, sollte ein Händedesinfektionsmittel verwendet werden. Auch für medizinisches Personal gilt es, die Hände häufig während des Arbeitsalltags zu desinfizieren. Nur bei sichtbarer Verschmutzung, vor Arbeitsbeginn, nach Arbeitsende sowie nach dem Toilettengang sollten die Hände gewaschen werden.

Danksagung

Wir danken allen Mitarbeitern der Virologie für die engagierte und exzellente technische Assistenz. Herrn Professor A. Kramer, Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Universität Greifswald danken wir für die anregende Diskussion.

Interessenskonflikt

Die Finanzierungsmittel dieser Studie wurde von der Firma CWS-boco International GmbH, Dreieich, bereitgestellt.

Literatur

1. Shinde V, Bridges CB, Uyeki TM, Shu B, Balish A, Xu X, Lindstrom S, Gubareva LV, Deyde V, Garten RJ, Harris M, Gerber S, Vagasky S, Smith F, Pascoe N, Martin K, Duffy D, Ritger K, Conover C, Quinlisk P, Klimov A, Bresee JS, Finelli L. Triple-reassortant swine influenza A (H1N1) in humans in the United States, 2005–2009. *N Engl J Med.* 2009; 360(25):2616–25.
2. Jamieson Dj, Honein Ma, Rasmussen Sa, Williams JI, Swerdlow DI, Biggerstaff Ms, Lindstrom S, Louie Jk, Christ Cm, Bohm Sr, Fonseca Vp, Ritger Ka, Kuhles Dj, Eggers P, Bruce H, Davidson Ha, Lutterloh E, Harris MI, Burke C, Cocoros N, Finelli L, Macfarlane Kf, Shu B, Olsen Sj; Novel Influenza A (H1N1) Pregnancy Working Group. Summary H1N1 2009 Influenza Virus Infection During Pregnancy In The USA. *The Lancet* 2009, Volume 374 (9688):451–458.
3. WHO: briefing note 13. Clinical features of severe cases of pandemic influenza Pandemic (H1N1) 2009. Geneva: World Health Organization; 16 October 2009.
4. Tellier R. Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1657–62.
5. Alford RH, Kasel JA, Gerone PJ, Knight V. Human influenza resulting from aerosol inhalation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1966;122:800–804.
6. Brankston G, Gitterman L, Hirji Z, Lemieux C, Gardam M. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect Dis.* 2007 ; 7(4):257–65. Review.

7. Couch RB, Douglas RG Jr, Fedson DS, et al. Correlated studies of a recombinant influenza virus vaccine. III. Protection against experimental influenza in man. *J Infect Dis* 1971;124:473–480.
8. Thomas Y, Vogel G, Wunderli W, Suter P, Witschi M, Koch D, Tapparel C, Kaiser L. Survival of influenza virus on banknotes. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74(10):3002–7.
9. Bean B, Moore BM, Sterner B, Peterson LR, Gerding DN, Balfour HH Jr. Survival of influenza viruses on environmental surfaces. *J Infect Dis*. 1982;146(1):47–51.
10. Murphy BR, Clements ML. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. In: Mestecky J, McGhee JR, eds. *Current topics microbiology and immunology*. New York: Springer-Verlag, 1989;146:107–16.
11. Weber TP, Stilianakis NI. Inactivation of influenza A viruses in the environment and modes of transmission: a critical review. *J Infect*. 2008;57(5):361–73. Review.
12. Rotter ML. 150 years of hand disinfection – Semmelweis' heritage. *Hyg Med* 1997;22: 332–9.
13. Terletskaia-Ladwig E, Eggert M, Meier S, Leinmüller M, Schneider F, Schmid M and Enders M. Laboratory-based assessment of influenza in German ambulant patients from 1998 to 2008. *Infection* 2009; 37 (5):401–6.
14. Wentz PA, Belknap EB, Brock KV, Collins JK, Pugh DG. Evaluation of bovine viral diarrhoea virus in New World camelids. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 223(2):223–8.
15. Eyal O, Olshevsky U, Lustig S, Paran N, Halevy M, Schneider P, Zomber G, Fuchs P. Development of a tissue-culture-based enzyme-immunoassay method for the quantitation of anti-vaccinia-neutralizing antibodies in human sera. 1: *J Virol Methods*. 2005; 130(1-2):15–21.
16. Lee MS, Cohen B, Hand J, Nokes DJ. A simplified and standardized neutralization enzyme immunoassay for the quantification of measles neutralizing antibody. *J Virol Methods*. 1999; 78(1-2):20–17.
17. CEN. Europäisches Komitee für Normung. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie für in der Humanmedizin verwendete chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1). EN 14476:2005.
18. Sattar SA, Ansari SA. The fingerpad protocol to assess hygienic hand antiseptics against viruses. *J Virol Methods*. 2002;103(2):171–81.
19. Mbithi JN, Springthorpe VS, Sattar SA. Comparative in vivo efficiencies of hand-washing agents against hepatitis A virus (HM-175) and poliovirus type 1 (Sabin). *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(10):3463–9.
20. Kampf G, Löffler H; Gastmeier P. Händehygiene zur Prävention nosokomialer Infektionen. *Hand Hygiene for the Prevention of Nosocomial Infections*. *Dtsch Arztebl Int* 2009; 106(40): 649–5.
21. Steinmann J, Becker B, Bischoff B, Paulmann D, Steinmann J and Steinmann E. Alte und neue Erkenntnisse zur Virus-Wirksamkeit der hygienischen Händedesinfektion. *Hyg. Med.* 2009; 34: 32–40.
22. Schürmann W, Eggert HJ. Antiviral activity of an alcoholic hand disinfectant: Comparison of the in vitro suspension test with an in vivo experiments on hands and on individual finger tips. *Antiviral Res* 1983; 3: 25–41.
23. Grayson, M., Melvani, S., Druce, J., Barr, I., Ballard, S., Johnson, P., Mastorakos, T., and Birch, C. Efficacy of Soap and Water and Alcohol Based-Hand-Rub Preparations against Live H1N1 Influenza Virus on the Hands of Human Volunteers *CID* 2009; 48 (3): 285–291.
24. Stock CC and Francis Th. The inactivation of the virus of epidemic influenza by soaps. *J Exp Med* 1940; 71: 661–681.
25. Stock CC and Francis Th. Additional Studies of the Inactivation of the Virus of Epidemic Influenza by Soaps. *J. Immunol* 1943; 47: 303–308.
26. Jefferson T, Del Mar C, Dooley L, Ferroni E, Al-Ansary LA, Bawazeer GA, van Driel ML, Foxlee R, Rivetti A. Physical interventions to interrupt or reduce the spread of respiratory viruses: systematic review. *BMJ*. 2009 Sep 21;339:b3675. doi: 10.1136/bmj.b3675.