



Innovative Bioanalysis, Inc.
3188 Airway Ave Suite D
Costa Mesa, CA 92626
www.InnovativeBioanalysis.com
Correo electrónico: Albert.Brockman@innovativebioanalysis.com

SARS-CoV-2 USA-CA1/2020

CLIENTE: NOVAERUS

PROYECTO: AEROSOL PARA INTERIORES

PRODUCTO: NV1050

N.º LICENCIA CAP: 886029801

N.º LICENCIA CLIA: O5D0955926

ID DE ESTADO: CLF 00324630

VIRUS DE EXPOSICIÓN: SARS-CoV-2 USA-CA1/2020



RESUMEN: EFICACIA DEL DISPOSITIVO NOVAERUS NV1050™ CONTRA EL SARS-CoV-2 NEBULIZADO

Antecedentes: este estudio *in vitro* se ha diseñado para determinar la eficacia de la unidad NV1050™. El producto es un limpiador médico del aire recirculante comercializado y fabricado por NOVAERUS/WELLAIR. La unidad NV1050™ está diseñada para colocarse de forma independiente en una sala y reducir la concentración de microorganismos en el aire cuando está en funcionamiento. Para esta prueba de exposición, se utilizó el patógeno SARS-CoV-2 USA-CA1/2020, que es el que provoca la COVID-19. El coronavirus puede propagarse por el aire y al entrar en contacto con superficies contaminadas. Hay una demanda de dispositivos de limpieza de aire que han demostrado una capacidad contrastada para reducir los patógenos infecciosos en el aire y, por tanto, disminuir el riesgo de infección y transmisión en personas. NOVAERUS proporcionó una unidad independiente NV1050™ empaquetada previamente para fines de análisis. Se siguieron procedimientos analíticos utilizando procedimientos operativos estándar (SOP, por sus siglas en inglés) para las exposiciones de patógenos víricos nebulizados y su posterior descontaminación. Todos los SOP y los procesos internos siguen las directrices y las recomendaciones de las prácticas clínicas recomendadas de laboratorio.

EQUIPO SUMINISTRADO:

FABRICANTE: NOVAERUS

MODELO: NV1050™

N.º DE SERIE: NV1050-US20073100137



EQUIPO NV1050™:

El equipo llegó al laboratorio embalado previamente por el fabricante y cuando se recibió se inspeccionó en busca de daños. Antes de comenzar la exposición, se utilizó la unidad NV1050™ durante más de 3 horas para realizar análisis de simulacro en una cámara hermética con bioaerosol y confirmar el correcto funcionamiento de la unidad. La cámara con bioaerosol era la misma cámara BSL3 utilizada para la prueba de exposición vírica.



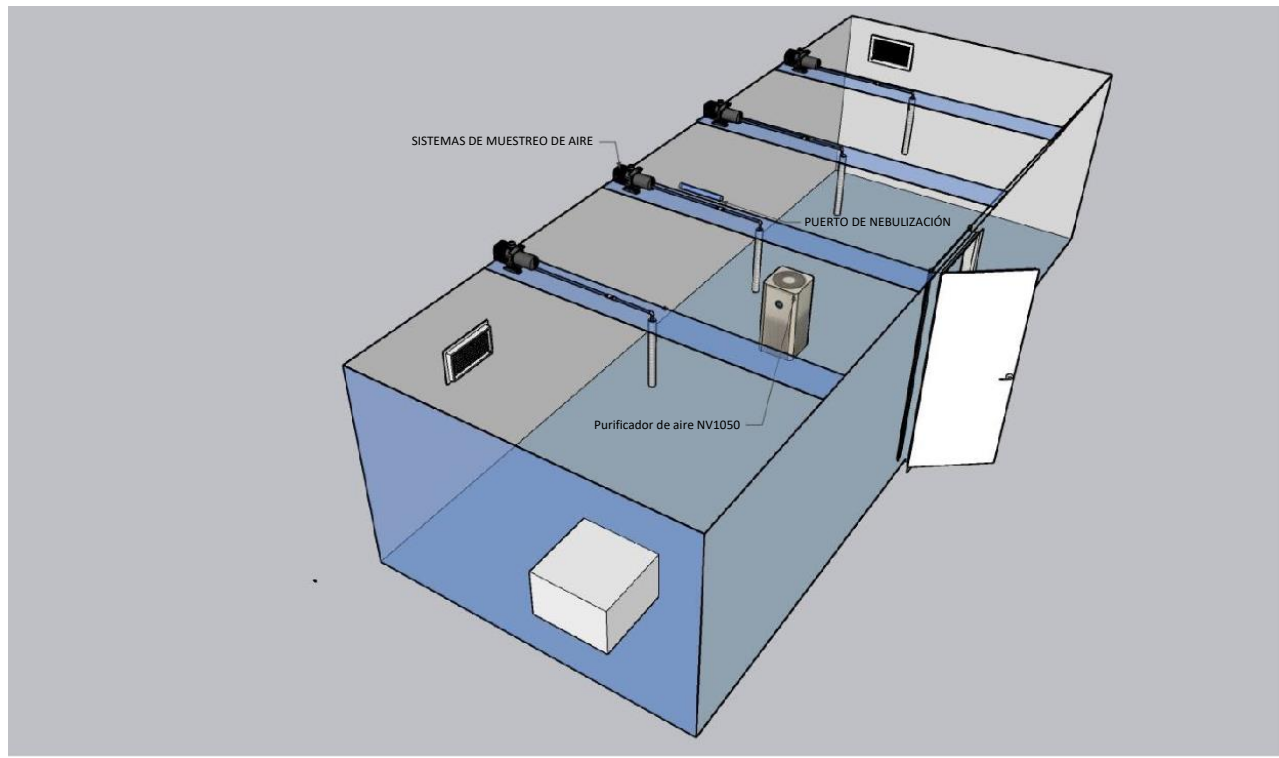
CÁMARA DE PRUEBAS PARA LA EXPOSICIÓN VÍRICA:

La cámara de pruebas era una cámara grande de pruebas con volumen de aire sellado compuesta por paredes de metal y suelo de resina epoxídica que cumplía la normativa de bioseguridad de nivel 3 (BSL3, por sus siglas en inglés). La cámara estaba diseñada para sellarse completamente del entorno exterior y evitar cualquier posible escape del material de prueba a la atmósfera. La cámara de pruebas estaba equipada con cuatro ventanas de visualización selladas y una puerta con bloqueo de entrada y salida. Las dimensiones totales de la cámara de pruebas eran aproximadamente de 2,4 × 2,4 × 6 m (8 × 8 × 20 pies) con un volumen de desplazamiento de 36,2 m³ (1280 ft³). Con base en el volumen de pies cúbicos, la cámara tenía 36 245,56 litros de aire.

La cámara de pruebas tenía entradas y salidas con filtros HEPA, junto con un sistema activo de UVC en todos los conductos. Se monitorizaron la humedad y la temperatura dentro de la cámara usando un dispositivo inalámbrico calibrado. Para analizar las muestras de aire, la cámara estaba equipada con cuatro sondas dispuestas a lo largo de la línea central de la sala y colgaban del techo 60,9 cm (24 pulgadas). Cada tubo de sonda estaba conectado a un sistema programable Gilian 10i con cassettes de muestreo del lote n.º 19766 fabricado por Sensidyne. En el centro de la pared de 6 m (20 pies) había un puerto de nebulización de bioaerosol individual frente a las puertas de entrada. El puerto de diseminación sobresalía de la pared 60,9 cm (24 pulgadas) y estaba conectado a un sistema de nebulización con compresor programable.

Antes de la prueba, se analizó la presión de la cámara en busca de fugas y se inspeccionó visualmente usando un dispositivo de humo de color. Se confirmaron todas las juntas de la cámara y todo el equipo utilizado tenía una prueba de funciones para confirmar las condiciones de trabajo. Para el equipo calibrado, se comprobaron los registros de calibración a fin de confirmar el estado de funcionamiento.

ENTORNO DE LA PRUEBA:



RESUMEN DEL EXPERIMENTO:

- Antes de la prueba inicial de control y después de cada serie de pruebas, se descontaminaba la zona de la prueba y se preparaba siguiendo los procedimientos internos.
- La temperatura durante todas las series de prueba fue aproximadamente de 22,8 °C (73 °F, ± 2 °F) con una humedad relativa del 51 %.
- La humedad relativa y la temperatura se midieron en dos secciones de la cámara durante todas las pruebas para confirmar que no se producía una desviación superior al 3 % desde cada lado.
- En cada exposición vírica, se colocó la unidad NV1050™ en el centro de la sala.
- El fabricante calibró los muestreadores de aire el 3 de septiembre de 2020 y los fijó a un caudal estándar de 5,02 L/min. Los registros de calibración indican una tolerancia del 0,20 %.
- Todos los volúmenes de recogida de muestras se fijaron en extracciones de aire de 30 minutos.
- Se activaron los ventiladores de mezcla de volumen bajo antes de la nebulización a fin de confirmar que las concentraciones en la cámara de pruebas eran homogéneas.



- Los ventiladores de mezcla se colocaron en un ángulo de 45 grados para fomentar la suspensión del bioaerosol y reducir las tasas de reducción de partículas naturales.
- La nebulización para las exposiciones de la prueba vírica y la de control se llevaron a cabo de la misma forma.
- Los cassettes de muestra se retiraron manualmente del sistema de recogida, se almacenaron después de cada punto temporal y se sustituyeron por nuevos cassettes.
- Al extraer los cassettes en cada punto temporal, se llevaron los conjuntos de cassettes a un armario de bioseguridad adyacente y se agruparon.
- Se completaron dos controles y tres exposiciones víricas usando la misma metodología.

GENERACIÓN DEL BIOAEROSOL:

Para las exposiciones víricas y de control, se rellenó el nebulizador con la misma cantidad de reservas de virus ($4,02 \times 10^6$ TCID₅₀ por mL) y se nebulizó a un caudal de 1 mL/min durante 25 minutos. El nebulizador se accionaba mediante aire atmosférico local sin tratar. Se pesó el volumen de reservas víricas restantes del nebulizador después de cada finalización a fin de confirmar la misma cantidad reserva vírica que se nebulizó.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE BIOAEROSOL:

Para obtener muestras de aire, se utilizaron cuatro dispositivos de vacío programables Gillian 10i diferentes. Los muestreadores de aire los calibró el fabricante en septiembre de 2020 y se inspeccionaron los certificados antes de usarlo. Se confirmaron las recogidas de los volúmenes de las muestras de aire antes de utilizarlas con un dispositivo Gilian Gilibrator 2 SN- 200700-12 y un generador de burbujas de alto flujo SN-2009012-H. Los muestreadores de aire se utilizaban junto con cassettes sellados extraíbles, que se retiraron manualmente después de cada punto temporal de la obtención de muestras. Los cassettes contaban con un disco de filtración interno delicado para recoger las muestras víricas. Cada muestreador de aire recogió aproximadamente 25 litros de aire por cada punto temporal.

ANTECEDENTES DE LA CEPA VÍRICA:

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) se encargaron de depositar el siguiente reactivo y se obtuvo a través de BEI Resources, BIAID, NIH SARS-Related Coronavirus 2, Isolate USA-CA1/2020, NR- 52382.



DESPUÉS DE LA DESCONTAMINACIÓN:

Al terminar cada prueba de exposición vírica, se activaba el sistema de UV en el interior de la cámara de pruebas durante 30 minutos. Pasados los 30 minutos de exposición UV, la cámara se fumigaba con una mezcla de gas de peróxido de hidrógeno seguido de una purga de aire de 30 minutos. Todo el equipo se limpiaba al final de cada día con una solución con alcohol al 70 %. Los conductos de recogida se humedecían con una mezcla de baños de lejía durante 30 minutos y, a continuación, se enjuagaba con agua desionizada. El nebulizador y las bombas de recogida de vacío se descontaminaban con mezclas de peróxido de hidrógeno.

PROCEDIMIENTO TCID50:

Materiales y equipo:

- Armario de seguridad biológica certificado
- Micropipeta y puntas resistentes de aerosol desechables y estériles: 20 µL, 200 µL, 1000 µL
- Microscopio invertido
- Tubos de dilución
- Hemocitómetro con cubreobjetos
- Medios celulares para infección
- Medios de cultivo apropiados para la estirpe celular
- Solución Trypan Blue 0,4 %
- Paños sin pelusa saturados con alcohol isopropílico al 70 %
- Incubador de CO₂ fijado a 37 °C o 34 °C u otra temperatura indicada

Procedimiento:

1. El día antes de la infección, prepare 96 placas con pocillos sembrando cada pocillo con células Vero E6 en DMEM más 7,5 % de suero bovino fetal, 4 mM de glutamina y antibióticos.
2. El día de la infección, realice las diluciones de la muestra del virus en solución salina tamponada con fosfato (PBS).
3. Realice una serie de diluciones en una proporción de 1:10 de la muestra del virus original. El primer tubo con 2,0 mL de PBS y los siguientes con 1,8 mL.
4. Mezcle en un agitador vorticial las muestras víricas, transfiera 20 µL de virus al primer tubo, agite vorticialmente y deseche la punta.
5. Con la nueva punta, diluya en serie las puntas sucesivas transfiriendo 200 µL.



Adiciones de diluciones de virus a las células:

1. Etiquete la tapa de la placa de 96 pocillos dibujando líneas de cuadrícula para definir los cuadruplicados y el número de cada cuadrícula para que se correspondan con la muestra de virus, y etiquete las filas de la placa para la dilución que se introducirá en la placa.
2. Incluya cuatro pocillos negativos en cada placa que no se vaya a infectar.
3. Retire todo salvo 0,1 mL del medio de cada pocillo mediante aspiración por vacío.
4. Empezando con la muestra más diluida, añada 0,1 mL de la dilución del virus a cada uno de los pocillos cuadruplicados para esa dilución.
5. Infecte cuatro pocillos por dilución, de adelante hacia atrás.
6. Deje que las células absorban el virus a 37 °C durante 2 horas.
7. Tras la absorción, retire el inóculo del virus. Empiece con la solución más diluida y vaya hacia atrás.
8. Agregue 0,5 mL de medio de infección a cada pocillo con cuidado de no tocar los pocillos con la pipeta.
9. Coloque las placas a 37 °C y monitorice el efecto citopático (CPE, por sus siglas en inglés) usando el microscopio invertido durante un periodo de 1-4 semanas.
10. Registre el número de pocillos positivos y negativos.

CONTROL:

Se llevaron a cabo dos pruebas de control sin la unidad NV1050™ en la cámara de pruebas. Las muestras de control se tomaron 30 minutos después de terminar la nebulización, igual que con las pruebas de exposición vírica. La nebulización del medio vírico y los métodos de recogida fueron los mismos para el control que para la exposición vírica. Se utilizó la prueba de control para la comparación con los valores iniciales a fin de valorar la reducción vírica al utilizar el dispositivo NV1050™ en las pruebas de exposición con el objetivo de que se pudieran realizar los cálculos netos de la reducción. Durante la prueba de control, se utilizaron cuatro ventiladores de bajo volumen en cada esquina de la cámara de pruebas con el objetivo de garantizar una mezcla homogénea del aire. Durante el control, se controlaron la humedad relativa y la temperatura. Antes de secuenciar las exposiciones víricas, se confirmó que la temperatura y la humedad estaban en un intervalo relativo al control de ± 5 %.

EXPOSICIÓN VÍRICA:

Se utilizó el patógeno de exposición, SARS-CoV-2 USA-CA1/2020, para analizar la eficacia del dispositivo NV1050™. Durante las pruebas de exposición, se monitorizó la presión de la cámara de exposición para confirmar que ninguna parte de la cámara presentaba fugas. Se completó la prueba de eficacia con bioaerosol en tres estudios distintos con el patógeno activo para crear una referencia de los datos. El dispositivo NV1050™ se colocó en el mismo lugar en cada exposición vírica y se controló de la misma manera. Se utilizaron cuatro ventiladores de mezcla de bajo volumen durante toda la prueba de control y la prueba del patógeno vírico. El tiempo de la muestra fue 30 minutos después de terminar la nebulización. El muestreo se produjo usando cuatro muestreadores de volumen de aire automáticos que funcionaron al mismo tiempo en cada recogida. Los muestreadores se configuraron previamente para que se apagaran de forma automática 30 minutos después de la recogida. Las recogidas se realizaron con el equipo utilizando los filtros cubiertos con los medios víricos para lograr una captura y estabilidad del patógeno máximas. Las muestras obtenidas se enviaron al personal del laboratorio para agruparlas después del punto temporal de la recogida.

**RESERVA DE VIRUS: SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 (BEI NR-52382)**

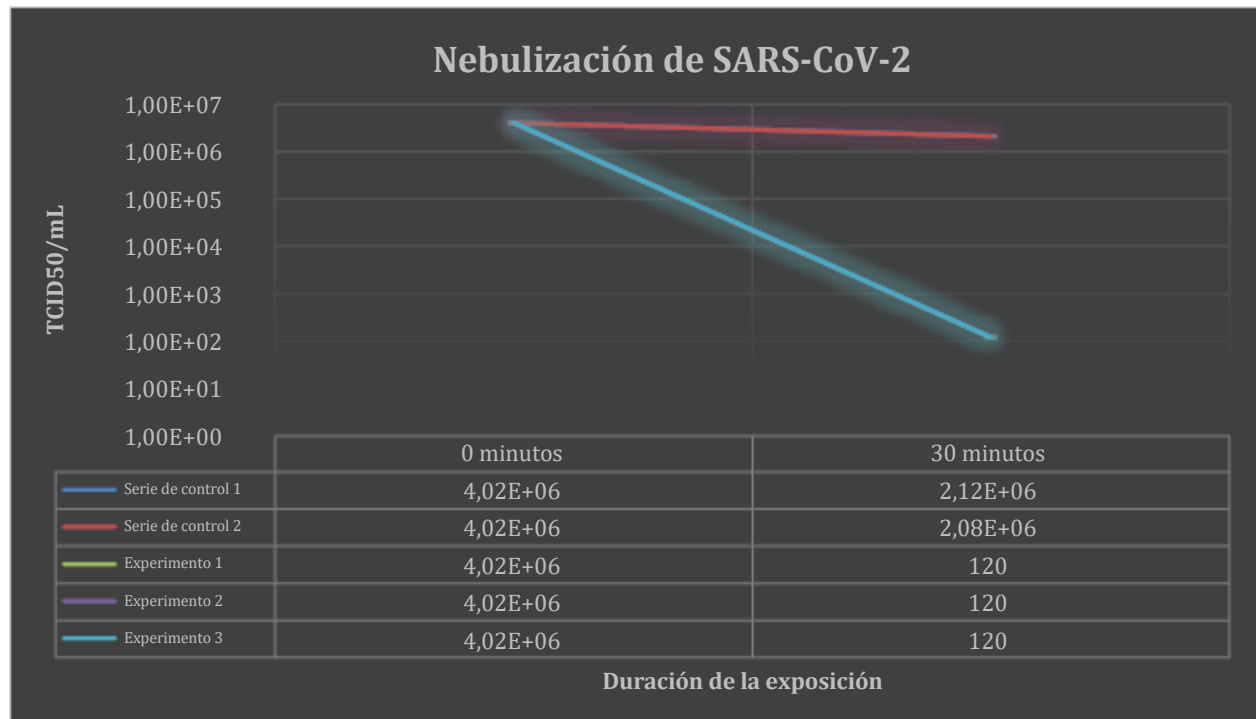
PRUEBA	ESPECIFICACIONES	RESULTADOS
Identificación mediante infectividad en células Vero 6	Redondeo y desprendimiento celular	Redondeo y desprendimiento celular
Secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés) del genoma completo usando la plataforma Illumina® iSeq™ 100 (Aprox. 940 nucleótidos)	≥98 % de identificación con SARS- CoV 2, aislado USA- CA1/2020 GenBank: MN994467.1 ≥98 % de identificación con SARS- CoV 2, cepa FDA-ARGOS_983 aislado USA-CA1/2020 GenBank: MT246667.1	99,9 % de identificación con SARS- CoV 2, aislado USA-CA1/2020 GenBank: MN994467.1 100 % de identificación con SARS-CoV 2, cepa FDAARGOS_983 aislado USA-CA1/2020 GenBank: MT246667.1
Titule con TCID50 en células Vero E6 mediante efecto citopático	Resultados del informe	2,8 × 10 ⁵ TCID50 por mL en 5 días a 37 °C y 5 % de CO ₂
Esterilidad (incubación de 21 días) Caldo de cultivo de Harpos HTYE, aerobio Caldo de cultivo de agar con tripticasa de soja, aerobio Caldo de cultivo de Sabourad, aerobio Caldo de cultivo de agar con sangre ovina, aerobio Caldo de cultivo de agar con sangre ovina, anaerobio Caldo de cultivo de tioglicolato, anaerobio DMEM con 10 % de suero bovino fetal	Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo	Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo
Esterilidad (incubación de 21 días) Caldo de cultivo de Harpos HTYE, aerobio Caldo de cultivo de agar con tripticasa de soja, aerobio Caldo de cultivo de Sabourad, aerobio Caldo de cultivo de agar con sangre ovina, aerobio Caldo de cultivo de agar con sangre ovina, anaerobio Caldo de cultivo de tioglicolato, anaerobio DMEM con 10 % de suero bovino fetal	Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo	Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo Cultivo negativo
Contaminación por micoplasma Cultivo de caldo y agar Detección de ADN por PCR del extracto Ácido nucleico del artículo de prueba	Sin hallazgos Sin hallazgos	Sin hallazgos Sin hallazgos



Nebulización de medios víricos:

Las muestras de control se llevaron a cabo de la misma forma que la prueba vírica en los puntos temporales y la frecuencia de recogida. Para este experimento, se utilizó una reserva de virus de SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 con una concentración de $4,02 \times 10^6$ TCID50/mL.

RESULTADOS:



Reducción en escala logarítmica decimal a los 30 minutos: 4,53

Reducción porcentual a los 30 minutos: 99,997 %



CONCLUSIONES:

El dispositivo NV1050™ funcionó según las especificaciones del fabricante y puso de manifiesto una drástica reducción del virus activo después de 30 minutos de exposición en forma de aerosol. No se pudo detectar el virus SARS-CoV-2 vivo después de 30 minutos (los niveles estaban por debajo del límite de cuantificación de 120 TCID50/mL).

Se hizo todo lo posible por simular un entorno de la vida real en la cámara a la vez que se tenían en cuenta las precauciones especiales necesarias al trabajar con un patógeno de nivel de bioseguridad 3. Teniendo presente la concentración de inicio del virus SARS-CoV-2 activo, el volumen nebulizado y el volumen inoculado, se podría asumir que la probabilidad de entrar en un entorno con esta cantidad de patógeno en un entorno de la vida real sería improbable.

Al nebulizar patógenos y recogerlos posteriormente, existen variables que no pueden contabilizarse completamente como, en concreto, la colocación del patógeno, el volumen de recogida, los puntos de recogida, la tasa de goteo, la saturación de la superficie, la destrucción vírica en el momento de la recogida, la destrucción vírica en el momento de la nebulización y posiblemente muchos otros. Se hizo todo lo posible por abordar estas limitaciones con el diseño y la ejecución de los ensayos, y todo ello se vio reflejado en la significativa recuperación del virus en la prueba de control.

Si tenemos en cuenta estas variables, el dispositivo NV1050™ logró una elevada tasa de eliminación en los primeros 30 minutos. La reducción en el aire fue considerable y coherente con las declaraciones del fabricante. En general, el dispositivo NV1050™ demostró una gran eficacia en la eliminación de SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 del aire respirable.

Descargo de responsabilidad

El laboratorio Innovative BioAnalysis, Inc. ("Innovative Bioanalysis") no está certificado ni cuenta con licencia de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos y no declara que las emisiones del equipo sean relativas a ozono, especies reactivas al oxígeno, compuestos orgánicos volátiles o subproductos de cualquier dispositivo NV1050™. Innovative Bioanalysis no hace declaraciones relativas a la eficacia general de cualquier NV1050™. Los resultados del experimento son aplicables únicamente al dispositivo usado en el ensayo, número de serie: NV1050- US20073100137. Los resultados solo son una representación del diseño del experimento descrito en este informe. Innovative Bioanalysis no hace declaraciones sobre la reproducibilidad de los resultados del experimento incluso con el mismo entorno de pruebas, cepa vírica, método de recogida, inoculación, nebulización, medios víricos, tipo de célula y procedimiento de cultivo. Innovative BioAnalysis no hace declaraciones de terceros y no asume ninguna responsabilidad de las consecuencias que puedan derivarse del uso, o la fiabilidad, de los resultados del experimento realizado por terceros.



DocuSigned by:
Dana Yee
7D5A69A0907947B...

06-04-2021

Dr. Dana Yee M.D
Patólogo clínico y director médico

Fecha

DocuSigned by:
Sam Kabbani
8B4B282DF4B34A3...

05-04-2021

Sam Kabbani, MS, BS, MT(ASCP), CLS
Director científico, Innovative Bioanalysis

Fecha

DocuSigned by:
Albert Brockman
06DF5C77A0D2400...

05-04-2021

Albert Brockman
Director de Bioseguridad, Innovative Bioanalysis

Fecha

DocuSigned by:
Kevin Noble
5DF2797BAA78421...

05-04-2021

Kevin Noble
Director de Operaciones, Innovative Bioanalysis

Fecha