



**Innovative Bioanalysis, Inc.**  
**3188 Airway Ave Suite D**  
**Costa Mesa, CA 92626**  
**www.InnovativeBioanalysis.com**  
**E-mail : Albert.Brockman@innovativebioanalysis.com**

**SARS-CoV-2 USA-CA1/2020**

**CLIENT : NOVAERUS**

**PROJET : AÉROSOL AMBIANT**

**PRODUIT : NV1050**

**N° DE LICENCE CAP : 886029801**

**N° DE LICENCE CLIA : O5D0955926**

**ID D'ÉTAT : CLF 00324630**

**VIRUS PROVOQUÉ : SARS-CoV-2 USA-CA1/2020**



## **RÉSUMÉ : EFFICACITÉ DU DISPOSITIF NOVAERUS NV1050™ CONTRE LE SARS-CoV-2 EN AÉROSOL**

**Contexte :** Cette étude in vitro a été conçue pour déterminer l'efficacité de l'unité NV1050™. Le produit est un purificateur d'air médical à recirculation fabriqué par NOVAERUS/WELLAIR et disponible sur le marché. L'unité NV1050™ autonome est conçue pour être placée séparément dans une pièce afin de diminuer la concentration de micro-organismes dans l'air lorsqu'elle est enclenchée. Pour cette provocation, nous avons utilisé l'agent pathogène SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 qui est à l'origine du COVID-19. Le coronavirus se transmet par voie aérienne et par un contact avec des surfaces contaminées. Il existe une demande pour des dispositifs de purification de l'air qui présentent une capacité avérée de réduire les agents pathogènes infectieux dans l'air, limitant ainsi le risque d'infection et de transmission chez l'être humain. NOVAERUS a fourni une unité NV1050™ autonome préemballée à des fins de test. Les procédures de test ont été respectées en suivant des procédures opérationnelles standard internes pour les provocations d'agents pathogènes viraux en aérosol et la décontamination ultérieure. L'ensemble des procédures opérationnelles standard et des processus internes respecte les recommandations et les directives GCLP.

### **DISPOSITIF FOURNI :**

FABRICANT : NOVAERUS

MODÈLE : NV1050™

N° DE SÉRIE NV1050-US20073100137



### **DISPOSITIF NV1050™ :**

Le dispositif est arrivé au laboratoire préemballé par le fabricant et a été inspecté dès son arrivée pour contrôler s'il n'était pas endommagé. Avant de démarrer la provocation, l'unité NV1050™ a été utilisée au cours d'un essai de plus de trois heures dans une chambre étanche renfermant des aérosols biologiques pour confirmer le bon fonctionnement de l'unité. Cette chambre était la même chambre BSL3 que celle utilisée pour les tests de provocation virale.



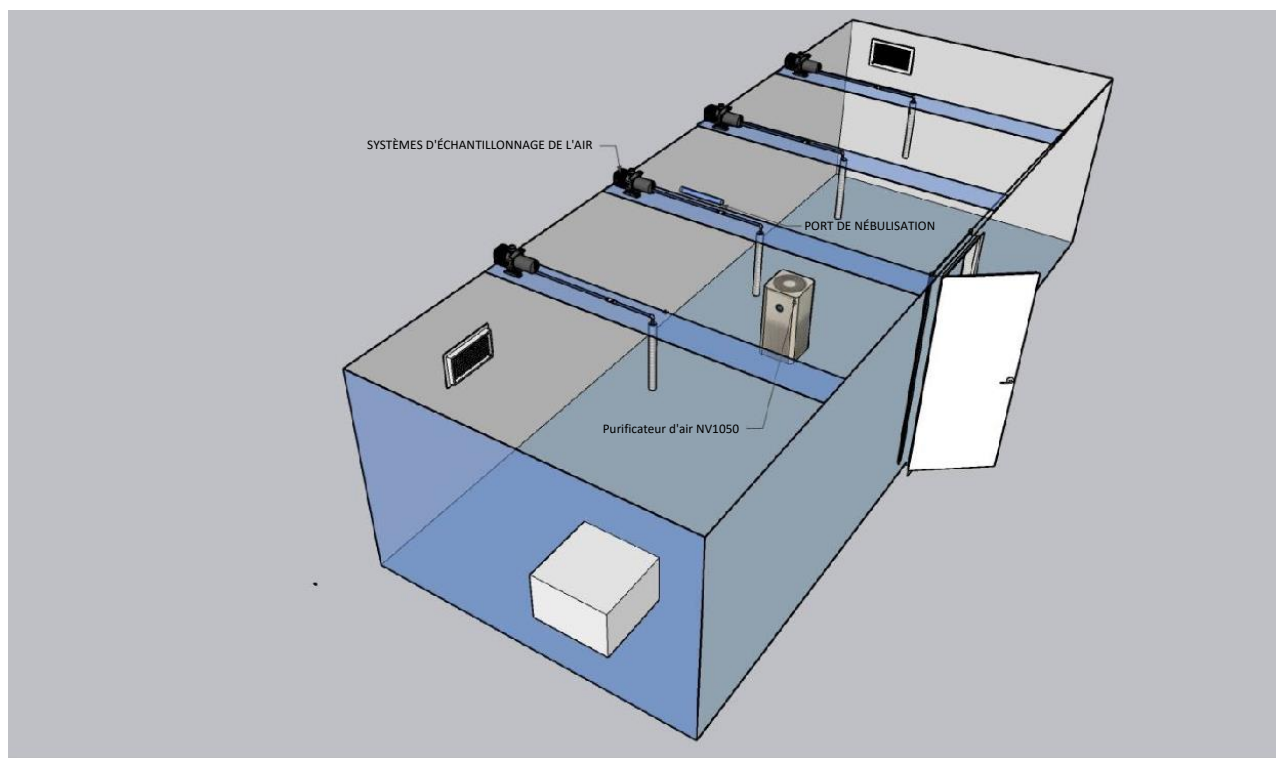
### **CHAMBRE D'ESSAI POUR TESTER LA PROVOCATION VIRALE :**

Il s'agissait d'une grande chambre d'essai à volume d'air étanche, composée de parois métalliques et d'un sol en époxy, conforme aux normes BSL3. La chambre a été conçue pour être complètement isolée de l'environnement extérieur afin d'éviter toute libération potentielle de l'élément testé dans l'atmosphère. Elle était équipée de quatre fenêtres d'observation étanches et d'une porte verrouillable pour l'entrée et la sortie. Ses dimensions globales étaient d'environ 2 x 2 x 6 mètres avec un volume de refoulement de 36 mètres cubes. Sur la base du volume en mètres cubes, la chambre contenait 36 245,56 litres d'air.

La chambre d'essai était équipée d'entrées et de sorties filtrées par un filtre HEPA, ainsi que d'un système UV-C actif dans tous les conduits. L'humidité et la température étaient contrôlées à l'intérieur de la chambre à l'aide d'un dispositif sans fil étalonné. Pour le test des échantillons d'air, la chambre était équipée de quatre sondes situées le long de l'axe central de la pièce et dépassant de 60 cm du plafond. Chaque sonde était connectée à un système programmable Gilian 10i avec des cassettes d'échantillonnage du lot n° 19766 fabriquées par Sensidyne. Un seul port de nébulisation d'aérosols biologiques se trouvait au centre du mur de six mètres situé en face des portes d'entrée. Le port de diffusion dépassait du mur de 60 cm et était relié à un système de nébulisation à compresseur programmable.

Avant le test, la chambre a été testée sous pression pour détecter les fuites, et des inspections visuelles ont été effectuées à l'aide d'un dispositif d'enfumage coloré. Tous les joints de la chambre ont été contrôlés, et tous les équipements utilisés ont subi un test pour contrôler leur bon fonctionnement. Pour les équipements étalonnés, les enregistrements d'étalonnage ont été contrôlés pour confirmer le bon fonctionnement.

## ENVIRONNEMENT DE TEST :



## RÉSUMÉ DE L'EXPÉRIENCE :

- Avant le test de contrôle initial et après chaque essai, la zone de test était décontaminée et préparée en respectant les procédures internes.
- La température pendant tous les tests était d'environ 22,8 °C, avec une humidité relative de 51 %.
- L'humidité relative et la température ont été relevées dans deux sections de la chambre pendant tous les tests pour s'assurer qu'il n'y avait pas plus de 3 % d'écart d'un côté ou de l'autre.
- L'unité NV1050™ a été placée au centre de la pièce pour chaque provocation virale.
- Les échantillonneurs d'air ont été étalonnés par le fabricant le 3 septembre 2020 et réglés à un débit standard de 5,02 l/min. Les enregistrements d'étalonnage indiquent une tolérance de 0,20 %.
- Tous les volumes d'échantillons prélevés ont été réglés sur des prélèvements d'air de 30 minutes.
- Des ventilateurs de mélange à faible volume ont été mis en marche avant la nébulisation pour contrôler l'homogénéité des concentrations dans la chambre d'essai.



- Ces ventilateurs de mélange sont restés allumés et positionnés à un angle de 45 degrés pour favoriser la suspension des aérosols biologiques et réduire les taux de descente naturelle des particules.
- La nébulisation pour les tests de contrôle et les provocations virales a été effectuée de la même manière.
- Les cassettes d'échantillonnage ont été retirées manuellement du système de prélèvement, stockées après chaque intervalle et remplacées par de nouvelles cassettes.
- Lors du retrait des cassettes à chaque intervalle, les ensembles de cassettes ont été placés dans une armoire de sécurité biologique adjacente et regroupés.
- Deux contrôles ont été effectués, et trois provocations virales ont été réalisées en utilisant la même méthodologie.

#### **GÉNÉRATION D'AÉROSOLS BIOLOGIQUES :**

Pour le contrôle et les provocations virales, le nébuliseur a été rempli avec la même quantité de stock viral ( $4,02 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> par ml), et une pulvérisation à un débit de 1 ml/min a été effectuée pendant 25 minutes. Le nébuliseur était alimenté par de l'air atmosphérique local non traité. Le volume de stock viral restant dans le nébuliseur a été pesé après chaque opération pour contrôler si la quantité nébulisée était identique.

#### **ÉCHANTILLONNAGE D'AÉROSOLS BIOLOGIQUES :**

Pour l'échantillonnage de l'air, quatre dispositifs à vide programmables Gillian 10i différents ont été utilisés. Les échantillonneurs d'air ont été étalonnés par le fabricant en septembre 2020, et les certificats ont été examinés avant leur utilisation. Les prélèvements de volumes d'échantillons d'air ont été contrôlés avant utilisation avec un dispositif Gilian Gilibrator 2 SN- 200700-12 et un générateur de bulles à haut débit SN-2009012-H. Les échantillonneurs d'air ont été utilisés en conjonction avec des cassettes étanches amovibles, qui ont été retirées manuellement après chaque intervalle d'échantillonnage. Les cassettes étaient munies d'un disque de filtration interne sensible pour prélever les échantillons viraux. Chaque échantillonneur d'air a prélevé environ 25 litres d'air par intervalle.

#### **CONTEXTE DE LA SOUCHE VIRALE :**

Le réactif suivant a été déposé par les Centers for Disease Control and Prevention (Centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies) et obtenu par le biais des ressources BEI, BIAID, le SARS-CoV-2 du NIH, l'isolat USA-CA1/2020 et le NR-52382.



### **DÉCONTAMINATION :**

À la fin de chaque test de provocation virale, le système UV à l'intérieur de la chambre d'essai a été activé pendant 30 minutes. Après 30 minutes d'exposition aux UV, la chambre a été embuée à l'aide d'un mélange gazeux de peroxyde d'hydrogène avant que l'air ne soit purgé pendant 30 minutes. Tous les équipements de test ont été nettoyés à la fin de chaque journée avec une solution d'alcool à 70 %. Les lignes de prélèvement ont été trempées dans un bain d'eau de Javel pendant 30 minutes, puis rincées à plusieurs reprises avec de l'eau déionisée. Le nébuliseur et les pompes de prélèvement à vide ont été décontaminés avec des mélanges de peroxyde d'hydrogène.

### **PROCÉDURE TCID50 :**

#### **Matériel et équipements :**

- Armoire de sécurité biologique certifiée
- Micropipette et embouts stériles jetables résistant aux aérosols (20 µL, 200 µL, 1 000 µL)
- Microscope inversé
- Tubes pour la dilution
- Hémocytomètre avec couvre-objet
- Milieu cellulaire pour l'infection
- Milieu de croissance adapté à la lignée cellulaire
- Solution de bleu trypan à 0,4 %
- Lingettes non pelucheuses imbibées d'alcool isopropylique à 70 %
- Incubateur à CO<sub>2</sub> réglé à 37 °C ou 34 °C, ou à toute autre température indiquée

#### **Procédure :**

1. Un jour avant l'infection, préparer des plaques 96 puits en ensemençant chaque puits avec des cellules Vero E6 dans un milieu DMEM, auquel il faut ajouter 7,5 % de sérum de veau foetal, 4 mm de glutamine et des antibiotiques.
2. Le jour de l'infection, diluer l'échantillon viral dans une solution saline tamponnée au phosphate (SSTP).
3. Effectuer une série de dilutions avec un ratio de 1:10 de l'échantillon viral d'origine. Le premier tube doit contenir 2 ml de SSTP et les tubes suivants, 1,8 ml.
4. Passer les échantillons viraux à l'agitateur Vortex, transférer 20 µL de virus dans le premier tube, repasser à l'agitateur Vortex, jeter l'embout.
5. Avec un nouvel embout, diluer en série les embouts suivants en transférant 200 µL.



#### **Additions de dilutions virales aux cellules :**

1. Étiqueter le couvercle de la plaque 96 puits en traçant des lignes de quadrillage pour délimiter en quatre puits, numéroter chaque grille afin qu'elle corresponde à l'échantillon viral et étiqueter les rangées de la plaque pour la dilution correspondante.
2. Inclure quatre puits négatifs sur chaque plaque qui ne seront pas infectés.
3. Retirer le contenu de chaque puits par aspiration, en conservant toutefois 0,1 ml du milieu.
4. En commençant par l'échantillon le plus dilué, ajouter 0,1 ml de la dilution virale dans chacune des quatre séries de puits pour cette dilution.
5. Infecter quatre puits par dilution, en reculant.
6. Laisser les cellules s'imprégner du virus à 37 °C pendant deux heures.
7. Après l'absorption, retirer l'inoculum viral. Commencer par le plus dilué, en reculant.
8. Ajouter 0,5 ml de milieu infectieux dans chaque puits en veillant à ne pas toucher les puits avec la pipette.
9. Placer les plaques à 37 °C et surveiller l'effet cytopathologique à l'aide du microscope inversé sur une période d'une à quatre semaines.
10. Enregistrer le nombre de puits positifs et négatifs.

#### **CONTRÔLE :**

Deux tests de contrôle ont été effectués sans l'unité NV1050™ dans la chambre d'essai. Les échantillons de contrôle ont été prélevés 30 minutes après la fin de la nébulisation, de la même manière que pour les essais de provocation virale. La nébulisation du milieu viral et les méthodes de prélèvement pour le contrôle étaient les mêmes que pour la provocation virale. Le test de contrôle a été utilisé comme base de comparaison pour évaluer la réduction virale lorsque le dispositif NV1050™ était enclenché au cours des essais de provocation, afin de permettre les calculs de réduction nette. Pendant le test de contrôle, quatre ventilateurs à faible volume ont fonctionné dans chaque coin de la chambre d'essai pour assurer un mélange homogène de l'air. Pendant le contrôle, la température et l'humidité relative ont été surveillées. Avant de procéder aux provocations virales, la température et l'humidité ont été confirmées dans la fourchette du contrôle (+/- 5 %).

#### **PROVOCATION VIRALE :**

L'agent pathogène de provocation SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 a été utilisé pour tester l'efficacité du dispositif NV1050™. Au cours des tests de provocation, la pression dans la chambre a été contrôlée pour vérifier qu'il n'y avait pas de fuites. Le test d'efficacité des aérosols biologiques a été réalisé en trois essais distincts avec l'agent pathogène actif afin de créer une base de données. Le dispositif NV1050™ a été placé dans la même position pour chaque provocation virale et a été utilisé de la même manière. Quatre ventilateurs de mélange à faible volume ont été utilisés pendant toute la durée du test de contrôle et du test de l'agent pathogène viral. L'échantillonnage a été réalisé 30 minutes après la fin de la nébulisation. Il a été effectué à l'aide de quatre échantillonneurs de volume d'air automatiques qui ont fonctionné simultanément pour chaque prélèvement. Les échantillonneurs étaient préréglés pour s'arrêter automatiquement après 30 minutes de prélèvement. Les prélèvements ont été effectués avec l'équipement utilisant des filtres recouverts du milieu viral pour garantir un piégeage et une stabilité maximum des agents pathogènes. Les échantillons prélevés ont été remis au personnel du laboratoire pour être mis en commun après chaque intervalle de prélèvement.

**STOCK VIRAL : SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 (BEI NR-52382)**

TEST	CARACTÉRISTIQUES	RÉSULTATS
Identification par l'infectivité dans les cellules Vero 6	Arrondissement et détachement des cellules	Arrondissement et détachement des cellules
Séquençage de nouvelle génération (NGS) de l'intégralité du génome à l'aide de la plateforme Illumina® iSeq™ 100  (Environ 940 nucléotides)	≥ 98 % d'identité avec le SARS-CoV-2, isolat USA-CA1/2020 GenBank : MN994467.1  ≥ 98 % d'identité avec le SARS-CoV-2, souche FDAARGOS_983, isolat USA-CA1/2020. GenBank : MT246667.1	99,9 % d'identité avec le SARS-CoV-2, isolat USA-CA1/2020 GenBank : MN994467.1  100 % d'identité avec le SARS-CoV-2, souche FDAARGOS_983, isolat USA-CA1/2020 GenBank : MT246667.1
Titrage par la procédure TCID50 dans les cellules Vero E6 en fonction de l'effet cytopathique	Résultats du rapport	2,8 X 10 <sup>5</sup> TCID50 par ml pendant cinq jours à 37 °C et 5 % de CO <sub>2</sub>
Stérilité (incubation de 21 jours) Bouillon de HTYE Harpo, aérobie Bouillon de soja Trypticase, aérobie Bouillon de Sabouraud, aérobie Gélose de sang de mouton, aérobie Gélose de sang de mouton, anaérobie Bouillon de thioglycolate, anaérobie Milieu DMEM avec 10 % de sérum de veau foetal	Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance	Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance
Stérilité (incubation de 21 jours) Bouillon de HTYE Harpo, aérobie Bouillon de soja Trypticase, aérobie Bouillon de Sabouraud, aérobie Gélose de sang de mouton, aérobie Gélose de sang de mouton, anaérobie Bouillon de thioglycolate, anaérobie Milieu DMEM avec 10 % de sérum de veau foetal	Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance	Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance Aucune croissance
Contamination par des mycoplasmes Culture de gélose et de bouillon Détection d'ADN par PCR de l'acide nucléique extrait de l'article de test	Aucun ADN détecté Aucun ADN détecté	Aucun ADN détecté Aucun ADN détecté

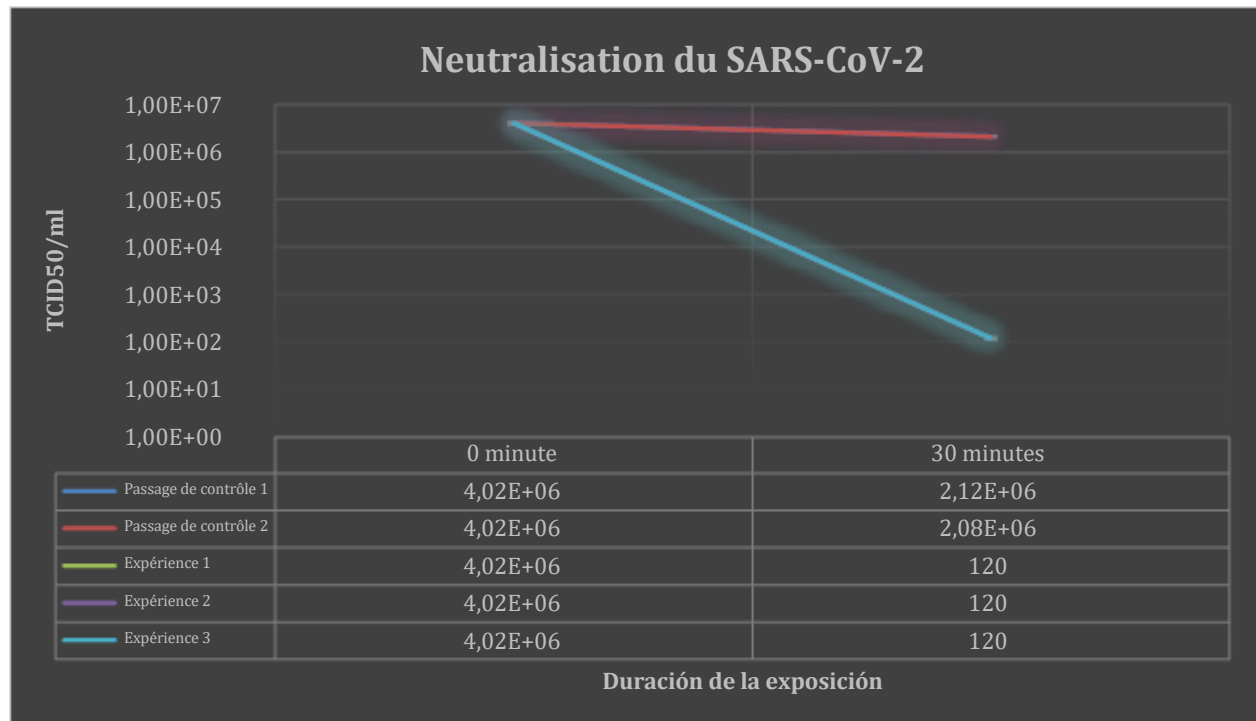




### Aérosolisation du milieu viral :

Les échantillons de contrôle ont été prélevés de la même manière que le test viral, à des intervalles et à un taux de prélèvement identiques. Un stock viral de SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 avec une concentration de  $4,02 \times 10^6$  TCID50/ml a été utilisé pour cette expérience.

### RÉSULTATS :



**Réduction log10 au bout de 30 minutes : 4,53**

**Réduction en pourcentage au bout de 30 minutes : 99,997 %**



## **CONCLUSIONS :**

Le dispositif NV1050™ a fonctionné conformément aux spécifications du fabricant et a démontré une réduction spectaculaire du virus actif après 30 minutes d'exposition sous forme d'aérosol. Le virus SARS-CoV-2 actif n'était pas détectable après 30 minutes, (les niveaux étaient inférieurs à la limite de quantification de 120 TCID50/ml).

Tout a été mis en œuvre pour simuler un environnement réel dans la chambre, tout en tenant compte des précautions spéciales nécessaires pour travailler avec un agent pathogène de niveau 3 de biosécurité. Compte tenu de la concentration de départ du virus SARS-CoV-2 actif, du volume en aérosol et du volume inoculé, nous pouvons supposer que la probabilité d'entrer dans un environnement contenant cette quantité d'agent pathogène dans des circonstances réelles est faible.

Lors de l'aérosolisation d'agents pathogènes et du prélèvement de ces derniers, certaines variables ne peuvent pas être entièrement prises en compte, notamment le placement de l'agent pathogène, le volume et les points de prélèvement, le débit en gouttes, la saturation de surface, ou encore la destruction virale lors du prélèvement ou de la nébulisation. Tout a été mis en œuvre pour tenir compte de ces contraintes dans la conception et l'exécution des essais, et ces efforts se reflètent dans la récupération importante du virus dans le test de contrôle.

En tenant compte de ces variables, le dispositif NV1050™ a pu éliminer une grande quantité de virus dans les 30 premières minutes. La réduction dans l'air était significative et conforme aux affirmations du fabricant. Globalement, le dispositif NV1050™ a montré une efficacité remarquable dans l'élimination du SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 de l'air respirable.

## **Clause de non-responsabilité**

Le laboratoire Innovative BioAnalysis, Inc. (« Innovative Bioanalysis ») n'est pas certifié ni autorisé par l'Agence américaine de protection de l'environnement et ne donne aucune garantie sur les émissions des équipements relativement à l'ozone, aux espèces réactives de l'oxygène, aux composés organiques volatils ou aux sous-produits de tout dispositif NV1050™.

Innovative Bioanalysis ne donne aucune garantie quant à l'efficacité globale de tout dispositif NV1050™. Les résultats de l'expérience sont uniquement applicables au dispositif utilisé au cours de l'essai, dont le numéro de série est le suivant : NV1050-US20073100137. Les résultats sont uniquement représentatifs du plan d'expérience décrit dans le présent rapport.

Innovative Bioanalysis ne donne aucune garantie quant à la reproductibilité des résultats de l'expérience étant donné la variation possible desdits résultats, et ce, même avec un environnement de test, une souche virale, une méthode de prélèvement, une inoculation, une nébulisation, un milieu viral, un type de cellule et une procédure de culture identiques. Innovative Bioanalysis ne donne aucune garantie à des tiers et ne saurait être tenu responsable des conséquences découlant de l'utilisation des résultats de l'expérience par des tiers ou de la confiance qu'ils y accordent.

# INNOVATIVE BIOANALYSIS

creating solutions | getting results

DocuSigned by:  
*Dana Yee*  
7D5A69A0907947B...

06/04/2021

---

**Dr Dana Yee M.D**  
**Pathologiste clinique et directrice médicale**

---

**Date**

DocuSigned by:  
*Sam Kabbani*  
8B4B282DF4B34A3...

05/04/2021

---

**Sam Kabbani, MS, BS, MT(ASCP), CLS**  
**Agent scientifique en chef, Innovative Bioanalysis**

---

**Date**

DocuSigned by:  
*Albert Brockman*  
06DF5C77A0D2400...

05/04/2021

---

**Albert Brockman**  
**Agent de sécurité biologique en chef, Innovative Bioanalysis**

---

**Date**

DocuSigned by:  
*Kevin Noble*  
5DF2797BAA78421...

05/04/2021

---

**Kevin Noble**  
**Chef des opérations, Innovative Bioanalysis**

---

**Date**