



**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**

**CLIENTE: NOVAERUS**

**PROGETTO: AEROSOL IN AMBIENTI**

**PRODOTTO: NV1050**

**N. LIC. CAP: 886029801**

**N. LIC. CLIA: O5D0955926**

**STATE ID: CLF 00324630**

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

# INNOVATIVE BIOANALYSIS

creating solutions | getting results

## **ABSTRACT: EFFICACIA DEL DISPOSITIVO NOVAERUS NV1050™ CONTRO SARS-CoV-2 AEROSOLIZZATO**

**Sfondo:** Il presente studio in vitro è stato concepito per stabilire l'efficacia dell'unità NV1050™. Il prodotto è un sistema medico a ricircolo per la purificazione dell'aria, disponibile in commercio e realizzato da NOVAERUS/WELLAIR. L'unità NV1050™ è destinata alla libera installazione in un ambiente allo scopo di ridurre, una volta in funzione, la concentrazione di microrganismi nell'aria. Per questo challenge test è stato utilizzato il patogeno SARS-CoV-2 USA-CA1/2020, responsabile del COVID-19. Il coronavirus si può diffondere attraverso l'aria e il contatto con superfici contaminate. È in crescita la richiesta di dispositivi purificatori d'aria in grado di abbattere i patogeni infettivi presenti nell'aria, riducendo in tal modo il rischio di infezione e trasmissione tra le persone. NOVAERUS ha fornito un'unità NV1050™ pre-confezionata per libera installazione a scopo di test. I test sono stati condotti applicando SOP (procedure operative standardizzate) interne per challenge test con patogeni virali aerosolizzati e successiva decontaminazione. Tutti i processi e le SOP interne sono conformi alle linee guida e alle raccomandazioni GCLP.

### **APPARECCHIATURA FORNITA:**

PRODUTTORE: NOVAERUS

MODELLO: NV1050™

N. DI SERIE NV1050-US20073100137



### **APPARECCHIATURA NV1050™:**

L'apparecchiatura è giunta in laboratorio pre-confezionata dal produttore ed è stata sottoposta ad ispezione all'arrivo per escludere la presenza di danni. Prima di iniziare il challenge test, l'unità NV1050™ è stata messa in funzione per più di 3 ore con cicli a vuoto in una camera di bioaerosol a tenuta stagna per verificarne il corretto funzionamento. La camera di bioaerosol era la stessa camera BSL3 utilizzata per i challenge test virali.



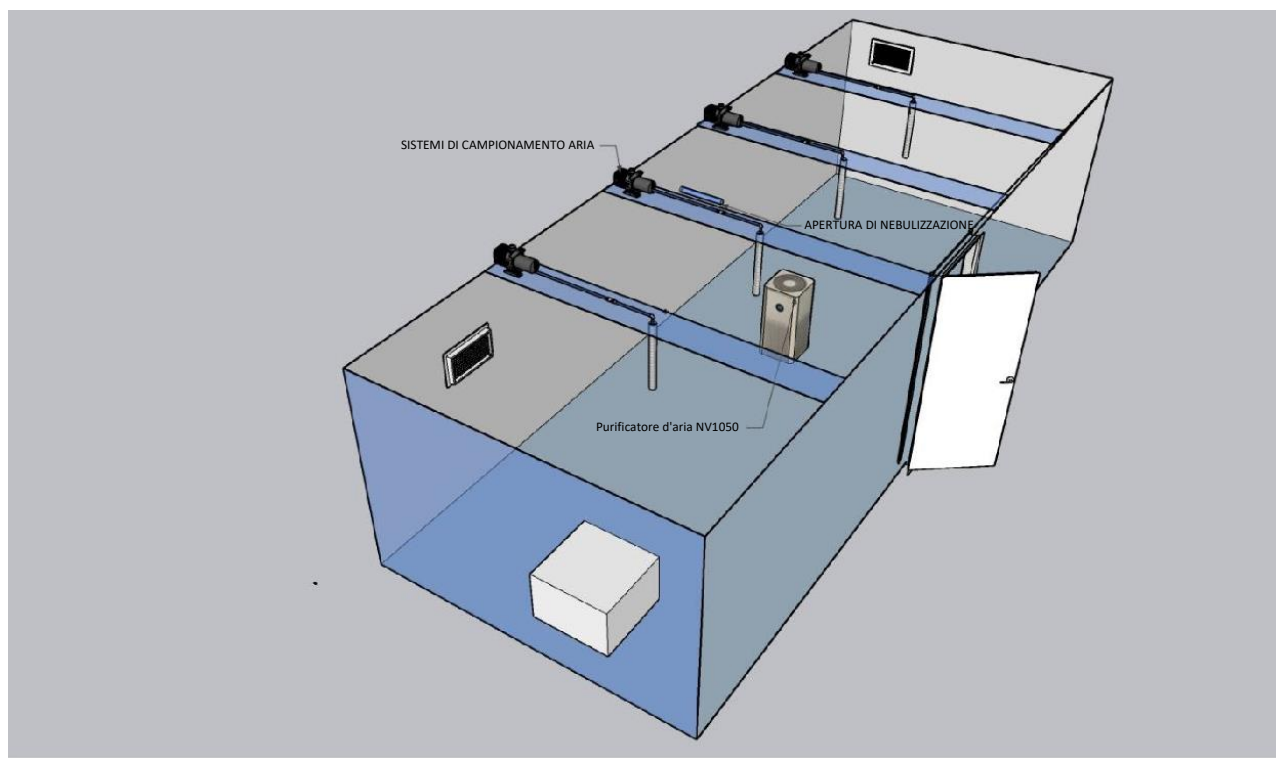
### **CAMERA PER CHALLENGE TEST VIRALI:**

La camera di test era un'ampia camera a volume d'aria a tenuta stagna, con pareti metalliche e pavimento epossidico, conforme agli standard BSL3. La camera è stata progettata a tenuta stagna completa rispetto all'ambiente esterno, al fine di evitare potenziali fuoriuscite di sostanze testate nell'atmosfera. La camera di test era dotata di 4 finestre sigillate e di una porta con serratura per ingresso e uscita. Le dimensioni complessive della camera erano di circa 8'x8'x20' con un volume di occupazione di 1280 piedi cubi. In base al volume in piedi cubi, la camera disponeva di 36.245,56 litri di aria.

La camera disponeva inoltre di ingressi e scarico con filtri HEPA, accoppiati ad un sistema UV-C attivo in tutte le tubazioni. Temperatura e umidità sono state monitorate all'interno della camera con un dispositivo wireless calibrato. Per il test di campioni d'aria erano presenti 4 sonde disposte lungo la linea mediana della camera e sporgenti dal soffitto verso il basso di 24". Ciascuna sonda era collegata ad un sistema programmabile Gilian 10i con cassette di campionamento provenienti dal lotto n. 19766 di Sensidyne. Una singola apertura di nebulizzazione di bioaerosol si trovava al centro della parete da 20' di fronte alle porte d'ingresso. L'apertura di diffusione sporgeva di 24" dalla parete ed era collegata ad un sistema nebulizzatore con compressore programmabile.

Prima di iniziare il test, la camera è stata sottoposta a prova sotto pressione per verificare l'assenza di perdite e ad ispezione visiva con un dispositivo fumogeno. È stata verificata la tenuta stagna della camera e tutte le apparecchiature utilizzate sono state inoltre sottoposte a test funzionale per controllare le condizioni operative. Per le apparecchiature calibrate sono stati controllati i registri di calibrazione per verificare lo stato operativo.

## AMBIENTE DI TEST:



## SINTESI DELL'ESPERIMENTO:

- Prima del controllo iniziale e dopo ogni ciclo di prova, l'area di test è stata decontaminata e preparata in conformità con le procedure interne.
- La temperatura in tutti i cicli di test era di circa 73 °F +/- 2 °F o 22,8 °C, con il 51% di umidità relativa.
- Umidità relativa e temperatura sono state rilevate in due sezioni della camera nel corso di tutti i test al fine di verificare l'assenza di uno scostamento superiore al 3% da ogni lato.
- L'unità NV1050™ è stata collocata al centro dell'ambiente per ciascun challenge test virale.
- I campionatori d'aria sono stati calibrati dal produttore in data 3 settembre 2020 ed impostati ad una portata standard di 5,02 l/min. I registri di calibrazione riportano una tolleranza dello 0,20%.
- Tutti i volumi di campionamento sono stati impostati per prelievi d'aria ogni 30 minuti.
- Prima della nebulizzazione sono stati attivati ventilatori di ricircolo a basso volume al fine di verificare l'omogeneità delle concentrazioni nella camera di test.



- I ventilatori di ricircolo sono rimasti accesi e posizionati con un angolo di 45 gradi per promuovere la sospensione di bioaerosol e ridurre la naturale velocità di discesa delle particelle.
- La nebulizzazione per le prove di controllo e i challenge test virali è stata eseguita in maniera analoga.
- Le cassette di campionamento sono state rimosse manualmente dal sistema di raccolta, conservate dopo ogni punto temporale e sostituite con cassette nuove.
- Al momento della rimozione ad ogni punto temporale, i kit di cassette sono stati spostati in un armadio di biosicurezza adiacente e raggruppati.
- Sono stati realizzati 2 test di controllo e 3 challenge test virali usando la stessa metodologia.

#### **GENERAZIONE DI BIOAEROSOL:**

Per i test di controllo e i challenge test virali il nebulizzatore è stato riempito con la stessa quantità di ceppo virale ( $4,02 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> per ml), nebulizzato con una portata di 1 ml/min per 25 minuti. Il nebulizzatore era azionato da aria atmosferica non trattata presente in loco. Il volume di ceppo virale rimanente nel nebulizzatore è stato pesato al termine di ogni prova per verificare la nebulizzazione della stessa quantità di ceppo virale.

#### **CAMPIONAMENTO DI BIOAEROSOL:**

Per il campionamento dell'aria sono stati usati 4 diversi dispositivi sotto vuoto programmabili Gillian 10i. I campionatori d'aria sono stati calibrati dal produttore a settembre 2020 e i certificati sono stati sottoposti ad ispezione prima dell'uso. Le raccolte in volume di campioni d'aria sono state confermate prima dell'uso con un Gilian Gilibrator 2 SN- 200700-12 e un generatore di bolle a flusso elevato SN-2009012-H. I campionatori d'aria sono stati utilizzati insieme a cassette sigillate rimovibili, rimosse manualmente dopo ogni punto temporale di campionamento. Le cassette erano dotate di un disco filtrante interno in materiale morbido per la raccolta dei campioni virali. Ciascun campionatore ha raccolto circa 25 litri d'aria per punto temporale.

#### **INFORMAZIONI SUL CEPPA VIRALE:**

Il reagente indicato di seguito è stato depositato dai centri statunitensi per il controllo e la prevenzione delle malattie (Centers for Disease Control and Prevention) e ottenuto attraverso BEI Resources, BIAID, NIH SARS-Related Coronavirus 2, isolato USA-CA1/2020, NR- 52382.



### **POST-DECONTAMINAZIONE:**

Al termine di ciascun challenge test virale, il sistema UV all'interno della camera di prova è stato attivato per 30 minuti. Dopo 30 minuti di esposizione ai raggi UV, la camera è stata nebulizzata con una miscela gassosa di perossido di idrogeno, con successivo spurgo dell'aria per 30 minuti. A fine giornata tutte le apparecchiature utilizzate per i test sono state pulite con una soluzione alcolica al 70%. I tubi destinati alla raccolta sono stati immersi in un bagno di ipoclorito di sodio per 30 minuti, quindi sciacquati ripetutamente con acqua deionizzata. Il nebulizzatore e le pompe di raccolta sotto vuoto sono stati decontaminati con miscele a base di perossido di idrogeno.

### **PROCEDURA TCID50:**

#### **Materiali e apparecchiature:**

- Armadio di sicurezza biologica certificato
- Micropipetta e puntali sterili monouso resistenti ad aerosol, 20 µl, 200 µl, 1000 µl.
- Microscopio invertito
- Provette per diluizione
- Emocitometro con vetrino coprioggetti
- Terreno cellulare per infezione
- Terreno di coltura adatto per la linea cellulare
- Soluzione di Trypan Blue allo 0,4%
- Panni non sfilaccianti saturati con alcool isopropilico al 70%.
- Incubatore CO<sub>2</sub> impostato a 37 °C o 34 °C o altra temperatura indicata.

#### **Procedura:**

1. Un giorno prima dell'infezione, preparare le piastre da 96 pozzetti seminando in ciascun pozzetto cellule Vero E6 in DMEM più siero fetale bovino al 7,5%, glutammina 4mM e antibiotici.
2. Il giorno dell'infezione, eseguire diluizioni del campione di virus in PBS.
3. Eseguire una serie di diluizioni 1:10 del campione di virus originario, la prima provetta con 2,0 ml di PBS e le successive con 1,8 ml.
4. Agitare con vortex i campioni virali, trasferire 20 µl del virus nella prima provetta, agitare con vortex, gettare il puntale.
5. Inserire un puntale nuovo, diluire in serie i campioni successivi trasferendo 200 µl.

**Aggiunta di diluizioni di virus alle cellule:**

1. Etichettare il coperchio della piastra da 96 pozzetti disegnando griglie per indicare i test in quadruplicato, numerare ciascuna griglia in modo che corrisponda al campione di virus ed etichettare le file per la diluizione che verranno piastrate.
2. Includere in ciascuna piastra 4 pozzetti negativi che non verranno infettati.
3. Rimuovere tutto il terreno di coltura, tranne 0,1 ml, da ciascun pozzetto mediante aspirazione sotto vuoto.
4. Partendo dal campione maggiormente diluito, aggiungere 0,1 ml di diluizione di virus a ciascuno dei pozzetti in quadruplicato per la diluizione in oggetto.
5. Infettare 4 pozzetti per ogni diluizione, andando a ritroso.
6. Lasciare che il virus venga assorbito dalle cellule a 37 °C per 2 ore.
7. Dopo l'assorbimento rimuovere l'inoculo di virus. Iniziare da quello maggiormente diluito e andare a ritroso.
8. Aggiungere 0,5 ml di terreno di infezione a ciascun pozzetto, evitando il contatto della pipetta con i pozzetti.
9. Porre le piastre a 37 °C e monitorare l'effetto citopatico con il microscopio invertito per un periodo da 1 a 4 settimane.
10. Registrare il numero di pozzetti positivi e negativi.

**CONTROLLO:**

Sono stati condotti due test di controllo senza l'unità NV1050™ nella camera di prova. I campioni di controllo sono stati prelevati dopo 30 minuti dal termine della nebulizzazione, analogamente ai challenge test virali. La nebulizzazione del terreno virale e i metodi di raccolta sono stati gli stessi sia per il test di controllo che per il challenge test virale. Il test di controllo è stato usato come riferimento comparativo per valutare la riduzione virale durante l'uso del dispositivo NV1050™ nei challenge test, con una netta diminuzione dei calcoli da eseguire. Nel corso del test di controllo sono stati azionati quattro ventilatori a basso volume posti nei quattro angoli della camera di prova al fine di garantire una miscelazione omogenea dell'aria. Durante il test sono state monitorate temperatura e umidità relativa. Prima di iniziare i challenge test virali si è verificato che temperatura e umidità rientrassero nell'intervallo relativo rispetto al controllo con uno scostamento +/- 5%.

**CHALLENGE TEST VIRALE:**

Il patogeno challenge, SARS-CoV-2 USA-CA1/2020, è stato usato per testare l'efficacia del dispositivo NV1050™. Nel corso dei challenge test la pressione nella camera di prova è stata monitorata per assicurare l'assenza di perdite. Il challenge test di efficacia con bioaerosol è stato condotto in tre prove distinte con il patogeno attivo per creare un riferimento di dati. Il dispositivo NV1050™ è stato collocato nella stessa posizione e utilizzato nello stesso modo in ogni challenge test virale. Quattro ventilatori di ricircolo a basso volume sono stati usati sia durante il test di controllo che durante la prova con patogeni virali. Il tempo di campionamento è stato di 30 minuti dal termine della nebulizzazione. Per il campionamento sono stati utilizzati 4 campionatori d'aria automatici operanti simultaneamente per ogni ciclo di raccolta. I campionatori sono stati preimpostati per spegnersi automaticamente dopo 30 minuti. Le raccolte sono state eseguite con l'apparecchiatura utilizzando filtri rivestiti di terreno di coltura virale per garantire la massima cattura di patogeni e stabilità. I campioni raccolti sono stati consegnati al personale di laboratorio per il raggruppamento dopo ogni punto temporale di raccolta.

**CEPPO VIRALE: SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 (N. BEI 52382)**

TEST	SPECIFICHE	RISULTATI
Identificazione mediante infettività in cellule Vero 6	Arrotondamento e distacco cellulare	Arrotondamento e distacco cellulare
Sequenziamento in parallelo (Next Generation Sequencing, NGS) di genoma completo con piattaforma Illumina® iSeq™ 100  (circa 940 nucleotidi)	≥ 98% identico a SARS-CoV 2, isolato USA-CA1/2020 GenBank: MN994467.1  ≥ 98% identico a SARS-CoV 2, ceppo FDAARGOS_983 isolato USA-CA1/2020 GenBank: MT246667.1	99,9% identico a SARS-CoV 2, isolato USA-CA1/2020 GenBank: MN994467.1  100% identico a SARS-CoV 2, ceppo FDAARGOS_983 isolato USA-CA1/2020 GenBank: MT246667.1
Titolazione con TCID50 in cellule Vero E6 mediante effetto citopatico	Report risultati	2,8 X 10 <sup>5</sup> TCID50 per ml in 5 giorni a 37 °C e 5% di CO <sub>2</sub>
Sterilità (21 giorni di incubazione) Brodo Harpos HTYE, aerobico Brodo Trypticase Soy, aerobico Brodo Sabourad, aerobico Sheep Blood Agar, aerobico Sheep Blood Agar, anaerobico Brodo di tioglicolato, anaerobico DMEM con 10% FBS	Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita	Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita
Sterilità (21 giorni di incubazione) Brodo Harpos HTYE, aerobico Brodo Trypticase Soy, aerobico Brodo Sabourad, aerobico Sheep Blood Agar, aerobico Sheep Blood Agar, anaerobico Brodo di tioglicolato, anaerobico DMEM con 10% FBS	Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita	Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita Nessuna crescita
Contaminazione da micoplasma Coltura in terreno agar e brodo Rilevamento DNA mediante PCR dell'acido nucleico estratto dalla sostanza di prova.	Assente Assente	Assente Assente

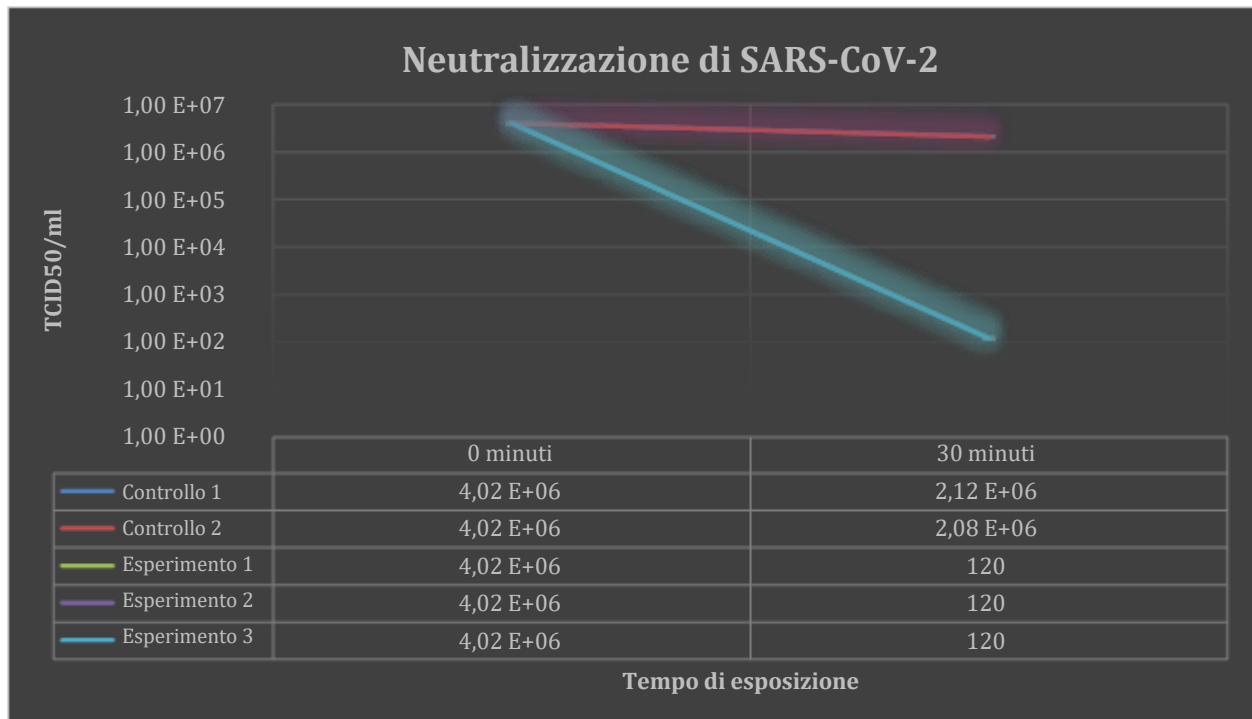




### Aerosolizzazione dei terreni virali:

I campioni di controllo sono stati trattati analogamente al test virale, negli stessi punti temporali e con la stessa velocità di raccolta. Per questo esperimento è stato usato un ceppo virale di SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 con una concentrazione di  $4,02 \times 10^6$  TCID50/ml.

### RISULTATI:



**Riduzione Log10 a 30 minuti: 4,53**

**Riduzione percentuale a 30 minuti: 99,997%**



## **CONCLUSIONI:**

Il dispositivo NV1050™ ha operato come da specifiche del produttore, dimostrando un drastico abbattimento del virus attivo dopo 30 minuti di esposizione sotto forma di aerosol. Il virus SARS-CoV-2 vivo non è risultato rilevabile dopo 30 minuti (i livelli erano inferiori al limite di quantificazione di 120 TCID50/ml).

Sono stati compiuti tutti gli sforzi possibili per simulare un ambiente reale nella camera di prova, tenendo conto al contempo delle speciali precauzioni necessarie in presenza di un patogeno con livello di biosicurezza 3. Considerando la concentrazione iniziale del virus SARS-CoV-2 attivo, il volume aerosolizzato e il volume inoculato, si potrebbe ritenere improbabile l'eventualità di accedere ad un ambiente con una tale quantità di patogeno in una circostanza reale.

Durante l'aerosolizzazione e la raccolta di patogeni, ci sono variabili di cui non è possibile tenere conto completamente, nello specifico la posizione del patogeno, il volume di raccolta, i punti di raccolta, il tasso di riduzione, la saturazione delle superfici, la distruzione del virus al momento della raccolta, la distruzione del virus al momento della nebulizzazione, ed eventualmente altre. È stato compiuto ogni ragionevole sforzo per gestire questi vincoli attraverso la strutturazione e l'esecuzione delle prove e questi sforzi si riflettono nella significativa ripresa del virus durante il test di controllo.

Considerando queste variabili, nei primi 30 minuti si è osservato un elevato livello di rimozione grazie al dispositivo NV1050™. La diminuzione nell'aria è risultata significativa significativo e coerente con quanto dichiarato dal produttore. Nel complesso, il dispositivo NV1050™ ha mostrato una sostanziale efficacia nella rimozione di SARS-CoV-2 USA-CA1/2020 dall'aria respirabile.

## **Clausola di esonero della responsabilità**

Il laboratorio Innovative BioAnalysis, Inc. ("Innovative Bioanalysis") non è certificato né munito di licenza EPA (United States Environmental Protection Agency, Agenzia statunitense per la produzione dell'ambiente) e non rilascia dichiarazioni per le proprie apparecchiature in merito alle emissioni di ozono, specie reattive dell'ossigeno, composti organici volatili o prodotti secondari di qualsiasi dispositivo NV1050™. Innovative Bioanalysis non rilascia dichiarazioni in merito all'efficacia globale dell'unità NV1050™. I risultati degli esperimenti si applicano unicamente al dispositivo utilizzato nel test, n. di serie: NV1050-US20073100137. I risultati sono rappresentativi unicamente della tipologia di esperimenti descritta nel presente report. Innovative Bioanalysis non rilascia dichiarazioni in merito alla riproducibilità dei risultati degli esperimenti data la possibile variazione di tali risultati anche a parità di ambiente di test, ceppo virale, metodo di raccolta, inoculazione, nebulizzazione, terreni virali, tipo di cellule e procedura di coltura. Innovative BioAnalysis non rilascia dichiarazioni a terzi e non si assume alcuna responsabilità per conseguenze derivanti dall'uso o dall'applicazione dei risultati degli esperimenti da parte di terzi.

# INNOVATIVE BIOANALYSIS

creating solutions | getting results

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

6/4/2021

---

**Dr. Dana Yee M.D**  
**Patologo clinico e direttore medico**

---

**Data**

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

5/4/2021

---

**Sam Kabbani, MS, BS, MT(ASCP), CLS**  
**Responsabile scientifico, Innovative Bioanalysis**

---

**Data**

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

5/4/2021

---

**Albert Brockman**  
**Responsabile per la biosicurezza, Innovative Bioanalysis**

---

**Data**

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

5/4/2021

---

**Kevin Noble**  
**Direttore operativo, Innovative Bioanalysis**

---

**Data**