

Dr. MÁRCIA OLIVEIRA

Evaluation of the germicidal activity of the cold plasma bipolar ionization

SOLUCIONES DE AGUA Y AIRE TAYRA S.L.

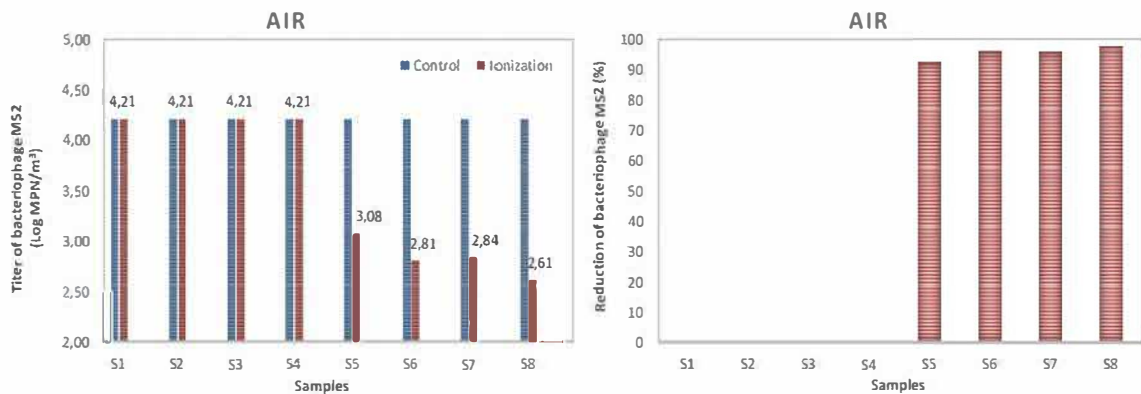
25/05/2020



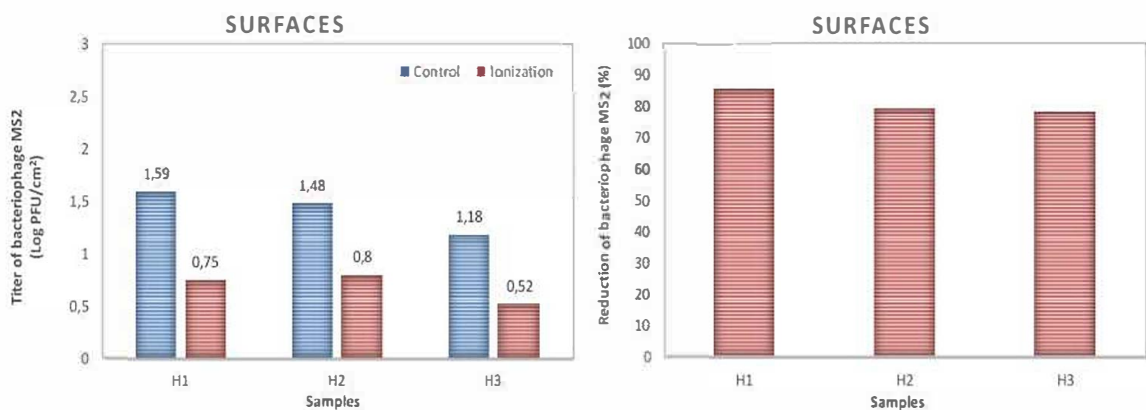
CONFIDENTIAL NOTICE The information contained in this document and accompanying data are intended only for the person or entity to which it is addressed and may contain confidential and / or privileged material. If you are not the intended recipient of this email, the use of this information or any disclosure, copying or distribution is prohibited and maybe unlawful. If you received this in error, please contact the sender and delete all copies of this message and attachments

Test Report Summary

- The test was carried out in a room of the hotel B&B of the T4 airport terminal in Madrid between 4th and 14th of May 2020 with the cooperation of the Biological Defence laboratory of the INTA from the Spanish Ministry of Defence. The test results have been certified by the Director of the INTA, Spanish Ministry of Defence.
- The goal of the test was to measure the effectiveness of the Plasma Air ionisation technique as an effective technology to reduce SARS-CoV-2 surrogate, the bacteriophage MS2, that was nebulised into the test room. The Plasma Air type PA600 (Plasma Air International) equipment was installed in the entrance to the fan coil unit of the supply Air Duct to the test space.
- The bacteriophage MS2 was selected because it belongs to group of biological risk 1 (no risk or very low risk for the individual and the community) (Spanish Royal Decree 664/1997). In addition, the bacteriophage MS2 is often used as a surrogate for airborne virus testing and is an appropriate choice for use as a surrogate human pathogenic virus like SARS-CoV-2.
- A reduction of approximately 2 log units of the bacteriophage was obtained in the air, which corresponds to almost 99% reduction after only 10 min exposure to ionization. Please see the figure below.



- A reduction in the order of 0.70-0.85 log pfu/cm² was obtained on the table, mask and measurement device surfaces (H1-H3 samples), corresponding to almost 80% of reduction. Please see the figure below.



Evaluation of the germicidal activity of the cold plasma bipolar ionization

Author and translator: Dr. Márcia Oliveira, msouo@unileon.es



- Conclusion: From the results obtained, it can be concluded that the installation of the Plasma Air bipolar cold plasma ionization system has been effective, under the conditions tested, to reduce by approximately 99% the concentration of the bacteriophage MS2 in the air and almost 80% on the surfaces tested in the room, such as table and mask.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Márcia Oliveira", written over a horizontal line.

Márcia Oliveira, PhD

Nº expediente SDGSISTTER:		Nº Expediente Departamento:	
Código del documento:	Informe de ensayo nº NBQM2020_01		
Título del documento:	ENSAYOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD GERMICIDA DE LA IONIZACIÓN BIPOLAR POR PLASMA FRÍO		

Emisor del documento:

Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial


Subdirección General de Sistemas Terrestres

Departamento de Sistemas de Defensa NBQ

Área de Defensa Biológica

POC de la SDGSISTTER Tcol Juan Carlos Cabria Ramos



	Nombre / Responsabilidad	Firma	Fecha
Realizado por:	Dra Matilde Gil García Dra Marcia Oliveira Sousa	GIL GARCIA MATILDE 26214775L 	Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:17 +02'00'
Director Técnico:	Dra Paloma Lorenzo Lozano	P.A. GIL GARCIA MATILDE 26214775L	Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:45 +02'00'
Aprobado por:	Tcol Juan Carlos Cabria Ramos	CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z	Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:53:59 +02'00'
Revisado por Calidad:	Responsable Calidad Departamento	P.A. CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z	Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:54:30 +02'00'

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



ÍNDICE

1. Objeto.....	3
2. Antecedentes	3
3. Muestras, Objetos e ítems recibidos.....	4
4. Procedimientos de ensayo / Normativa	11
4.1. Selección del material biológico	11
4.2. Medios de cultivo y reactivos	12
4.3. Equipos utilizados	15
4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo.....	15
4.5. Desarrollo de los ensayos	17
5. Fechas de ejecución de los ensayos	18
6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable).....	18
7. Resultado obtenidos.....	18
7.1. Ensayo 1.....	18
7.2. Ensayo 2.....	18
7.3. Ensayo 3.....	19
7.4. Ensayo 4.....	20
8. Declaración de conformidad (cuando proceda)	20
9. Resumen, opiniones, interpretaciones.....	20
10. Anexos	21
10.1. Anexo 1. Bibliografía.....	21



1. Objeto

El objeto del presente informe es la evaluación de la actividad germicida de la tecnología de ionización bipolar por plasma frío sobre el bacteriófago MS2 y la bacteria *Escherichia coli*, aplicada en ambientes interiores (habitación de un hotel).

2. Antecedentes

Con fecha 30 de abril de 2020, por parte de la empresa Soluciones de Aire y Agua Tayra S.L. se solicitó al Dpto NBQ de la SDGSISTTER el apoyo para la realización de diferentes ensayos al objeto de evaluar la actividad germicida de la tecnología de ionización bipolar por plasma frío para su aplicación en la descontaminación de ambientes interiores.

El desarrollo de los ensayos en su fase de aerosolización del virus MS2 y recogida posterior de las muestras se realizó en una habitación del Hotel B and B T-4 Aeropuerto. El resto de los ensayos se hicieron en el laboratorio de Defensa Biológica del INTA-Campus La Marañosa-

El laboratorio del Área de Defensa Biológica del Dpto NBQ dispone de elementos de contención, equipos y procedimientos requeridos para el trabajo con agentes biológicos pertenecientes al grupo de riesgo 2 o inferior, de acuerdo con las recomendaciones de la O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.

El personal del Área de Defensa Biológica del INTA cuenta con un plan de formación y cualificación que los capacita para manipular agentes biológicos de forma segura a través de la realización de diferentes cursos relacionados con la prevención de riesgos en el laboratorio químico-biológico y han desarrollado su actividad en el campo de la detección y diagnóstico de agresivos biológicos.

El laboratorio dispone asimismo de un sistema de gestión de residuos químicos y biológicos, que incluye formación del personal a través de cursos de Gestión de residuos tóxicos y peligrosos, lo que permite una correcta segregación y almacenamiento de los mismos. La eliminación de éstos es llevada a cabo por empresas autorizadas que ofrecen toda la garantía de no contaminar el medio ambiente, según la Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial, y el Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.

La técnica de la ionización bipolar de Plasma air tipo PA600 consiste en aplicar un campo eléctrico al aire de modo que se generen iones positivos y negativos. Los iones atacan la membrana del virus dejando expuesto su ARN a la oxidación, inactivándolo. En diferentes estudios se han probado que el virus es transmisible por el aire y que los sistemas de aire acondicionado pueden favorecer su dispersión.

Se realizaron un total de 4 ensayos, de los cuales dos aportaron inicialmente ninguna conclusión, siendo necesario la repetición de uno de ellos. A continuación, se explicará con detalle el diseño experimental para cada ensayo y sus resultados.

De una manera general, el diseño experimental elaborado inicialmente se muestra en la figura 1.

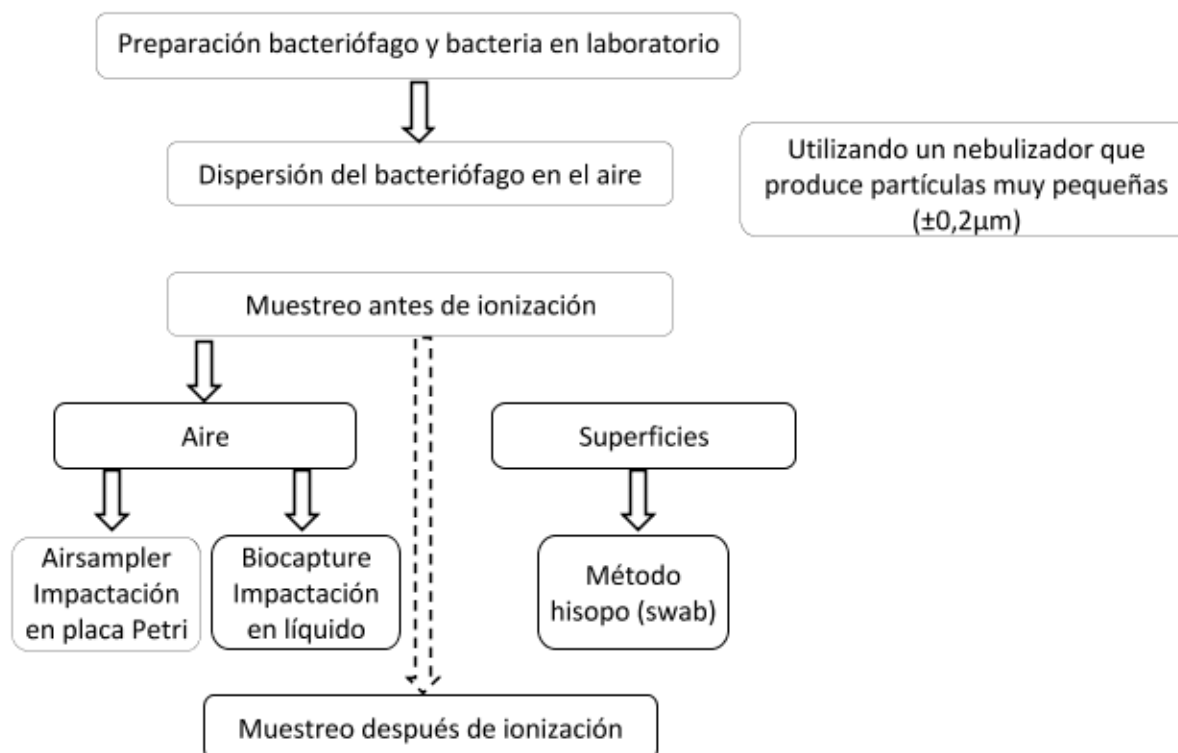


Figura 1. Esquema general del proyecto de ionización.

3. Muestras, Objetos e ítems recibidos

En todos los ensayos realizados se tomaron muestras líquidas mediante un biolector o impactador en medio líquido (Biocapture); muestras sólidas mediante biolector o impactador en medio sólido (AirSampler), y muestras de superficies mediante hisopo humectado en tampón SM, en diferentes posiciones de la habitación a ensayar y en diferentes tiempos.

En las siguientes tablas (tabla I – tabla IV) se exponen las muestras recogidas en cada uno de los ensayos realizados.

Tabla I. Muestras recogidas en el ensayo 1 (control positivo, ensayo con bacteriófago MS2)

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_001	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_002	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_003	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_004	S2	Muestra de aire recogida en posición 2, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1



NBQM2020_005	S3	Muestra de aire recogida en posición 3, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_006	S4	Muestra de aire recogida en posición 4, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_007	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_008	S6	Muestra de aire recogida en posición 2, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_009	S7	Muestra de aire recogida en posición 3, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_010	S8	Muestra de aire recogida en posición 4, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_011	H1A	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_012	H1B	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_013	H2A	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_014	H2B	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_015	H3A	Muestra de la superficie de la pared sobre el cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_016	H3B	Muestra de la superficie de la pared sobre el cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_017	H4A	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 5 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_018	H4B	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 30 minutos después de la nebulización.	1

En la figura siguiente (figura 2) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 1.

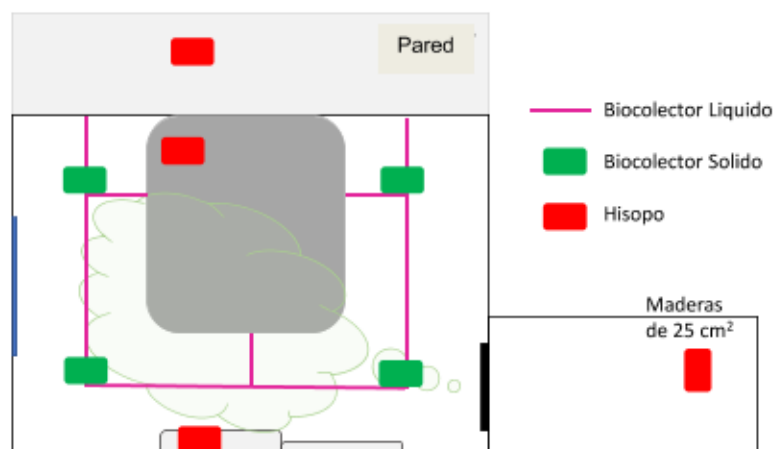


Figura 2. Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 1.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Tabla II. Muestras recogidas en el ensayo 2 (**control positivo**, variando posición y tiempo de recogida de muestras respecto al ensayo 1, ensayo con bacteriófago MS2)

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_019	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo durante la nebulización.	1
NBQM2020_020	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo después de la nebulización.	1
NBQM2020_021	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 0 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_022	S2	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 1,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_023	S3	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 2,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_024	S4	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 4.2 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_025	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5,6 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_026	S6	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 7 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_027	S7	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 8,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_028	S8	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 9,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_029	H1	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_030	H2	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_031	H3	Muestra de una superficie situada cerca del cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_032	H4	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_033	H5	Muestra de la superficie del interior de una primera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_034	H6	Muestra de la superficie del interior de una segunda columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_035	H7	Muestra de la superficie del interior de una tercera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



NBQM2020_036	H8	Muestra de la superficie del interior de una cuarta columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
--------------	----	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---

En la figura siguiente (figura 3) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 2.

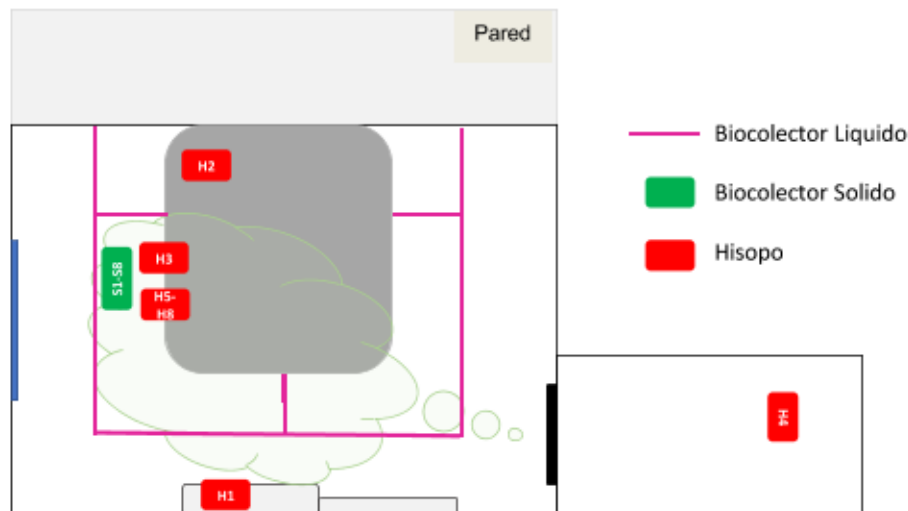


Figura 3. Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 2.

Tabla III. Muestras recogidas en el ensayo 3 (**Ensayo de descontaminación aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío**, misma posición y tiempo de recogida de muestras respecto al ensayo 2, ensayo con bacteriófago MS2).

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_037	LA	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo durante la nebulización.	1
NBQM2020_038	LB	Muestra de aire recogida alrededor de la cama de la habitación, utilizando un impactador en medio líquido (Biocapture), 5 minutos de muestreo después de la nebulización.	1
NBQM2020_039	S1	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 0 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_040	S2	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 1,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_041	S3	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 2,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_042	S4	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 4.2 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_043	S5	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 5,6 minutos después de la nebulización.	1



NBQM2020_044	S6	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 7 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_045	S7	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 8,4 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_046	S8	Muestra de aire recogida en posición 1, utilizando un impactador en medio sólido (AirSampler), 9,8 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_047	H1	Muestra de la superficie de la mesa recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_048	H2	Muestra de la superficie de la mascarilla del maniquí situado sobre la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_049	H3	Muestra de una superficie situada cerca del cabecero de la cama, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_050	H4	Muestra de la zona de retorno de aire, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_051	H5	Muestra de la superficie del interior de una primera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_052	H6	Muestra de la superficie del interior de una segunda columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_053	H7	Muestra de la superficie del interior de una tercera columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1
NBQM2020_054	H8	Muestra de la superficie del interior de una cuarta columna de impactación de partículas utilizada para medir el tamaño de partícula, recogida mediante hisopo, 10 minutos después de la nebulización.	1

Tabla IV. Muestras recogidas en el ensayo 4 (ensayo de descontaminación aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío, ensayo con bacteria *Escherichia coli*).

Identificación	Alias	Descripción del objeto / muestra / ítem	Cantidad
NBQM2020_055	SA1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_056	SA2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_057	SA3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



NBQM2020_058	SA4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_059	SB1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_060	SB2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_061	SB3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_062	SB4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_063	SC1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_064	SC2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_065	SC3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_066	SC4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_067	SD1	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_068	SD2	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_069	SD3	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_070	SD4	Placa de Petri con agar LB, inoculada con la bacteria <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y retirada a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_071	A1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_072	A2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_073	A3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



NBQM2020_074	A4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral derecho de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_075	B1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_076	B2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_077	B3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	11
NBQM2020_078	B4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral inferior de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_079	C1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_080	C2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_081	C3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_082	C4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el lateral izquierdo de la cama y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_083	D1	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 5 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_084	D2	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 15 minutos de exposición a la ionización.	1
NBQM2020_085	D3	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 30 minutos de exposición a la ionización.	11
NBQM2020_086	D4	Muestra líquida tomada de un cultivo líquido de <i>Escherichia coli</i> en fase exponencial (10^8 ufc/mL), situada en el retorno del aire y recogida a los 45 minutos de exposición a la ionización.	1

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo



En la figura siguiente (figura 4) se muestra un esquema de la habitación y de los puntos de muestreo del ensayo 4.

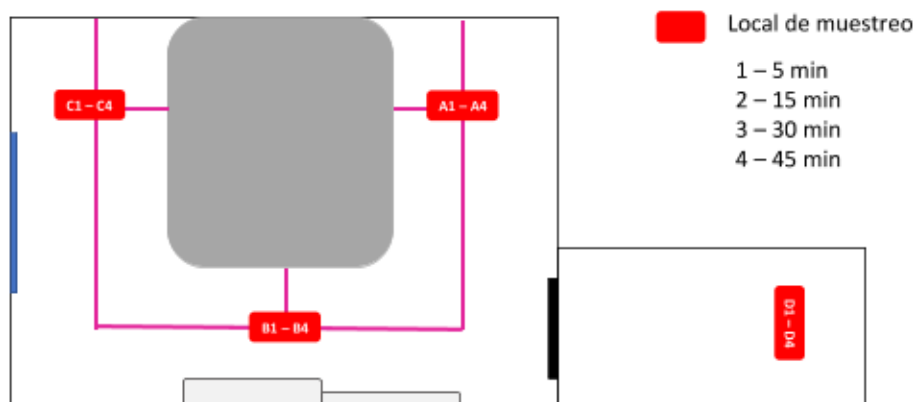


Figura 4. Esquema de la habitación y puntos de muestreo del ensayo 4.

4. Procedimientos de ensayo / Normativa

Para evaluar la actividad virocida del sistema se calculó la reducción de la infectividad del bacteriófago a partir de las diferencias de los logaritmos de los títulos virales (unidades formadoras de placas de lisis (ufp)), antes y después del proceso de descontaminación. Esto se llevó a cabo mediante cultivo por el método de la doble capa de agar, teniendo en cuenta que cuando el bacteriófago infecta a una célula huésped, de una cepa adecuada, se producen placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa, permitiendo la detección y recuento de las mismas (norma UNE-EN ISO 10705-1).

La actividad bactericida del sistema se evaluó calculando la reducción de la viabilidad bacteriana a partir de las diferencias de los logaritmos de la concentración bacteriana (unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL), antes y después del proceso de descontaminación, mediante la siembra de diluciones seriadas en placas de LBA y contaje directo del número de ufc en cada una de ellas. Además, dicha actividad también se evaluó de manera cualitativa, en función de la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, en las placas sometidas al sistema de descontaminación respecto a un control positivo (sin someter a descontaminación).

4.1. Selección del material biológico

Para dar cumplimiento al trabajo solicitado se ha seleccionado el bacteriófago MS2 y la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597, ambos pertenecientes al grupo de riesgo biológico 1 (sin riesgo o riesgo muy bajo para el individuo y la comunidad) (Real Decreto 664/1997). Para asegurar un sistema cerrado de conservación, todos los microorganismos que se van a utilizar en los ensayos proceden de una colección de cultivos tipo, minimizando su actividad genética y fisiológica, y evitando así su potencial mutación.

El bacteriófago MS2 es un virus icosaédrico, que tiene como material genético ARN de cadena sencilla, de sentido positivo que infecta a la bacteria *Escherichia coli* y otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. MS2 es miembro de una familia de virus bacterianos estrechamente relacionados entre los que se encuentran los bacteriófagos f2 y R17. MS2 infecta a bacterias entéricas portadoras del factor de fertilidad (F), que codifica para un "pili" el cual sirve de receptor viral. MS2 se une al "pili" a través de su proteína de maduración sencilla. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual el fago ARN se introduce en la bacteria. Las células hospedadoras del fago son lisadas (destruidas) tras la replicación y encapsulación de



las partículas virales, de forma que los nuevos virus quedan libres para llevar a cabo una nueva infección, produciendo placas de lisis de tamaño y morfología muy diversa.

El bacteriófago MS2 es muy resistente a la desecación, por lo que ha sido utilizado en diferentes ensayos para evaluación de descontaminantes: "Ensayos cuantitativos de suspensión para la evaluación de la actividad virocida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria" (UNE_EN 13610:2003). "Actividad virocida para superficies inertes" (ASTM-1053:97).

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae y forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal de animales homeotermos, como por ejemplo el ser humano. Es hospedador del bacteriófago MS2 que infecta a bacterias entéricas portadoras del factor de fertilidad (F). Ha sido utilizada en diferentes ensayos para evaluación de descontaminantes: "Ensayos cuantitativos de suspensión para la evaluación de la actividad virocida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria" (UNE_EN 13610:2003). "Actividad virocida para superficies inertes" (ASTM-1053:97).

La actividad germicida se va a evaluar utilizando como microorganismos de ensayo el bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1 en cloroformo al 0,3% conservado a 4°C y la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 conservada en glicerol al 15% a -80°C en el cepario del Área de Defensa Biológica (figura 5).

Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 15597™)

ATCC® Number: 15597™

Strain Designations: *C-3000*

Type Strain: *no*

Biosafety Level: *1*

Product Format: *freeze-dried*

Escherichia coli bacteriophage MS2 (ATCC® 15597-B1™)

ATCC® Number: 15597-B1™

Deposited As *MS2*

Strain Designations: *MS2*

Type Strain: *no*

Biosafety Level: *1*

Product Format: *freeze-dried*

Figura 5. Especificaciones del bacteriófago y cepa bacteriana utilizada como cepa huésped.

4.2. Medios de cultivo y reactivos

Para la preparación de los medios y la uniformidad de los resultados se utilizaron componentes de calidad homologada y productos químicos de calidad analítica reconocida, o un medio completo deshidratado. Se utilizó únicamente agua destilada o agua de pureza equivalente.

Los medios utilizados fueron los siguientes:

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Luria Bertani Agar (LBA)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0
Agar	-----15,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

Luria Bertani Agar Semisólido (LBAss)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0
Agar	-----6,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

Caldo de Luria Bertani (LB)

Fórmula (en g/L):

Triptona	-----10,0
Extracto de levadura	-----5,0
Cloruro sódico	-----10,0

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 +/- 3°C durante 15 minutos.

Solución SM

Fórmula (en g/L):

Cloruro sódico	-----5,8
Sulfato magnésico	-----2,0

Se añade 5 mL de Tris-Cl 1M (pH 7,3 ± 0,2). Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Buffer Tris-Mg-Ca

10mM Tris-HCl
10mM MgSO ₄
5mM CaCl ₂

pH final aproximado: 7,5 ± 0,3. Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



Cloruro Cálcico 0,5M

Fórmula (en g/100mL):

CaCl₂ 2H₂O ----- 5,5

Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Sulfato Magnésico 1M

Fórmula (en g/100mL):

MgSO₄-----24,6

Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Tris-ClH 0,5M

Fórmula (en g/500mL):

Tris -----60,57 g

Preparar 400 mL de agua destilada en una botella.

Añadir 60,57 g de Tris base

Ajustar el pH a 7,5 usando HCl

Añadir agua destilada hasta un volumen de 500 mL

pH final aproximado: 7,3 ± 0,2. Se esteriliza en autoclave a 121 ± 3°C durante 15 minutos.

Tampón fosfato salino 1X (PBS)

Fórmula (en g/L):

Cloruro sódico 10,0 g

Cloruro potásico 0,25 g

Fosfato disódico monohidrato 1,12 g

Fosfato potásico 0,25 g

pH final aproximado: 7,2 ± 0,2. Se esteriliza por filtración sobre membrana de 0,2 µm de tamaño de poro.

Cultivos bacterianos

Se utilizará una suspensión del bacteriófago MS2 ATCC 15597-B1 en SM y un cultivo de la bacteria *Escherichia coli*, ATCC 15597, crecido hasta fase exponencial para los ensayos de infectividad y bactericida.



4.3. Equipos utilizados

Estufa de cultivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$
Incubador termostático a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ con agitación
Microondas
pH-metro
McFarlómetro
Tubos, para medir en McFarlómetro
Vortex
Baño termostatzado
Cabina de seguridad biológica nivel II
Placas de Petri, ventiladas de 9 cm de diámetro
Pipetas graduadas de 0,1 mL, 1mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL de capacidad
Pipetas Pasteur
Frascos de vidrio, de volúmenes adecuados
Tubos de cultivo, con tapa
Probetas graduadas
Refrigerador, ajustado a una temperatura de $5 \pm 3^\circ\text{C}$
Congelador, con control termostático a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$
Micropipetas de diferente volumen
Puntas para micropipetas de volumen adecuado
Hisopos de algodón estériles en tubo
Agitador orbital de placas
Generador de aerosol biológico o nebulizador
Sistema de impactación de partículas, suministrado por Victor Archilla (INTA)
Biocolector de aerosoles sobre medio líquido (Biocapture)
Biocolector de aerosoles sobre medio sólido (suministrado por el cliente)
Sistema de ionización bipolar por plasma frío (suministrado por el cliente)

4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo

Se partió de una suspensión del bacteriófago, conservado a 4°C en cloroformo al 0,3%, preparado según las instrucciones que se describen en la norma UNE-EN ISO 10705-1 y de una suspensión de *Escherichia coli*, ATCC 15597 conservado a -80°C en glicerol al 15%. Antes de iniciar los ensayos se calculó el título viral del bacteriófago a utilizar. Para determinar el título viral se añadieron 20 ± 2 mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a 37°C , y se inoculó con 200 μL de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 crecido "overnight" (inóculo 1:100). Se incubó a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 ± 1 horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 10^8 ufc/mL). Para ello cada 30 minutos se sacó del incubador el cultivo

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



y se midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla V).

Tabla V. Correspondencia entre Concentración Bacteriana y Unidades de McFarland teóricas

Concentración Bacteriana x10 ⁸ /ml	Unidades de McFarland
1,5	0,5
3	1
6	2
9	3
12	4
15	5
18	6
21	7

Cuando el cultivo bacteriano llegó a la fase de crecimiento exponencial se enfrió rápidamente transfiriendo la botella a un recipiente con hielo. Se hicieron diluciones seriadas, añadiendo 50 µL de una suspensión de fago conservado a 4°C en presencia de cloroformo al 0,3%, a 450 µL del tampón Tris-Mg-Ca. Se mezclaron 120 µL de cada dilución con 120 µL de la cepa hospedadora crecida hasta fase exponencial, mantenida en hielo hasta el momento de la infección, por duplicado. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente para que los virus se unieran a las células hospedadoras. A continuación, se cogieron 200 µL de la mezcla, virus/célula hospedadora, y se añadieron a un tubo que contenía 3 mL de medio LBAss precalentado (45°C). Se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió el contenido sobre la superficie de una placa de Petri que contenía LBA. Se dejó solidificar y se incubó en una estufa de cultivo a 36 ± 2°C durante 18 ± 2 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Título} = (N/d) \times 10 \text{ ufp/mL} \quad (\text{ecuación 1})$$

Siendo $N = (n_1 + 0,1n_2)/2$

n_1 : Número de placas de lisis en la dilución más alta que se puede contar

n_2 : Número de placas de lisis en la dilución anterior a la más alta que se puede contar

d : dilución más alta que se puede contar

Los títulos virales de la suspensión inicial del bacteriófago utilizado para la nebulización del mismo en los ensayos fueron:

Ensayo 2 (control positivo): 2,25x10⁵ ufp/mL.

Ensayo 3: 2,47x10⁵ ufp/mL.

Para la realización de los ensayos con células bacterianas se revitalizó la cepa *Escherichia coli*, ATCC 15597 conservada a -80 °C en glicerol al 15%, en caldo de Luria Bertani (LB), a 36 ± 2°C, 150 rpm, durante 20 ± 4 horas. Transcurrido este período de incubación se añadieron 20 ± 2 mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a 37°C, y se inoculó con 200 µL de un cultivo de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 15597 crecido "overnight" (inóculo 1:100). Se incubó a 37 ± 2°C durante 3 ± 1 horas en un incubador, con agitación suave (150 rpm) hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (aproximadamente 10⁸ ufc/mL). Para ello cada 30 minutos se sacó del incubador el cultivo y se



midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla V).

Para la cuantificación del número de unidades formadoras de colonias (ufc)/mL viables en los cultivos bacterianos se prepararon diluciones seriadas del cultivo añadiendo 100 µL del cultivo a 900 µL del tampón PBS y se inocularon 100 µL de cada una de las diluciones en una placa con medio LBA, por duplicado. Se incubaron a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 ± 4 h. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó el número de bacterias viables por contaje directo de las colonias crecidas sobre la placa de LBA. Para el cálculo del número de ufc/ml viables se aplicó la siguiente ecuación:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)d} \times 10 \quad (\text{ecuación 2})$$

Siendo:

c: la suma de las colonias contadas en todas las placas que se pueden contar.

n_1 : el número de placas contadas en la dilución más baja.

n_2 : el número de placas contadas en la dilución más alta.

d: el factor de dilución correspondiente a la dilución más baja.

4.5. Desarrollo de los ensayos

Para cada uno de los ensayos con el bacteriófago MS2 se prepararon 500 mL de una suspensión de dicho bacteriófago en tampón SM, para generar el aerosol de dicho bacteriófago y dispersarlo en la habitación de ensayo y, posteriormente, recoger tanto muestras de aire, por impactación en medio sólido y en medio líquido, como de superficies mediante hisopo.

Para recuperar el bacteriófago de las muestras tomadas con hisopo de los controles positivos así como de las muestras sometidas al proceso de descontaminación, se añadieron al tubo estéril que contenía cada uno de los hisopos, 2 mL de solución SM y se sometieron a agitación (en un agitador orbital) durante 1 hora a 4°C . El líquido de lavado se recogió en un tubo estéril, que se guardó a 4°C hasta que se llevó a cabo el proceso de infección.

A partir de la suspensión del bacteriófago, recuperado de las probetas, así como las muestras líquidas recogidas por impactación sobre medio líquido, se hicieron diluciones seriadas, siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.4. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales en la dilución más alta que se pudo contar y en la inmediatamente anterior aplicando la ecuación 1.

Las muestras recogidas por impactación sobre medio sólido se incubaron directamente en una estufa de cultivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. El medio sólido consistió en un inóculo de 100 µL de la bacteria *Escherichia coli* en fase exponencial sobre medio sólido LBA, para el caso del ensayo 1, y un inóculo de 200 µL de la bacteria *Escherichia coli* en fase exponencial que se añadieron a un tubo que contenía 4 mL de medio LBAs precalentado (45°C), que se mezcló cuidadosamente mediante inversión y se vertió sobre la superficie de una placa de Petri con medio LBA, para los ensayos 2 y 3.

El ensayo con el cultivo bacteriano se realizó aplicando directamente la ionización bipolar por plasma frío sobre cultivos sólidos y líquidos en fase exponencial, de dicha cepa.

Las muestras sólidas se incubaron directamente en una estufa de cultivo a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas.

De las muestras líquidas se prepararon diluciones seriadas del cultivo siguiendo el proceso descrito en el apartado 4.4. Transcurrido el tiempo de incubación se cuantificó el número de bacterias viables por contaje directo de las colonias crecidas sobre la placa de LBA. Para el cálculo del número de ufc/ml viables se aplicó la ecuación 2.

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



5. Fechas de ejecución de los ensayos

Los ensayos se realizaron entre los días 4 y 14 de mayo de 2020.

6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable)

No aplica.

7. Resultado obtenidos

Los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados fueron los siguientes:

7.1. Ensayo 1

Este ensayo se trata de un control positivo puesto que no se ha aplicado la ionización bipolar.

No se ha obtenido valores significativos del bacteriófago en el aire ni en las superficies. Además, la metodología utilizada para el biolector sobre medio sólido no ha funcionado.

Se planteó otra repetición del control positivo con cambios en el diseño experimental para poder comparar con el ensayo de ionización bipolar.

7.2. Ensayo 2

Este ensayo es la repetición del control positivo anterior (ensayo 1), puesto que en el primer ensayo se obtuvo una concentración bastante baja del bacteriófago, variando posición y tiempo de toma de muestras así como la técnica de biolectión sobre medio sólido.

La concentración del bacteriófago en la solución utilizada para nebulización fue de $2,25 \times 10^5$ ufp/mL.

Los resultados obtenidos en el ensayo control se muestran en la tabla VI.

Tabla VI. Resultados obtenidos en el ensayo control (ensayo 2).

Muestras biolector liquido	Recuento medio (log ufp/mL)
A – Tiempo 1 (5 min de muestreo durante la nebulización)	4,16
B – Tiempo 2 (5 min de muestreo después de la nebulización)	3,46
Muestras biolector solido	Recuento medio (log ufp/L)
S1 – min 0	(>265 ufp) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 ufp) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 ufp) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 ufp) – >4,21
S5 – min 5,6	(>265 ufp) – >4,21
S6 – min 7	(>265 ufp) – >4,21
S7 – min 8,4	(>265 ufp) – >4,21
S8 – min 9,8	(>265 ufp) – >4,21
Muestras superficies	Recuento medio (log ufp/cm ²)
H1 – mesa	1,60
H2 – mascarilla	1,48
H3 – superficie equipo ELPI (INTA)	1,18
H4 – retorno aire	0
H5 – columna impactación	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



H6 – columna impactación	0
H7 – columna impactación	0
H8 – columna impactación	0,49

Se puede observar una disminución de la concentración de bacteriófago al tiempo 1 (5 minutos de muestreo durante la nebulización) y 2 (5 minutos de muestreo después de la nebulización) en el muestreo con el biocolector líquido. La posible razón es que las partículas de virus se caen al suelo cuando están asociadas a partículas de agua grandes. Esto sería justificado si en el muestreo de la columna de impactación hubiéramos encontrado valores del bacteriófago. Sería necesario muestrear más superficies de la columna para poder visualizar en qué tamaño de partículas se puede encontrar el bacteriófago.

Respecto a las muestras del impactador sólido, se obtuvo valores incontables lo que corresponde a números superiores a 1000 partículas de bacteriófagos. Debido a que se ha utilizado un equipo que requiere un ajuste del número total de partículas por placa Petri, se ha tenido que fijar el número máximo como 265 ufp/L. La transformación de estos datos nos lleva a un recuento medio de 4,21 log ufp/L.

Se ha obtenido resultados en el orden de 1-1,6 log ufp/cm² en las superficies muestreadas mediante hisopo. Como se ha comentado anteriormente, no se encontró valores del bacteriófago en la columna de impactación y lo mismo en el área del retorno de aire.

7.3. Ensayo 3

Este ensayo se realizó de la misma manera que el ensayo 2 (control positivo), aplicando la tecnología de ionización bipolar por plasma frío como tratamiento del aire de la habitación.

La concentración del bacteriófago en la solución utilizada para nebulización fue de $2,47 \times 10^5$ ufp/mL.

Los resultados obtenidos en el ensayo con ionización se muestran en la tabla VII.

Tabla VII. Resultados obtenidos en el ensayo 3.

Muestras biocolector liquido	Recuento medio (log ufp/mL)
A – Tiempo 1 (5 min de muestreo durante la nebulización)	4,00
B – Tiempo 2 (5 min de muestreo después de la nebulización)	3,04
Muestras biocolector solido	Recuento medio (log ufp/L)
S1 – min 0	(>265 ufp) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 ufp) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 ufp) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 ufp) – >4,21
S5 – min 5,6	(97 ufp) – 3,08
S6 – min 7	(57 ufp) – 2,81
S7 – min 8,4	(61 ufp) – 2,84
S8 – min 9,8	(38 ufp) – 2,61
Muestras superficies	Recuento medio (log ufp/cm ²)
H1 – mesa	0,75
H2 – mascarilla	0,80
H3 – superficie equipo ELPI (INTA)	0,52
H4 – retorno aire	0
H5 – columna impactación	0
H6 – columna impactación	0

*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*



H7 – columna impactación	0
H8 – columna impactación	0,23

Se puede observar una ligera disminución de la concentración de bacteriófagos al tiempo 1 (5 minutos de muestreo durante la nebulización) y 2 (5 minutos de muestreo después de la nebulización) en el muestreo con el biocolector líquido cuando comparamos con el ensayo control (ensayo 2). No obstante, esta reducción no es significativa.

Se ha observado una reducción bastante significativa en las muestras del impactador sólido recogidas entre los 5 y 10 minutos después de la nebulización (muestras S5-S8). Aunque se obtuvo valores incontables durante los primeros 5 minutos de muestreo, que corresponden al tiempo de nebulización, lo que es justificable ya que la cantidad de bacteriófagos que se está dispersado en el aire es bastante alta. Es de gran importancia destacar que se obtuvo una reducción de más de 2 log del bacteriófago solo con un tiempo de exposición a la ionización bipolar de 10 min.

Respecto a las superficies analizadas muestreadas mediante hisopo, se obtuvo una reducción en el orden de 0,70-0,85 log ufp/cm². Al igual que en el ensayo control, no se encontró valores del bacteriófago en la columna de impactación ni en el área del retorno de aire.

7.4. Ensayo 4

No se ha obtenido resultados concluyentes sobre la eficacia de la ionización frente a la bacteria *Escherichia coli* ya que la metodología utilizada en el laboratorio no ha funcionado. Sería de interés volver a repetir este ensayo.

8. Declaración de conformidad (cuando proceda)

No aplica

9. Resumen, opiniones, interpretaciones

Se han realizado un total de 4 ensayos. Dos de ellos no han aportado ninguna conclusión (ensayos 1 y 4), siendo necesario la repetición de los mismos.

De los resultados obtenidos en los ensayos 2 y 3, se puede concluir que el sistema de ionización bipolar por plasma frío ha sido eficaz, en las condiciones testadas en esta habitación de hotel, para reducir aproximadamente 2 log la concentración del bacteriófago MS2 en el aire.



10. Anexos

10.1. Anexo 1. Bibliografía

- Adams M.H. Agar overlay methods for routine phage production. Interscience Publishers Inc., New York, 1959.
- American Type Culture Collection (ATCC) PO Box 1549. Manassas, VA 20108 USA. www.atcc.org.
- ASTM-1053:97. Actividad virocida para superficies inertes.
- Cormier J. and Janes M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS". J Virol Methods. 2014, 196:86-92.
- Joseph Sambrook and David W. Russell. Molecular Cloning a Laboratory Manual. (Third Edition). 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 0-87969-576-5 (cloth) -- ISBN 0-87969-577-3 (pbk).
- Laura S. and Jan Manchak, Microbiology (1998), 144: 2579-2587.
- O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.
- Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.
- UNE_EN 13610:2003. Ensayo cuantitativo para evaluación de la actividad viricida frente a bacteriofagos.
- UNE-EN ISO 10705-1. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 1: recuento de bacteriófagos ARN F específicos.
- UNE-EN 1040:2006 "Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1).

DR. MÁRCIA OLIVEIRA

Evaluation of the germicidal activity of the cold plasma bipolar ionization

SOLUCIONES DE AGUA Y AIRE TAYRA S.L.

21/05/2020

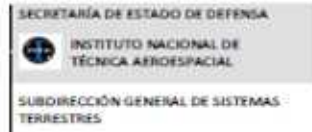


CONFIDENTIAL NOTICE The information contained in this document and accompanying data are intended only for the person or entity to which it is addressed and may contain confidential and / or privileged material. If you are not the intended recipient of this email, the use of this information or any disclosure, copying or distribution is prohibited and maybe unlawful. If you received this in error, please contact the sender and delete all copies of this message and attachments

Original Document



USO OFICIAL



Nº expediente SDGSISTTER:		Nº Expediente Departamento:	
Código del documento:	Informe de ensayo nº NBQM2020_01		
Título del documento:	ENSAYOS PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD GERMICIDA DE LA IONIZACIÓN BIPOLAR POR PLASMA FRÍO		

Emisor del documento:

Instituto Nacional de Técnica Aeroespacial
 Subdirección General de Sistemas Terrestres
 Departamento de Sistemas de Defensa NBQ
 Área de Defensa Biológica
 POC de la SDGSISTTER Tcol Juan Carlos Cabria Ramos



	Nombre / Responsabilidad	Firma	Fecha
Realizado por:	Dra Matilde Gil García Dra Marcia Oliveira Sousa	GIL GARCIA MATILDE 26214775L <i>Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:17 +02'00'</i>	<i>Juan Carlos Cabria Ramos</i>
Director Técnico:	Dra Paloma Lorenzo Lozano	P.A. GIL GARCIA MATILDE 26214775L <i>Firmado digitalmente por GIL GARCIA MATILDE 26214775L Fecha: 2020.05.18 12:25:45 +02'00'</i>	
Aprobado por:	Tcol Juan Carlos Cabria Ramos	CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z <i>Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:53:59 +02'00'</i>	
Revisado por Calidad:	Responsable Calidad Departamento	P.A. CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z <i>Firmado digitalmente por CABRIA RAMOS JUAN CARLOS 05381922Z Fecha: 2020.05.18 11:54:30 +02'00'</i>	

Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres
 El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo

USO OFICIAL

Página 1 de 21

Ctra. M-301, km 10,5
 28330 San Martín de la Vega
 Madrid (ESPAÑA)
 TEL.: +34 91 174 21 98
 FAX: +34 91 174 21 35

INDEX

1. Objective
2. Background
3. Samples description and received items
4. Procedures/Regulations
 - 4.1. Selection of biological material
 - 4.2. Culture media and reagents
 - 4.3. Equipment
 - 4.4. Preparation of microbial cultures
 - 4.5. Methodology
5. Trials execution dates
6. Sampling plan or procedure (when applicable)
7. Results
 - 7.1. Trial 1
 - 7.2. Trial 2
 - 7.3. Trial 3
 - 7.4. Trial 4
8. Declaration of conformity (when applicable)
9. Summary, Opinions, Interpretations
10. Annex
 - 10.1. Annex 1. Bibliography
11. Confidential notice

1. Objective

The purpose of this report is to evaluate the germicidal activity of the cold plasma bipolar ionization technology against the bacteriophage MS2 and *Escherichia coli*, applied in indoor environments (hotel room).

2. Background

On April 30 2020, the company Soluciones de Aire y Agua Tayra S.L. asked the NBQ Department of SDGSISTTER to provide support to carry out different trials in order to evaluate the germicidal activity of the cold plasma bipolar ionization technology for its application in the decontamination of indoor environments.

The development of the project was carried out in a room of the hotel B&B of the T4 airport terminal. For the execution of the experiments, the bacteriophage MS2 was aerosolized inside the room for subsequent collection of the samples. The rest of the analysis was carried out in the Biological Defence laboratory of the INTA-Campus La Marañosa, Madrid, Spain.

The laboratory of the Biological Defence of the NBQ Department has containment elements, equipment and procedures required for working with biological agents belonging to risk group 2 or lower, in accordance with the recommendations of the WHO in the "Biosecurity Manual" and also according to the Council Directive 90/679/EEC, for the protection of workers from risks related to exposure to biological agents.

The staff from the Biological Defence laboratory has had training and qualification planing obtained through the completion of different courses related to risk prevention in the chemical-biological laboratory that enables them to handle biological agents safely; moreover, they have developed their activity in the field of detection and diagnosis of biological aggressive agents.

The laboratory also has a chemical and biological waste management system, that includes training of personnel through courses on the management of toxic and dangerous waste, allowing for a proper segregation and storage. The elimination of the waste is carried out by authorized companies certified to maintain environmental safety, according to the Directive of October 18 1976 (BOE 3.12.1976, rect. 23.2.1977) about the Prevention and Correction of atmospheric pollution of industrial origin, and the Spain Royal Legislative Decree 1302/86 of 28.6, (M. Public Works, BOE 30.6.1986) on environmental impact assessment.

The bipolar ionization technology of Plasma Air type PA600, consists of applying an electric field to the air so that positive and negative ions are generated. The ions attack the virus membrane leaving exposed their RNA to oxidation resulting in their inactivation. Different studies have shown that the virus is transmissible by air, and that air conditioning systems can promote its dispersion.

A total of 4 trials were performed, two of which did not provide any conclusion, requiring the repetition of one of them. The experimental design for each trial and their results are explained in detail below.

In general, the experimental design prepared for this project is shown in Figure 1.

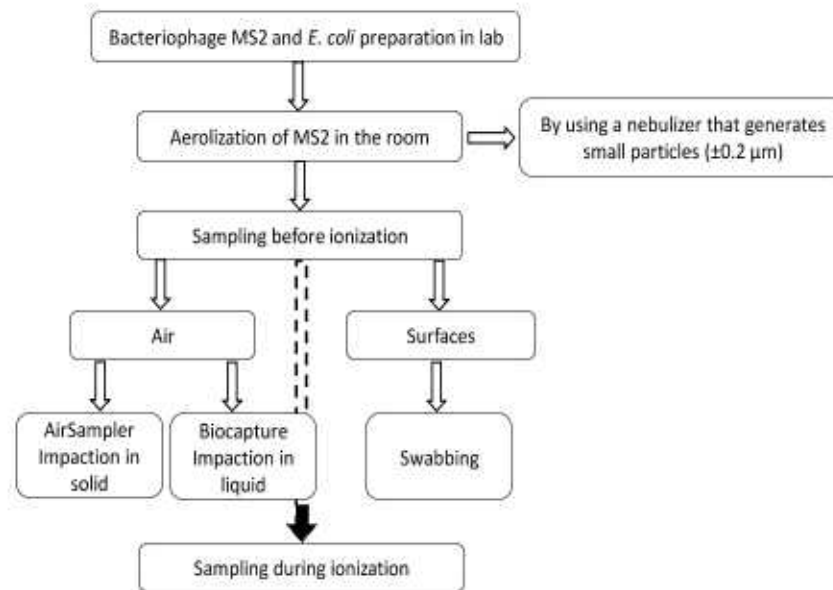


Figure 1. General overview of the ionization project.

3. Samples description and received items

In all the trials carried out, the liquid samples were collected using a Biosampler or impactor in liquid medium (Biocapture); the solid samples were collected using an impactor in solid medium (AirSampler), while analysis of the surfaces was performed by swabbing the room, in different areas and at different times. The following tables (Table I - Table IV) show all samples collected from each trial carried out.

Table I. Samples collected in trial 1 (positive control, MS2 bacteriophage test).

Internal identification	Code	Description	Quantity
NBQM2020_001	LA	Air sample collected around the bed using a liquid medium impactor (Biocapture), 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_002	LB	Air sample collected around the bed using a liquid medium impactor (Biocapture), 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_003	S1	Air sample collected in position 1 using a solid medium impactor (AirSampler), 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_004	S2	Air sample collected in position 2 using a solid medium impactor (AirSampler), 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_005	S3	Air sample collected in position 3 using a solid medium impactor (AirSampler), 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_006	S4	Air sample collected in position 4 using a solid medium impactor (AirSampler), 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_007	S5	Air sample collected in position 1 using a solid medium impactor (AirSampler), 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_008	S6	Air sample collected in position 2 using a solid medium impactor (AirSampler), 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_009	S7	Air sample collected in position 3 using a solid medium impactor (AirSampler), 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_010	S8	Air sample collected in position 4 using a solid medium impactor (AirSampler), 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_011	H1A	Surface sample from the table collected by swabbing, 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_012	H1B	Surface sample from the table collected by swabbing, 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_013	H2A	Surface sample from the mannequin mask collected by swabbing, 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_014	H2B	Surface sample from the mannequin mask collected by swabbing, 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_015	H3A	Surface sample from the wall behind the bed collected by swabbing, 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_016	H3B	Surface sample from the wall behind the bed collected by swabbing, 30 min after nebulization.	1
NBQM2020_017	H4A	Surface sample from the air return area collected by swabbing, 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_018	H4B	Surface sample from the air return area collected by swabbing, 5 min after nebulization.	1

The figure 2 shows a diagram of the room and the sampling points for trial 1.

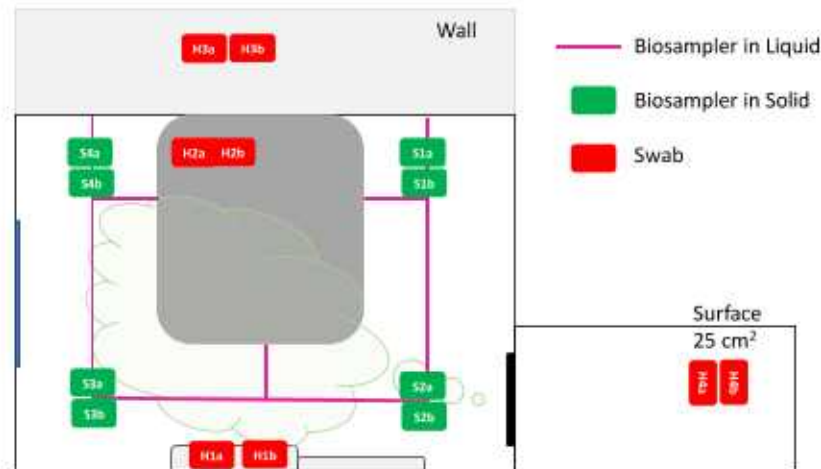


Figure 2. Room diagram and sampling points from trial 1.

Table II. Samples collected in trial 2 (positive control, changing positions and samples collection time respect to trial 1, MS2 bacteriophage test).

Internal identification	Code	Description	Quantity
NBQM2020_019	LA	Air sample collected around the bed using a liquid medium impactor (Biocapture), 5 min during nebulization.	1
NBQM2020_020	LB	Air sample collected around the bed using a liquid medium impactor (Biocapture), 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_021	S1	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 0 min after nebulization.	1
NBQM2020_022	S2	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 1,4 min after nebulization.	1
NBQM2020_023	S3	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 2,8 min after nebulization.	1
NBQM2020_024	S4	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 4,2 min after nebulization.	1
NBQM2020_025	S5	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 5,6 min after nebulization.	1
NBQM2020_026	S6	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 7 min after nebulization.	1
NBQM2020_027	S7	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 8,4 min after nebulization.	1
NBQM2020_028	S8	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 9,8 min after nebulization.	1
NBQM2020_029	H1	Surface sample from the table collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_030	H2	Surface sample from the mannequin mask collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_031	H3	Surface sample from the ELPI+ device situated next to bed collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_032	H4	Surface sample from the air return area collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_033	H5	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_034	H6	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_035	H7	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_036	H8	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1

The figure 3 shows a diagram of the room and the sampling points for trial 2.

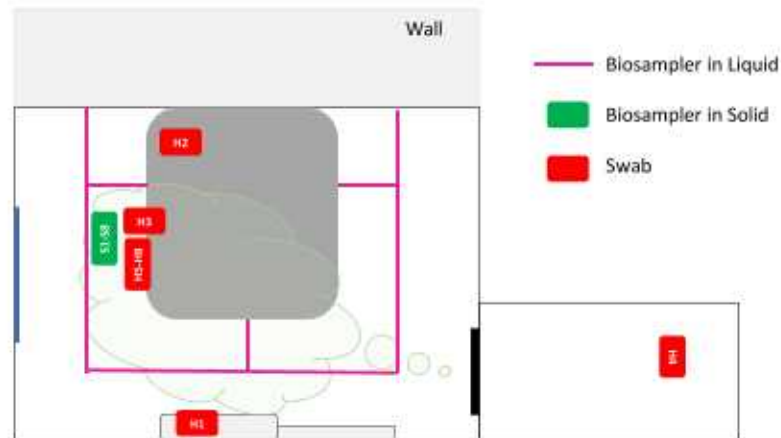


Figure 3. Room diagram and sampling points from trial 2.

Table III. Samples collected in trial 3 (decontamination test applying cold plasma bipolar ionization technology, same positions and samples collection time as trial 2, MS2 bacteriophage test).

Internal identification	Code	Description	Quantity
NBQM2020_037	LA	Air sample collected around the bed using a liquid medium impactor (Biocapture), 5 min during nebulization.	1
NBQM2020_038	LB	Air sample collected around the bed using a liquid medium impactor (Biocapture), 5 min after nebulization.	1
NBQM2020_039	S1	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 0 min after nebulization.	1
NBQM2020_040	S2	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 1,4 min after nebulization.	1
NBQM2020_041	S3	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 2,8 min after nebulization.	1
NBQM2020_042	S4	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 4,2 min after nebulization.	1
NBQM2020_043	S5	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 5,6 min after nebulization.	1
NBQM2020_044	S6	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 7 min after nebulization.	1
NBQM2020_045	S7	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 8,4 min after nebulization.	1
NBQM2020_046	S8	Air sample collected in the same position using a solid medium impactor (AirSampler), 9,8 min after nebulization.	1
NBQM2020_047	H1	Surface sample from the table collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_048	H2	Surface sample from the mannequin mask collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_049	H3	Surface sample from the ELPI+ device situated next to bed collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_050	H4	Surface sample from the air return area collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_051	H5	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_052	H6	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_053	H7	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1
NBQM2020_054	H8	Surface sample from the impaction column of the ELPI+ device used to measure the particles size collected by swabbing, 10 min after nebulization.	1

Table IV. Samples collected in trial 4 (decontamination test using cold plasma bipolar ionization technology, test using *E. coli*).

Internal identification	Code	Description	Quantity
NBQM2020_055	SA1	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_056	SA2	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_057	SA3	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_058	SA4	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_059	SB1	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_060	SB2	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_061	SB3	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_062	SB4	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_063	SC1	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_064	SC2	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_065	SC3	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_066	SC4	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_067	SD1	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_068	SD2	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_069	SD3	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_070	SD4	Petri dish with LBA inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_071	A1	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_072	A2	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_073	A3	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_074	A4	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the right side of the bed and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_075	B1	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_076	B2	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_077	B3	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_078	B4	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located in front of the bed and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_079	C1	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_080	C2	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_081	C3	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_082	C4	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the left side of the bed and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_083	D1	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 5 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_084	D2	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 15 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_085	D3	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 30 minutes after exposure to ionization.	1
NBQM2020_086	D4	Petri dish with liquid solution inoculated with <i>E. coli</i> at 10 ⁸ ufc/mL, located on the air return area and removed 45 minutes after exposure to ionization.	1

The figure 4 shows a diagram of the room and the sampling points for trial 4.

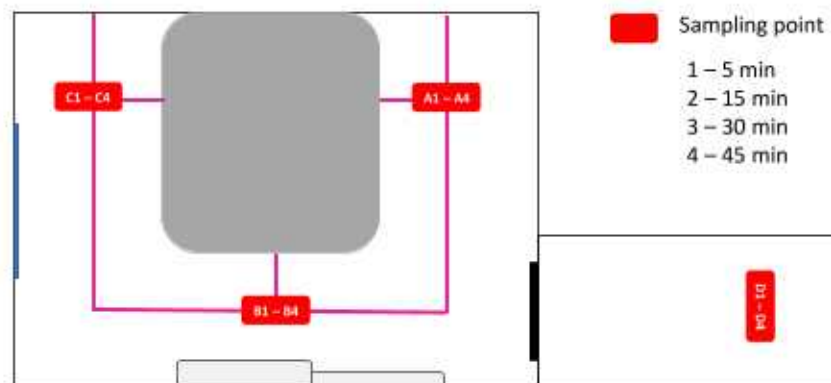


Figure 4. Room diagram and sampling points from trial 4.

4. Procedures/Regulations

To assess the virucidal activity of the technology, the reduction of bacteriophage infectivity was calculated from the differences in the logarithm of the viral titers (lysis plaque forming units (pfu)), before and after the decontamination process. This was carried out using the double layer agar method, taking into account that when the bacteriophage infects a host cell, of a suitable strain, lysis plaques of very diverse size and morphology are produced, allowing detection and their count (UNE EN ISO 10705-1).

The bactericidal activity of the technology was evaluated by calculating the reduction in bacterial viability based on the difference in the logarithms of the bacterial concentration (colony forming units per millilitre (cfu/mL), before and after the decontamination process by plating serial dilutions on LBA plates and direct counting the number of cfu in each of them. In addition, the activity was also evaluated qualitatively, based on the presence or absence of bacterial growth on the plates subjected to the decontamination system regarding a positive control (without subjecting to decontamination).

4.1. Selection of biological material

To carry out this work, the bacteriophage MS2 and the bacterium *Escherichia coli* ATCC 15597 were selected, both belonging to group of biological risk 1 (no risk or very low risk for the individual and the community) (Spanish Royal Decree 664/1997). All the microorganisms used in the assays are from a collection of standard cultures, minimizing their genetic and physiological activity, and thus avoiding their potential mutation.

The bacteriophage MS2 has a positive sense single stranded RNA genome, icosahedral capsid symmetry and infects the bacterium *Escherichia coli* and other members of the Enterobacteriaceae family. MS2 is a member of a closely related family of bacterial viruses including f2 and R17 bacteriophages. MS2 infects enteric bacteria carrying fertility factor (F), which codes for a "pili" which serves as a viral receptor. MS2 binds to the "pili" through its simple maturing protein. The phage host cells are lysed (destroyed) after replication and encapsulation of the viral particles, so that the new viruses are free to carry out a new infection, producing lysis plaques of very diverse size and morphology.

The bacteriophage MS2 is very resistant to desiccation, which is why it has been used in different tests to evaluate decontaminants: "Quantitative suspension tests for the evaluation of virucidal activity against bacteriophages of chemical disinfectants used in food and industrial areas" (UNE EN 13610:2003), "Efficacy of virucidal agents intended for inanimate environmental surfaces" (ASTM-1053:97).

Escherichia coli belongs to the Enterobacteriaceae family and is part of the gastrointestinal microbiota of homeothermic animals, such as humans. It is the host for the bacteriophage MS2 that infects enteric bacteria carrying fertility factor (F). It has been used in many tests to evaluate decontamination efficacy: "Quantitative suspension tests for the evaluation of virucidal activity against bacteriophages of chemical disinfectants used in food and industrial areas" (UNE EN 13610:2003). "Efficacy of virucidal agents intended for inanimate environmental surfaces" (ASTM-1053:97).

For these assays, the germicidal activity was evaluated using the bacteriophage MS2 ATCC 15597-B1 in 0.3% chloroform stored at 4 °C and *Escherichia coli* ATCC 15597 preserved in 15% glycerol at -80 °C as test microorganisms (figure 5).

Escherichia coli (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC® 15597™)

ATCC® Number: 15597™
Strain Designations: C-3000
Type Strain: no
Biosafety Level: 1
Product Format: freeze-dried

Escherichia coli bacteriophage MS2 (ATCC® 15597-B1™)

ATCC® Number: 15597-B1™
Deposited As: MS2
Strain Designations: MS2
Type Strain: no
Biosafety Level: 1
Product Format: freeze-dried

Figure 5. Detailed specifications of the microorganisms used.

4.2. Culture media and reagents

For the preparation of the media and the uniformity of the results, the laboratory used components and chemicals of recognized analytical quality, or a complete dehydrated medium. Only distilled water or water of equivalent purity was used.

The culture media used were the following:

Luria Bertani Agar (LBA)

Formula (g/L):

Tryptone	-----	10,0
Yeast Extract	-----	5,0
Sodium Chloride	-----	10,0
Agar	-----	15,0

Final pH: 7,3 ± 0,2. Autoclaved at 121 +/- 3 °C for 15 mins.

Luria Bertani Agar Semi-solid (LBAss)

Formula (g/L):

Tryptone	-----	10,0
Yeast Extract	-----	5,0
Sodium Chloride	-----	10,0
Agar	-----	6,0

Final pH: 7,3 ± 0,2. Autoclaved at 121 +/- 3 °C for 15 mins.

Luria Bertani broth (LB)

Formula (g/L):

Tryptone	-----	10,0
Yeast Extract	-----	5,0
Sodium Chloride	-----	10,0

Final pH: 7,3 ± 0,2. Autoclaved at 121 +/- 3 °C for 15 mins.

Solution SM

Formula (g/L):

Sodium Chloride	-----	5,8
Magnesium Sulphate	-----	2,0

5 mL of Tris-Cl 1M (pH 7,3 ± 0,2) is added and filtered using membrane of 0,2 µm.

Buffer Tris-Mg-Ca

10mM	Tris-HCl
10mM	MgSO ₄
5mM CaCl ₂	

Final pH: 7,5 ± 0,3. Sterilization by filtration using membrane of 0,2 µm.

Calcium Chloride 0,5M

Formula (g/100mL):

CaCl ₂ 2H ₂ O	-----	5,5
-------------------------------------	-------	-----

Sterilization by filtration using membrane of 0,2 µm.

Magnesium Sulphate 1M

Formula (g/100mL):

MgSO ₄	-----	24,6
-------------------	-------	------

Sterilization by filtration using membrane of 0,2 µm.

Tris-HCl 0,5M

Formula (g/500mL):

Tris	-----	60,57 g
------	-------	---------

In 400 mL of distilled water add 60,57 g of Tris base and adjust the pH at 7,5 using HCl. Complete the volume with distilled water to 500 mL. Final pH: 7,3 ± 0,2. Autoclaved at 121 +/- 3 °C for 15 mins.

Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1X

Formula (g/L):

Sodium Chloride	-----	10,0 g
Potassium Chloride	-----	0,25 g
Disodium Hydrogen Phosphate	-----	1,12 g
Potassium Phosphate	-----	0,25 g

Final pH: 7,2 ± 0,2. Sterilization by filtration using membrane of 0,2 µm.

Microorganisms

A suspension of bacteriophage MS2 ATCC 15597-B1 in SM and a culture of *Escherichia coli* ATCC 15597, grown to exponential phase, was used for the tests.

4.3. Equipment

Incubator at 36 ± 2 °C

Incubator with shaking at 36 ± 2 °C

pH-meter

McFarland densitometer

Vortex

Water bath

Biosafety cabinet level II

Petri dishes

Culture tubes

Refrigerator at 5 ± 3 °C

Freezer at -70 ± 10 °C

Micropipettes and tips

Sterile swabs

Nebulizer

Impaction column from ELPI+ device from INTA

Biosampler to collect aerosols into liquid (Biocapture)

Biosampler to collect aerosols into solid (AirSampler)

Cold plasma bipolar ionization device (PlasmaAir)

4.4. Preparation of microbial cultures

It was used a bacteriophage suspension stored at 4 °C in 0.3% chloroform, prepared according to the instructions described in the UNE-EN ISO 10705-1, and a suspension of *Escherichia coli* stored at -80 °C in 15% glycerol. Before starting the tests, the viral titer of the bacteriophage was calculated. To determine the viral titer, 20 ± 2 mL of LB medium was added to a bottle with a capacity of 50 mL, preheated to 37 °C, and inoculated with 200 μ L of *Escherichia coli* grown overnight (inoculum 1:100) and following incubation at 37 ± 2 °C for 3 ± 1 h with gentle shaking (150 rpm) until the exponential growth phase was reached (approximately 10^8 cfu/mL). To check the growth, the turbidity of the bacterial culture was measured every 30 min using the McFarland method, extrapolating the cfu corresponding to the theoretical McFarland units (Table V).

Table V. Correlation between bacterial concentration and theoretical McFarland units.

<i>E. coli</i> concentration x 10^8 /mL	McFarland units
1,5	0,5
3	1
6	2
9	3
12	4
15	5
18	6
21	7

When the bacterial culture reached the exponential growth phase it was rapidly cooled down by transferring the bottle to a container with ice. Serial dilutions were made, adding 50 µL of a phage suspension stored at 4 °C in the presence of 0.3% chloroform, to 450 µL of the Tris-Mg-Ca buffer. 120 µL of each dilution were mixed with 120 µL of the host strain grown to exponential phase in duplicate. The mixture was incubated for 10 min at room temperature for the bacteriophage to bind to the host cells. Subsequently, 200 µL of the bacteriophage/host cell mixture was taken and added to a tube containing 3 mL of pre-heated LBAss medium (at 48 °C). After carefully mixed by inversion, the contents were poured onto the surface of LBA-containing Petri dish. Petri dishes were allowed to solidify and were incubated at 36 ± 2 °C for 18 ± 2 h.

After the incubation time, the number of lysis or viral plaques was determined by applying the following formula:

$$titer = \left(\frac{N}{d}\right) \times 10 \text{ pfu/mL}$$

$$N = \frac{(n1 + 0,1n2)}{2}$$

n1: Number of plaques in highest dilution that can be counted

n2: Number of plaques in the dilution before the highest that can be counted

d: highest dilution that can be counted

The viral titer of the initial bacteriophage suspension used for nebulization in the trial 2 and 3 were:

Trial 2 (positive control): 2.25x10⁵ pfu/mL.

Trial 3 (ionization test): 2.47x10⁵ pfu/mL.

To quantify the number of viable cfu/mL in bacterial cultures, serial dilutions of the culture were prepared by adding 100 µL of the culture to 900 µL of the PBS buffer and 100 µL of each dilution was spread inoculated onto LBA medium, in duplicate and following incubation at 36 ± 2 °C for 20 ± 4 h. After the incubation time, the number of viable bacteria was quantified by direct counting the colonies on the LBA plates. The following equation was applied to calculate the cfu/mL:

$$N = \frac{c}{(n1 + 0,1n2)d} \times 10$$

c: the sum of the colonies counted on all the plates that can be counted.

n1: the number of plates counted in the lowest dilution.

n2: the number of plates counted in the highest dilution.

d: the dilution factor corresponding to the lowest dilution.

4.5. Methodology

For the trials with the bacteriophage MS2, 500 mL of a bacteriophage suspension in SM buffer was prepared to generate the aerosol and disperse it in the test room for subsequently collection of air samples, by impaction in solid and liquid medium, and surfaces using swabs.

To recover the bacteriophage from the swab samples, 2 mL of SM solution were added to the sterile tube containing each of the swabs and shaken for 1 h at 4 °C. The washing liquid was collected in a sterile tube, which was kept at 4 °C until the microbial analysis was carried out.

Serial dilutions were made from the suspension of the bacteriophage recovered from the swabs, as well as from the air liquid samples, following the process described in section 4.4. After incubation, the number of plaques was determined in the highest dilution that could be counted and in the immediately preceding one using equation 1.

Samples collected by impaction on solid medium were incubated directly at 36 ± 2 °C for 18 ± 2 h. The solid medium consisted of a spread inoculation of 100 μ L of *E. coli* in exponential phase, for the trial 1, and a 200 μ L inoculum of the *E. coli* in exponential phase added to a 4 mL tube containing pre-heated LBAss medium (48 °C), which was carefully mixed by inversion and poured onto the surface of a Petri dish with LBA medium, for trials 2 and 3.

The trial 4 was carried out by directly applying the bipolar ionization on inoculated solid and liquid cultures with *E. coli* in exponential phase.

After treatment, solid samples were directly incubated at 36 ± 2 °C for 18 ± 2 h. Serial dilutions from the liquid samples were prepared following the process described in section 4.4. After incubation, the number of viable bacteria was quantified by direct counting the colonies on LBA plates. Equation 2 was applied to calculate the number of cfu/mL.

5. Trials execution dates

The entire project was carried out between 4th and 14th of May 2020.

6. Sampling plan or procedure (when applicable)

Not applicable.

7. Results

The results obtained in each trial were as follows:

7.1. Trial 1

This trial was named as positive control since the bipolar ionization was not applied.

No significant bacteriophage numbers were obtained in air and on the surfaces. Furthermore, the methodology used for the biosampler on solid medium did not worked.

Another repetition of the positive control with changes in the experimental design was proposed to allow comparison with the bipolar ionization assay.

7.2. Trial 2

This trial was the repetition of the previous positive control (trial 1). Since the first trial showed low concentration of the bacteriophage in the air, some changes were made in the sampling areas and time as well as the biosampler technique on solid medium.

The concentration of the bacteriophage in the solution used for nebulization was 2.25×10^5 pfu/mL. The results obtained in the control trial are shown in Table VI.

Table VI. Results obtained in the control trial (trial 2).

Samples from biosampler in liquid	Counts (log pfu/mL)
LA – Time point 1 (5 min sampling during nebulization)	4,16
LB – Time point 2 (5 min sampling after nebulization)	3,46
Samples from biosampler in solid	Counts (log pfu/L)
S1 – min 0	(>265 pfu) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 pfu) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 pfu) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 pfu) – >4,21
S5 – min 5,6	(>265 pfu) – >4,21
S6 – min 7	(>265 pfu) – >4,21
S7 – min 8,4	(>265 pfu) – >4,21
S8 – min 9,8	(>265 pfu) – >4,21
Surface samples	Counts (log pfu/cm ²)
H1 – table	1,60
H2 – mask	1,48
H3 – ELPI+ device (INTA)	1,18
H4 – air return area	0
H5 – impaction column of the ELPI+ device	0
H6 – impaction column of the ELPI+ device	0
H7 – impaction column of the ELPI+ device	0
H8 – impaction column of the ELPI+ device	0,49

A decrease of the bacteriophage concentration was observed at time 1 (5 minutes of sampling during nebulization) and 2 (5 minutes of sampling after nebulization) in the sampling with the liquid biosampler. The possible reason is that virus particles fall to the floor when they are associated with large water particles. This would be justified if we had found bacteriophage values in the impaction column samples. It would be necessary to take more surface samples from impaction column to be able to visualize in what particle size the bacteriophage can be found.

Regarding the samples from the solid biosampler, uncountable values were obtained, corresponding to numbers greater than 1000 bacteriophage particles. Because the equipment used requires adjustment of the total number of particles per Petri dish, the maximum number had to be set as 265 pfu/L. The transformation of these data leads us to an average count of 4.21 log pfu/L.

Results in the order of 1-1.6 log pfu/cm² was obtained on the surfaces sampled by swabbing. As previously mentioned, no bacteriophage values were found in the impaction column and the same in the area of the air return area.

7.3. Trial 3

This trial was carried out in the same way as trial 2 (positive control) and applying bipolar ionization technology to treat the room air.

The concentration of the bacteriophage in the solution used for nebulization was 2.47x10⁵ pfu/mL.

The results obtained in this trial are shown in Table VII.

Table VII. Results obtained in trial 3.

Samples from biosampler in liquid	Counts (log pfu/mL)
LA – Time point 1 (5 min sampling during nebulization)	4,00
LB – Time point 2 (5 min sampling after nebulization)	3,04
Samples from biosampler in solid	Counts (log pfu/L)
S1 – min 0	(>265 pfu) – >4,21
S2 – min 1,4	(>265 pfu) – >4,21
S3 – min 2,8	(>265 pfu) – >4,21
S4 – min 4,2	(>265 pfu) – >4,21
S5 – min 5,6	(97 pfu) – 3,08
S6 – min 7	(57 pfu) – 2,81
S7 – min 8,4	(61 pfu) – 2,84
S8 – min 9,8	(38 pfu) – 2,61
Surface samples	Counts (log pfu/cm ²)
H1 – table	0,75
H2 – mask	0,80
H3 – ELPI+ device (INTA)	0,52
H4 – air return area	0
H5 – impaction column of the ELPI+ device	0
H6 – impaction column of the ELPI+ device	0
H7 – impaction column of the ELPI+ device	0
H8 – impaction column of the ELPI+ device	0,23

A slightly decrease of bacteriophage concentration can be observed at time 1 (5 minutes of sampling during nebulization) and 2 (5 minutes of sampling after nebulization) in the sampling with the liquid biosampler when compared with the control trial (trial 2). However, this reduction was not significant.

Regarding the solid impactor samples, uncountable values were obtained during the first 5 min of sampling, which correspond to the nebulization time, which can be justified since the amount of bacteriophage that was being dispersed in the air was quite high. In addition, a significant reduction was observed in samples collected between 5 and 10 min after nebulization (samples S5-S8). It is of great importance to highlight that a reduction of more than 2 log of the bacteriophage was obtained only with a time of exposure of 10 min to bipolar ionization.

It was observed a reduction in the order of 0.70-0.85 log pfu/cm² of the analysed surfaces sampled by swabbing. As in the control trial, no bacteriophage values were found in the impaction column or in the air return area.

7.4. Trial 4

No conclusive results were obtained on the efficiency of ionization against *E. coli* since the methodology used in the laboratory did not work. It would be of interest to repeat this assay.

8. Declaration of conformity (when applicable)

Does not apply.

9. Summary, opinions, interpretations

A total of 4 trials was performed. Two of them did not contribute to any conclusion (Trials 1 and 4), requiring their repetition.

From the results obtained in trials 2 and 3, it can be concluded that the cold plasma bipolar ionization system was effective to reduce the concentration of the bacteriophage MS2 in the air by approximately 2 log units under the conditions tested in this hotel room.

10. Annex

10.1 Bibliography

- Adams M.H. Agar overlay methods for routine phage production. Interscience Publishers Inc., New York, 1959.
- American Type Culture Collection (ATCC) PO Box 1549. Manassas, VA 20108 USA. www.atcc.org.
- ASTM-1053:97. Actividad virocida para superficies inertes.
- Cormier J. and Janes M. A double layer plaque assay using spread plate technique for enumeration of bacteriophage MS². J Virol Methods. 2014, 196:86-92.
- Joseph Sambrook and David W. Russell. Molecular Cloning a Laboratory Manual. (Third Edition). 2001 by Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. ISBN 0-87969-576-5 (cloth) -- ISBN 0-87969-577-3 (pbk). Laura S. and Jan Manchak, Microbiology (1998), 144: 2579-2587.
- O.M.S. en el "Manual de Bioseguridad" y también según la Directiva del Consejo 90/679/CEE, para la protección de los trabajadores expuestos a agentes biológicos.
- Orden de 18 de octubre de 1976 (M. Ind., B.O.E. 3.12.1976, rect. 23.2.1977), sobre Prevención y Corrección de la contaminación atmosférica de origen industrial.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo.
- Real Decreto legislativo 1302/86 de 28.6, (M. Obras Púb., B.O.E. 30.6.1986) sobre Evaluación de impacto ambiental.
- UNE_EN 13610:2003. Ensayo cuantitativo para evaluación de la actividad viricida frente a bacteriofagos.
- UNE-EN ISO 10705-1. Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 1: recuento de bacteriófagos ARN F específicos.
- UNE-EN 1040:2006 "Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1).

11. Confidential notice

The information contained in this document and accompanying data are intended only for the person or entity to which it is addressed and may contain confidential and / or privileged material. If you are not the intended recipient of this document, the use of this information or any disclosure, copying or distribution is prohibited and may be unlawful. If you received this in error, please contact the sender and delete all copies of this document.