

|                                  |  |                                    |             |
|----------------------------------|--|------------------------------------|-------------|
| <b>Nº expediente SDGSISTTER:</b> | 0321000346NBQPENS  | <b>Nº Expediente Departamento:</b> | NBQ20210018 |
| <b>Código del documento:</b>     | Informe de ensayo nº NBQ20210018-01  |                                    |             |
| <b>Título del documento:</b>     | PRUEBAS DE RETENCIÓN Y ELIMINACIÓN DE VIRUS MEDIANTE LAS UNIDADES DE VENTILACIÓN Y PURIFICACIÓN ZONAIR3D |                                    |             |

**Cliente:**

|   |   |
|---|---|
| Cliente:                                      | ZONAIR3D, SL  |
| Dirección:                                    | Carrer Cerdanya nº7 (esquina C/Barcelonés)<br>Polígono Ind. La Borda 08140 Caldes de Montbui<br>(Barcelona) |
| Datos POC Cliente<br>(nombre / correo / tfno) | Xavier Trillo<br>Teléfono: +34 93 551 03 40<br>Email: direccion@zonair3d.com                                |



**SUBDIRECCIÓN GENERAL  
DE SISTEMAS TERRESTRES**

**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 Paloma Lorenzo Lozano (911742367)

|                              | Nombre / Responsabilidad                | Firma | Fecha |
|------------------------------|---|-------|-------|
| <b>Realizado por:</b>        | <b>Dra Matilde Gil García</b>           |       |       |
| <b>Director Técnico:</b>     | <b>Dra Paloma Lorenzo Lozano</b>        |       |       |
| <b>Aprobado por:</b>         | <b>Tcol Juan Carlos Cabria Ramos</b>    |       |       |
| <b>Revisado por Calidad:</b> | <b>Responsable Calidad Departamento</b> |       |       |

*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.....  | 5  |
| 4. Procedimientos de ensayo / Normativa .....  | 5  |
| 4.1. Selección del material biológico .....  | 5  |
| 4.2. Medios de cultivo y reactivos .....   | 7  |
| 4.3. Equipos utilizados.....   | 8  |
| 4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo.....  | 9  |
| 4.5. Desarrollo de los ensayos .....   | 10 |
| 5. Fechas de ejecución de los ensayos .....  | 11 |
| 6. Plan o procedimiento de muestreo (cuando sea aplicable).....                            | 11 |
| 7. Resultados obtenidos .....  | 15 |
| 7.1. Evolución del aerosol de NaCl .....   | 15 |
| 7.2. Evolución del bioaerosol.....   | 16 |
| 7.3. Cálculo del título viral en las muestras recogidas .....                              | 18 |
| 7.4. Evaluación de la reducción de la infectividad utilizando el equipo de ionización..... | 21 |
| 8. Declaración de conformidad (cuando proceda) .....                                       | 21 |
| 9. Resumen, opiniones, interpretaciones.....   | 21 |
| 10. Anexos .....   | 23 |
| 10.1. Anexo 3. Bibliografía.....   | 23 |

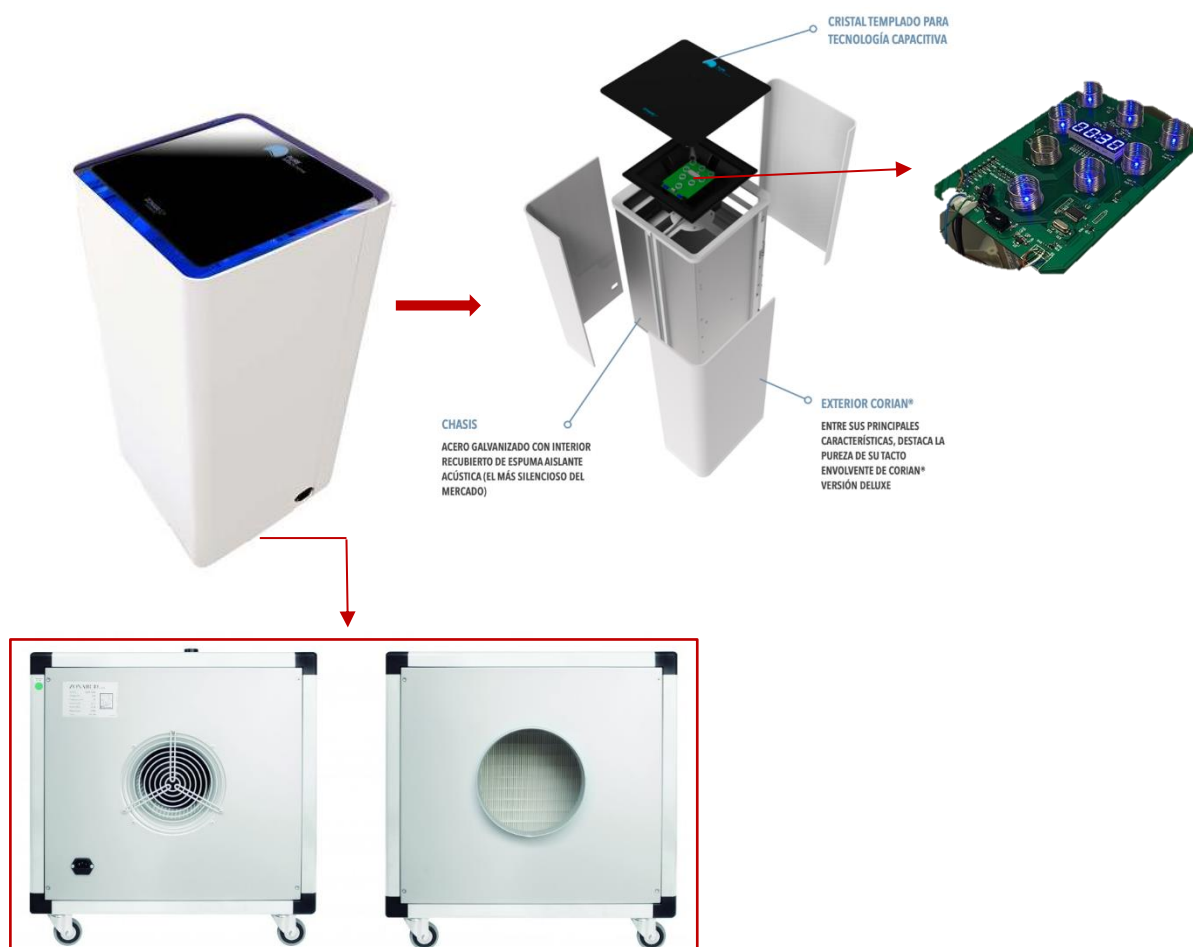
*Este informe no deberá reproducirse parcialmente sin autorización del Subdirector General de Sistemas Terrestres  
El presente informe solo afecta a las muestras sometidas a ensayo*

## 1. Objeto

El objeto del presente informe es la evaluación de la disminución de la carga vírica, en el interior de una vitrina de gases en la que se ha aerosolizado una suspensión del virus bacteriano MS2, cuando se aplica la unidad de ventilación y purificación ZONAIR3D.

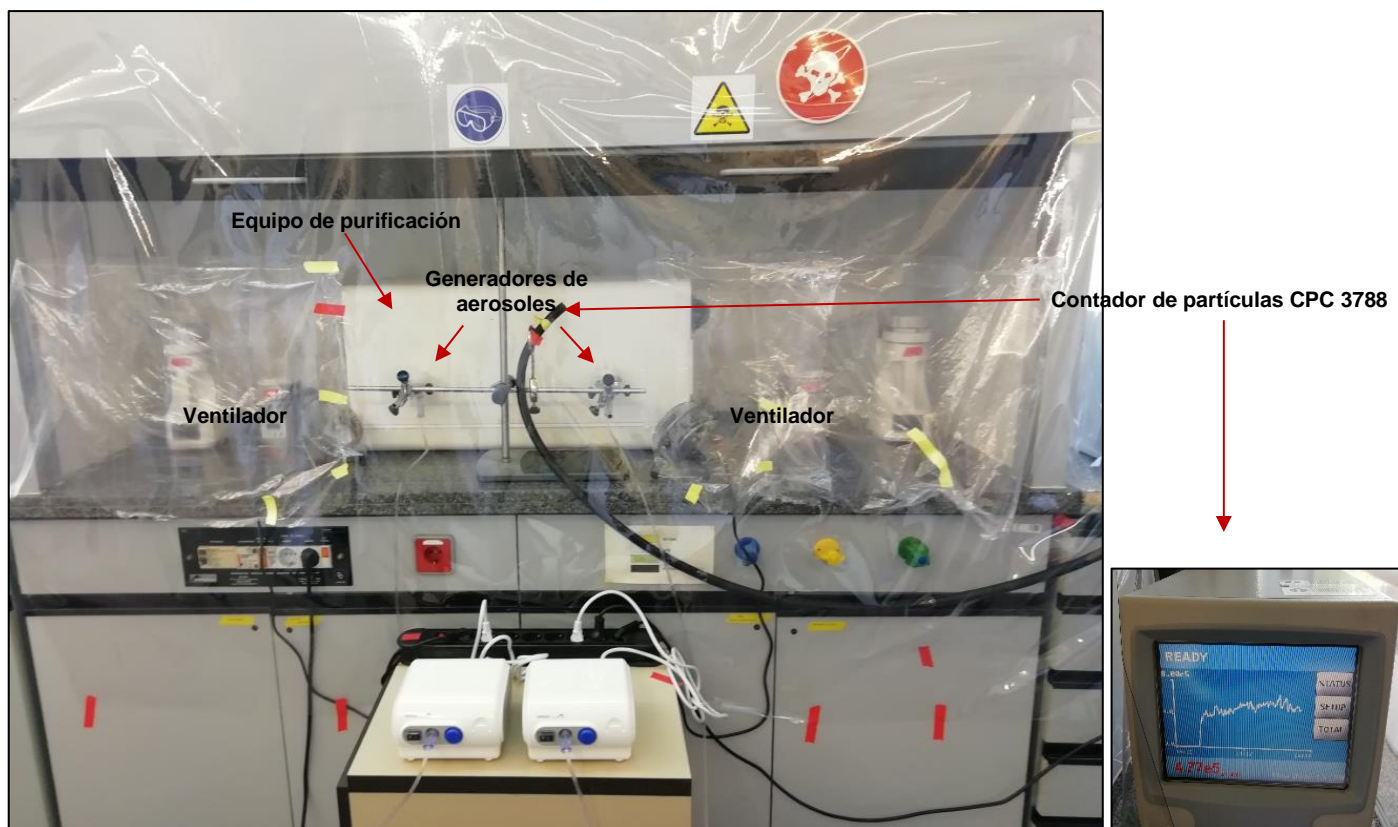
## 2. Antecedentes

Con fecha 26 de enero de 2021, por parte de la empresa ZONAIR3D se solicitó al Área de Defensa Biológica, Dpto. NBQ de la SDGSISTTER, la realización de una serie de ensayos encaminados a la evaluación de la disminución de la carga vírica en aire cuando se utiliza la unidad de ventilación y purificación ZONAIR3D (Figura 1).



**Figura 1.** Unidad de ventilación y purificación ZONAIR3D.

Los ensayos se llevaron a cabo en una vitrina de gases de 1,87 x 0,77 x 0,60 m (0,864 m<sup>3</sup>), la parte frontal se cubrió con un plástico para invernadero y se apagaron los sistemas de extracción con objeto de generar una nube o bioaerosol estable en su interior. El equipo de purificación se colocó, centrado, en el fondo de la vitrina. Para la generación del bioaerosol se utilizaron dos nebulizadores, colocados en la zona media delante del sistema de purificación y para ayudar a su dispersión se utilizaron dos ventiladores, situados en los laterales (Figura 2).



**Figura 2.** Vitrina con equipos utilizados en la realización de los ensayos.

Se realizaron dos ensayos, en el primero se determinó el comportamiento de una nube o aerosol generada por dos nebulizadores (NE-C28P Omron) (figura 3), utilizando una solución de NaCl al 10%, que genera un aerosol polidisperso con un tamaño medio de partículas de 200 nm. En el segundo ensayo se comprobó la eficacia del equipo de purificación de aire cuando se aerosolizó una suspensión del virus bacteriano MS2. Para ello se tomaron muestras antes (control positivo) y después de conectar el equipo de purificación. Para la toma de muestras se utilizaron cuatro biocolectores de aerosoles, sobre medio sólido, de dos modelos diferentes (Mas-100 Eco® y SAS Super ISO 100) (figura 4A y 4B). En éstos el bioaerosol muestreado se hizo incidir sobre placas de Petri, con medio de cultivo sólido Luria Bertani Agar (LBA), inoculadas con la bacteria *Escherichia coli* (hospedadora del bacteriófago MS2) crecida hasta fase exponencial. Una vez colocada la placa, los muestreadores se dejaron funcionando durante 1 minuto hasta recoger un volumen de 100 dm<sup>3</sup> de aire por placa. En la tabla III se describen las muestras recogidas en el ensayo.



**Figura 3.** Generador de aerosol biológico o nebulizador (NE-C28P Omron).

A



**Figura 4. A:** Biocolelector de aerosoles sobre medio sólido (Mas-100 Eco®). **B:** Biocolelector de aerosoles sobre medio sólido (SAS Super ISO 100).

B



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 lo 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. Además, ha 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.

### 3. Muestras, Objetos e ítems recibidos

El Área de Defensa Biológica recibió la Unidad de ventilación y purificación de ZONAIR3D del cliente (Figura 1).

### 4. Procedimientos de ensayo / Normativa

Para evaluar la actividad viricida 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), antes y después del proceso de descontaminación, es decir, de las muestras recogidas en ausencia del equipo de purificación (control positivo) respecto a las muestras recogidas tras descontaminación con el equipo de purificación, en las mismas posiciones y tiempos. 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).

#### 4.1. Selección del material biológico

Para dar cumplimiento al trabajo solicitado se ha seleccionado el virus bacteriano 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 virus bacteriano 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 virus bacteriano 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 viricida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria” (UNE\_EN 13610:2003), “Actividad viricida para superficies inertes” (ASTM-1053:97). Además, el virus bacteriano MS2 es más resistente que el SARS-CoV-2 a radiación UVC puesto que su energía de inactivación es de 64 mJ/cm<sup>2</sup> frente a los 6,7 mJ/cm<sup>2</sup> de este último.

*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 viricida frente a bacteriófagos de los desinfectantes químicos utilizados en el ámbito agroalimentario y en industria” (UNE\_EN 13610:2003), “Actividad viricida para superficies inertes” (ASTM-1053:97).

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

***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

***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

**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:

- 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:  $7,3 \pm 0,2$ . Se esteriliza en autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  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:  $7,3 \pm 0,2$ . Se esteriliza en autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  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:  $7,3 \pm 0,2$ . Se esteriliza en autoclave a  $121 \pm 3^\circ\text{C}$  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  $7,3 \pm 0,2$ ). Se esteriliza por filtración sobre membrana de  $0,2 \mu\text{m}$  de tamaño de poro.



- Buffer Tris-Mg-Ca

- 10mM Tris-HCl

- 10mM MgSO<sub>4</sub>

- 5mM CaCl<sub>2</sub>

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

- Cloruro Cálcico 0,5M

Fórmula (en g/100mL):

CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O ----- 5,5

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

- Sulfato Magnésico 1M

Fórmula (en g/100mL):

MgSO<sub>4</sub>-----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.

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.

### 4.3. Equipos utilizados

Estufa de cultivo a 36 ± 2°C

Incubador termostático a 36 ± 2°C con agitación

Microondas

pH-metro

McFarlómetro

Tubos, para medir en McFarlómetro

Vortex

Baño termostatzado

*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*





Cabina de seguridad biológica nivel II

Asa de siembra (Digrafsky)

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, de diferente volumen

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

Generador de aerosol biológico o nebulizador (Figura 3)

Contador de partículas el contador CPC 3788

Biocolelector de aerosoles sobre medio sólido (Mas-100 Eco®) (Figura 4A)

Biocolelector de aerosoles sobre medio sólido (SAS Super ISO 100) (Figura 4B)

Unidades de ventilación y purificación ZONAIR3D (suministrado por el cliente) (Figura 1)

#### 4.4. Preparación de las suspensiones de ensayo

Se partió de una suspensión del virus bacteriano, conservado a  $4^{\circ}\text{C}$  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  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerol al 15%. Se calculó el título viral de la suspensión de bacteriófago a nebulizar.

Para el cálculo del título viral se añadieron  $20 \pm 2$  mL de medio LB a una botella con una capacidad de 50 mL, precalentada a  $37^{\circ}\text{C}$ , y se inoculó con 200  $\mu\text{L}$  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  $3 \pm 1$  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 y se midió turbidez en un McFarlómetro, extrapolándose el número de unidades formadoras de colonias (ufc) correspondientes a las unidades de McFarland teóricas (Tabla I).

**Tabla I.** Correspondencia entre Concentración Bacteriana y Unidades de McFarland teóricas

| Concentración Bacteriana $\times 10^8/\text{ml}$ | 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 ( $2,1 \times 10^8$  ufc/mL) 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  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  durante  $18 \pm 2$  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

A continuación, se muestran el título viral de la suspensión inicial del bacteriófago utilizado para la nebulización del mismo en el ensayo (tabla II).

**Tabla II:** Unidades formadoras de placa de lisis (ufp) a partir de la suspensión inicial del bacteriófago

| Dilución  | ufp        | ufp        |
|-----------|------------|------------|
| Directo   | Incontable | Incontable |
| $10^{-1}$ | Incontable | Incontable |
| $10^{-2}$ | Incontable | Incontable |
| $10^{-3}$ | 453        | 372        |
| $10^{-4}$ | 42         | 50         |
| $10^{-5}$ | 1          | 2          |
| $10^{-6}$ | 1          | 0          |
| $10^{-7}$ | 0          | 0          |
| $10^{-8}$ | 0          | 0          |

Título viral suspensión inicial de bacteriófago:  $1,75 \times 10^7$  ufp/mL

## 4.5. Desarrollo de los ensayos

La efectividad del equipo de ionización, sobre un bioaerosol generado con una suspensión del bacteriófago MS2, se abordó utilizando dos métodos distintos:

- Medida de la concentración de partículas totales utilizando un contador de partículas portátil.
- Cálculo del título viral y reducción de la infectividad.

### 4.5.1. Evolución de la nube o aerosol

Como se ha indicado en el apartado 2, se determinó el comportamiento de una nube o aerosol generada por dos nebulizadores (NE-C28P Omron) utilizando una solución de NaCl al 10%. Se midió el número de partículas con el contador CPC 3788 a diferentes tiempos de nebulización, se determinó el tiempo en estabilización la nube y cómo decae una vez terminada la nebulización.

*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*



#### 4.5.2. Generación del bioaerosol

Como ya se ha indicado en el apartado 4.4, para los ensayos con el bacteriófago MS2, se preparó una dilución ( $1,75 \times 10^5$  ufp/mL) de la suspensión inicial del bacteriófago en tampón SM. Para generar el bioaerosol se añadieron 7 mL de esta dilución a cada uno de los nebulizadores y ésta se dispersó con ayuda de dos ventiladores. El número de partículas en la nube se monitorizó en continuo utilizando el contador CPC 3788. Posteriormente, se recogieron muestras de aire por impactación sobre medio sólido, en cuatro posiciones de la vitrina y en diferentes tiempos después de la nebulización del bacteriófago. El muestreo se inició cuando la nube se estabilizó, a los 7 minutos de nebulización (ver apartado 4.5.1).

Para el control positivo no se utilizó el equipo de purificación, mientras que en el ensayo de descontaminación el equipo se activó.

#### 4.5.3. Procesamiento de las muestras

Las muestras recogidas por impactación sobre medio sólido se incubaron directamente en una estufa de cultivo a  $37 \pm 2$  °C durante  $18 \pm 2$  horas. El medio sólido consistió en una placa de Petri con medio de cultivo LB agar inoculado, mediante la técnica de siembra en doble capa, con 200 µL de la bacteria *Escherichia coli* crecida hasta fase exponencial ( $2,1 \times 10^8$  ufc/mL).

Transcurrido el tiempo de incubación se determinó el número de placas de lisis o virales en las placas de Petri incubadas y se determinó el título viral en el volumen de muestra de aire recogida (100 L) aplicando un factor de probabilidad (Pr) que viene dado por el fabricante.

### 5. Fechas de ejecución de los ensayos

Los ensayos se realizaron entre los días 24 y 28 de mayo de 2021.

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

Como se ha comentado en el apartado 4.5.1 el muestreo se inició a los 7 minutos de nebulización, cuando según estudios previos la nube se estabiliza. En todos los ensayos realizados se tomaron muestras del bioaerosol utilizando los dos tipos de biocolectores, aspirando durante 1 minuto (figura 6).

En la tabla III y IV se describen los controles positivos y negativos y las muestras recogidas en el ensayo.

**Tabla III.** Muestras recogidas en el ensayo con bacteriófago MS2.

| Identificación | Alias | Descripción del objeto / muestra / ítem   | Cantidad |
|----------------|-------|---|----------|
| NBQ20210018001 | 1C    | Muestra de aire recogida, previa a la nebulización, en la posición A de la vitrina, sin utilizar impactador en medio sólido (control negativo).                       | 1        |
| NBQ20210018002 | 2C    | Muestra de aire recogida, previa a la nebulización, en la posición B de la vitrina, sin utilizar impactador en medio sólido (control negativo).                       | 1        |
| NBQ20210018003 | A1C   | Muestra de aire recogida, previa a la nebulización, en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), (control negativo).      | 1        |
| NBQ20210018004 | B1C   | Muestra de aire recogida, previa a la nebulización, en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), (control negativo).      | 1        |
| NBQ20210018005 | A2C   | Muestra de aire recogida, previa a la nebulización, en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), (control negativo). | 1        |

Continúa en página siguiente



Continuación de la tabla III

| Identificación | Alias                               | Descripción del objeto / muestra / ítem  | Cantidad |
|----------------|-------------------------------------|--|----------|
| NBQ20210018006 | B2C                                 | Muestra de aire recogida, previa a la nebulización, en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), (control negativo).                                | 1        |
| NBQ20210018007 | A1(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 0 minutos después de la nebulización (control positivo).       | 1        |
| NBQ20210018008 | B1(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 0 minutos después de la nebulización (control positivo).       | 1        |
| NBQ20210018009 | A2(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 0 minutos después de la nebulización (control positivo).  | 1        |
| NBQ20210018010 | B2(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 0 minutos después de la nebulización (control positivo).  | 1        |
| NBQ20210018011 | A1(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 5 minutos después de la nebulización (control positivo).       | 1        |
| NBQ20210018012 | B1(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 5 minutos después de la nebulización (control positivo).       | 1        |
| NBQ20210018013 | A2(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 5 minutos después de la nebulización (control positivo).  | 1        |
| NBQ20210018014 | B2(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 5 minutos después de la nebulización (control positivo).  | 1        |
| NBQ20210018015 | A1(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 10 minutos después de la nebulización (control positivo).      | 1        |
| NBQ20210018016 | B1(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 10 minutos después de la nebulización (control positivo).      | 1        |
| NBQ20210018017 | A2(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 10 minutos después de la nebulización (control positivo). | 1        |
| NBQ20210018018 | B2(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 10 minutos después de la nebulización (control positivo). | 1        |
| NBQ20210018019 | A1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 15 minutos después de la nebulización (control positivo).      | 1        |
| NBQ20210018020 | B1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 15 minutos después de la nebulización (control positivo).      | 1        |
| NBQ20210018021 | A1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 15 minutos después de la nebulización (control positivo). | 1        |
| NBQ20210018022 | B1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 15 minutos después de la nebulización (control positivo). | 1        |

Continúa en página siguiente

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

MINISTERIO DE DEFENSA  
INSTITUTO NACIONAL DE TÉCNICA  
AEROSPACIAL



Continuación de la tabla III

| Identificación | Alias                               | Descripción del objeto / muestra / ítem  | Cantidad |
|----------------|-------------------------------------|--|----------|
| NBQ20210018023 | A1(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 20 minutos después de la nebulización (control positivo).      | 1        |
| NBQ20210018024 | B1(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 20 minutos después de la nebulización (control positivo).      | 1        |
| NBQ20210018025 | A2(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición A de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 20 minutos después de la nebulización (control positivo). | 1        |
| NBQ20210018026 | B2(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | Muestra de aire, sin descontaminar, recogida en la posición B de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 20 minutos después de la nebulización (control positivo). | 1        |
| NBQ20210018027 | A1(10 <sup>5</sup> )0               | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 0 minutos después de tratamiento con generador de ozono.                           | 1        |
| NBQ20210018028 | B1(10 <sup>5</sup> )0               | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 0 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                          | 1        |
| NBQ20210018029 | A2(10 <sup>5</sup> )0               | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 0 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                     | 1        |
| NBQ20210018030 | B2(10 <sup>5</sup> )0               | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 0 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                     | 1        |
| NBQ20210018031 | A1(10 <sup>5</sup> )5               | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 5 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                          | 1        |
| NBQ20210018032 | B1(10 <sup>5</sup> )5               | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 5 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                          | 1        |
| NBQ20210018033 | A2(10 <sup>5</sup> )5               | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 5 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                     | 1        |
| NBQ20210018034 | B2(10 <sup>5</sup> )5               | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 5 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                     | 1        |
| NBQ20210018035 | A1(10 <sup>5</sup> )10              | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 10 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                         | 1        |
| NBQ20210018036 | B1(10 <sup>5</sup> )10              | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 10 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                         | 1        |
| NBQ20210018037 | A2(10 <sup>5</sup> )10              | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 10 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                    | 1        |
| NBQ20210018038 | B2(10 <sup>5</sup> )10              | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 15 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                    | 1        |
| NBQ20210018039 | A1(10 <sup>5</sup> )15              | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 15 minutos después del tratamiento con generador de ozono.                         | 1        |

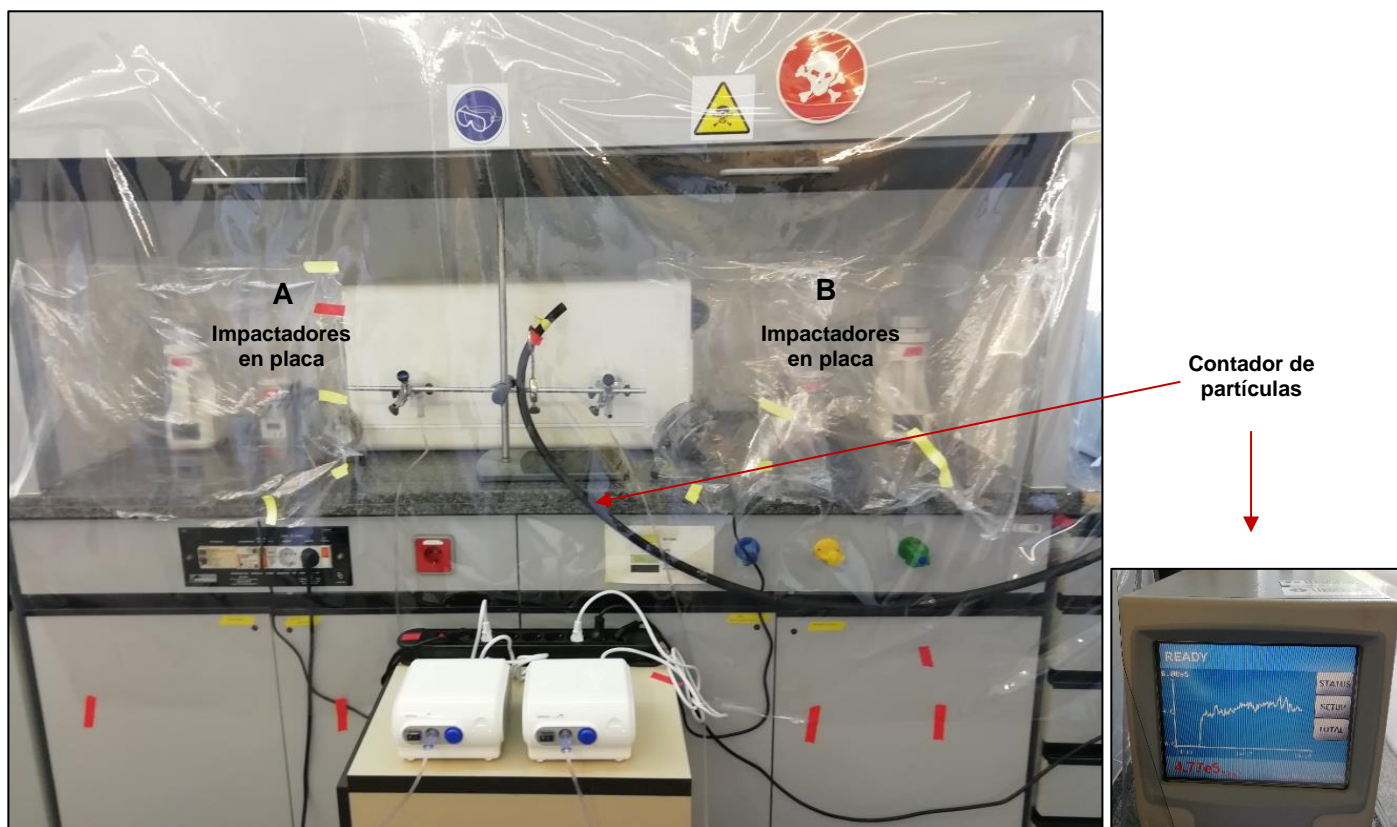
Continúa en página siguiente

*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*

MINISTERIO DE DEFENSA  
INSTITUTO NACIONAL DE TÉCNICA  
AEROSPACIAL

Continuación de la tabla III

| Identificación | Alias                  | Descripción del objeto / muestra / ítem   | Cantidad |
|----------------|------------------------|---|----------|
| NBQ20210018040 | B1(10 <sup>5</sup> )15 | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 15 minutos después del tratamiento con generador de ozono.      | 1        |
| NBQ20210018041 | A2(10 <sup>5</sup> )15 | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 15 minutos después del tratamiento con generador de ozono. | 1        |
| NBQ20210018042 | B2(10 <sup>5</sup> )15 | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 20 minutos después de la nebulización.                     | 1        |
| NBQ20210018043 | A1(10 <sup>5</sup> )20 | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 20 minutos después de la nebulización.                          | 1        |
| NBQ20210018044 | B1(10 <sup>5</sup> )20 | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (Mas-100 Eco®), 20 minutos después de la nebulización.                          | 1        |
| NBQ20210018045 | A2(10 <sup>5</sup> )20 | Muestra de aire recogida en la posición 2 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 20 minutos después de la nebulización.                     | 1        |
| NBQ20210018046 | B2(10 <sup>5</sup> )20 | Muestra de aire recogida en la posición 1 de la vitrina, utilizando el impactador en medio sólido (SAS Super ISO 100), 25 minutos después de la nebulización.                     | 1        |



**Figura 6.** Posiciones A y B donde se toman las muestras a diferentes tiempos después de la nebulización del bacteriófago MS2 en los ensayos.

*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*



## 7. Resultados obtenidos

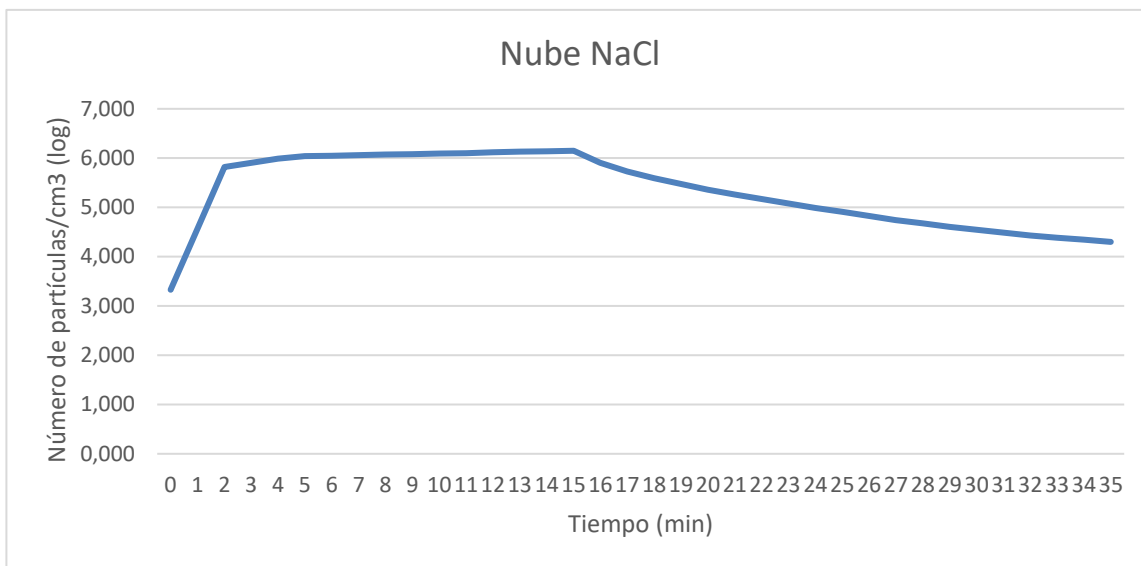
Los resultados obtenidos en cada uno de los ensayos realizados fueron los siguientes:

### 7.1. Evolución del aerosol de NaCl

En la tabla IV se muestra el número de partículas a diferentes tiempos de nebulización, el tiempo que tarda en estabilizarse la nube y cómo decae una vez terminada la nebulización.

**Tabla IV:** Número de partículas/cm<sup>3</sup> en función del tiempo.

| Tiempo de ensayo | Tiempo de nebulización (minutos) | Tiempo después de apagar nebulizador (minutos) | Número de partículas/cm <sup>3</sup> |
|------------------|----------------------------------|--|--------------------------------------|
| 0                | 0                                | -  | 2,13 x 10 <sup>3</sup>               |
| 2                | 2                                | -  | 6,6 x 10 <sup>5</sup>                |
| 4                | 4                                | -  | 9,7 x 10 <sup>5</sup>                |
| 5                | 5                                | -  | <b>1,10 x 10<sup>6</sup></b>         |
| 15               | 15                               | -  | 1,41 x 10 <sup>6</sup>               |
| 16               | -                                | 1  | 8 x 10 <sup>5</sup>                  |
| 17               | -                                | 2  | 5,37 x 10 <sup>5</sup>               |
| 18               | -                                | 3  | 3,92 x 10 <sup>5</sup>               |
| 19               | -                                | 4  | 3 x 10 <sup>5</sup>                  |
| 20               | -                                | 5  | 2,3 x 10 <sup>5</sup>                |
| 21               | -                                | 6  | 1,82 x 10 <sup>5</sup>               |
| 22               | -                                | 7  | 1,49 x 10 <sup>5</sup>               |
| 23               | -                                | 8  | 1,20 x 10 <sup>5</sup>               |
| 24               | -                                | 9  | 9,76 x 10 <sup>4</sup>               |
| 25               | -                                | 10   | 8,12 x 10 <sup>4</sup>               |
| 26               | -                                | 11   | 6,70 x 10 <sup>4</sup>               |
| 27               | -                                | 12   | 5,5 x 10 <sup>4</sup>                |
| 28               | -                                | 13   | 4,72 x 10 <sup>4</sup>               |
| 29               | -                                | 14   | 4,04 x 10 <sup>4</sup>               |
| 30               | -                                | 15   | 3,51 x 10 <sup>4</sup>               |
| 31               | -                                | 16   | 3,09 x 10 <sup>4</sup>               |
| 32               | -                                | 17   | 2,70 x 10 <sup>4</sup>               |
| 33               | -                                | 18   | 2,43 x 10 <sup>4</sup>               |
| 34               | -                                | 19   | 2,20 x 10 <sup>4</sup>               |
| 35               | -                                | 20   | <b>1,99 x 10<sup>4</sup></b>         |



**Figura 7.** Evolución de la nube de NaCl en función del tiempo

En la gráfica se puede observar que la nube tarda, aproximadamente, 5 minutos en estabilizarse alcanzando un número máximo de partículas/cm<sup>3</sup> en torno a 10<sup>6</sup>. Este número se mantiene después de 15 minutos de nebulización. Una vez apagados los nebulizadores el número de partículas/cm<sup>3</sup> decae lentamente, alcanzando un valor de 1,99 x 10<sup>4</sup> partículas/cm<sup>3</sup> transcurridos 20 minutos desde la desconexión.

## 7.2. Evolución del bioaerosol

### 7.2.1. Número de partículas/cm<sup>3</sup>

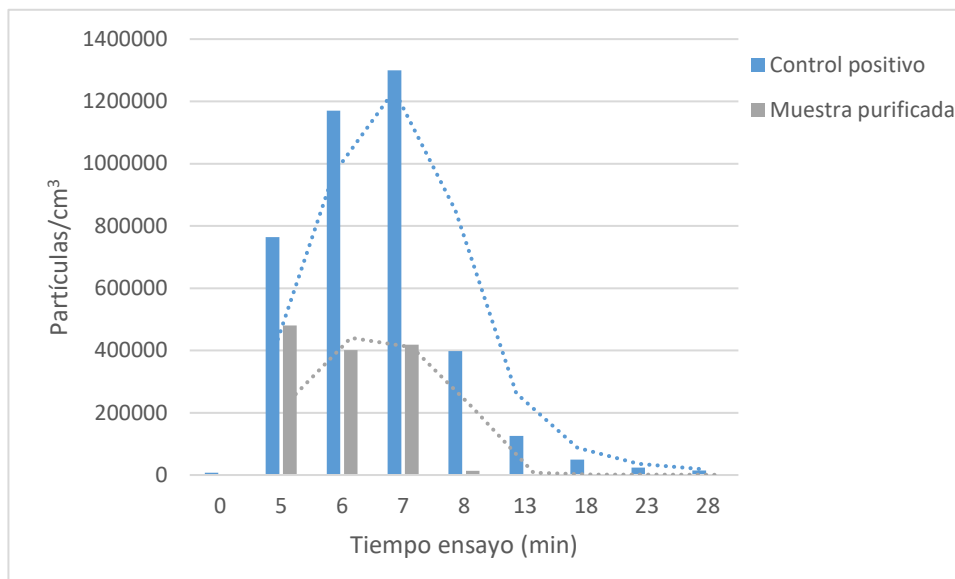
Se realizó una comparativa de la disminución del número de partículas/cm<sup>3</sup>, medidas con el contador CPC 3788, a diferentes tiempos de nebulización con el bacteriófago MS2 en ausencia (control positivo) y presencia del equipo de purificación (tabla V) (figura 8).

**Tabla V:** Número de partículas en el bioaerosol generado de la suspensión del bacteriófago MS2 en ausencia (control positivo) y presencia del equipo de purificación.

| Tiempo de ensayo | Tiempo de nebulización (minutos) | Tiempo después de apagar nebulizador (minutos) | Número de partículas/cm <sup>3</sup> (Control positivo) | Número de partículas/cm <sup>3</sup> (Aerosol purificado) |
|------------------|----------------------------------|--|---|---|
| 0                | 0                                | -  | 7,04 x 10 <sup>3</sup>                                  | 1,01 x 10 <sup>3</sup>                                    |
| 5                | 5                                | -  | 7,64 x 10 <sup>5</sup>                                  | 4,8 x 10 <sup>5</sup>                                     |
| 6                | 6                                | -  | 1,17 x 10 <sup>6</sup>                                  | 4,01 x 10 <sup>5</sup>                                    |
| 7                | 7                                | -  | 1,30 x 10 <sup>6</sup>                                  | 4,19 x 10 <sup>5</sup>                                    |
| 8                | -                                | 0  | 3,98 x 10 <sup>5</sup>                                  | 1,30 x 10 <sup>4</sup>                                    |
| 13               | -                                | 5  | 1,26 x 10 <sup>5</sup>                                  | 7,70 x 10 <sup>2</sup>                                    |
| 18               | -                                | 10   | 4,90 x 10 <sup>4</sup>                                  | 6,62 x 10 <sup>2</sup>                                    |
| 23               | -                                | 15   | 2,42 x 10 <sup>4</sup>                                  | 7,97 x 10 <sup>2</sup>                                    |
| 28               | -                                | 20   | 1,42 x 10 <sup>4</sup>                                  | 5,44 x 10 <sup>2</sup>                                    |

*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*





**Figura 8.** Comparativa del número de partículas/cm<sup>3</sup> en ausencia (control positivo) y presencia del equipo de purificación (descontaminación).

En la gráfica se observa que:

- Hay una disminución del número de partículas con el tiempo, aunque no se aplica el sistema de purificación, posiblemente debido a que las partículas asociadas a moléculas de agua forman aglomerados de diferentes tamaños, cayendo aquellos que tienen mayor peso.
- En el ensayo de descontaminación, el equipo de purificación se puso en funcionamiento a la vez que se generaba el bioaerosol, observando que el número máximo de partículas que se alcanza en el bioaerosol es menor que en el control positivo, aproximadamente 0,5 órdenes de magnitud (diferencia del log nº partículas control positivo y el log nº partículas en la muestra purificada). Esto supone una reducción de un 70%\* del número de partículas en la muestra purificada respecto al control positivo.
- Después de 20 minutos, desde la desconexión de los nebulizadores, el número de partículas, en presencia del purificador de aire está por debajo del número de partículas basales cuantificado al inicio del ensayo. Lo que supone una reducción del 96,2%\* del número de partículas totales en la muestra purificada respecto al control positivo.

\*Para calcular el porcentaje de reducción microbiana después del tratamiento de descontaminación se aplica la fórmula (<https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing/>):

$$P = (1 - 10^{-L}) \times 100$$

Siendo:

P: porcentaje de reducción

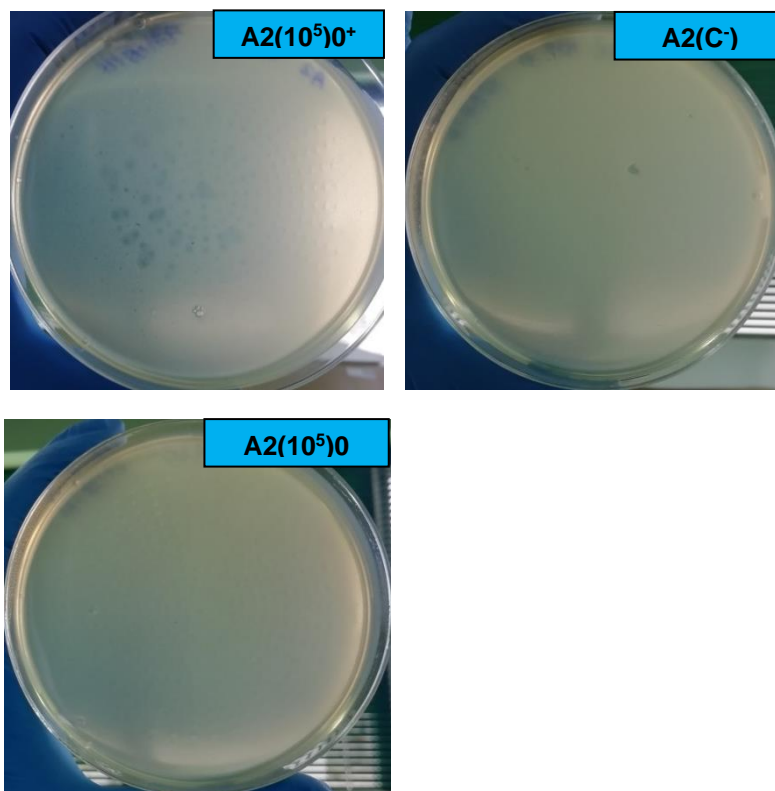
L: reducción logarítmica



### 7.3. Cálculo del título viral en las muestras recogidas

Una vez transcurrido el tiempo necesario para que se produzca el crecimiento de la suspensión bacteriana infectada con el bacteriófago, se procedió a contar el número de placas de lisis (células hospedadoras del fago lisadas tras la replicación y encapsulación de las partículas virales) (figura 9) y al cálculo del título viral (tabla VI).

En la figura 9 se muestran las placas de lisis observadas en las células hospedadoras tras la replicación y encapsulación de las partículas virales recuperadas de las muestras recogidas.



**Figura 9.** Placas de lisis observadas en los controles positivo ( $A2(10^5)0^+$ ) y negativo ( $A2(C^-)$ ), y en la muestra, con el equipo de purificación en funcionamiento, ( $A2(10^5)0$ ) recogidos mediante impactador en medio sólido inmediatamente después de la desconexión de los nebulizadores.



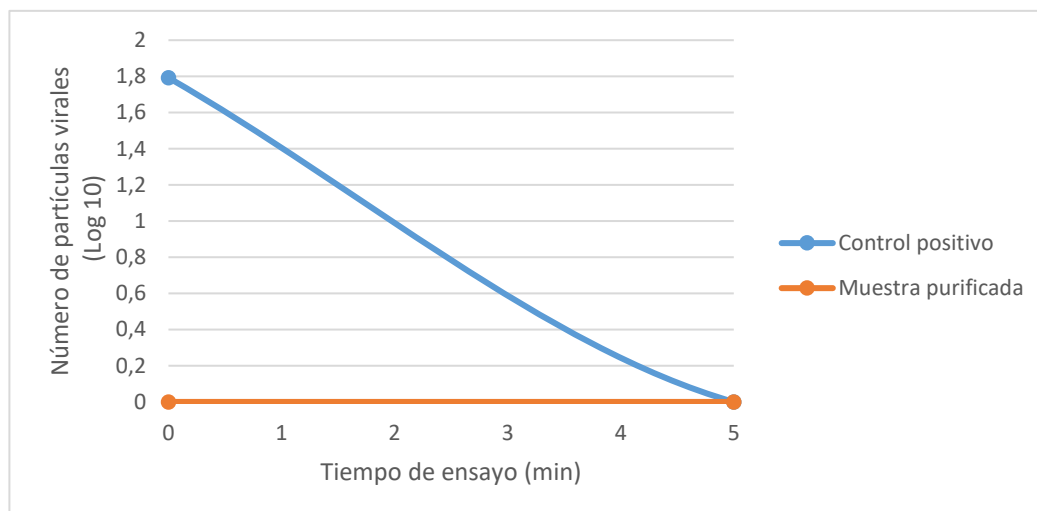
**Tabla VI:** Título viral de los bacteriófagos recuperados de las muestras de aire recogidas por impactación sobre medio sólido.

| Muestra (alias)                     | ufp | Pr  | Título viral (ufp/100 L) | Valor medio           |
|-------------------------------------|-----|-----|--------------------------|-----------------------|
| 1C-                                 | 0   |     |                          | 0                     |
| 2C-                                 | 0   |     |                          |                       |
| A1C-                                | 0   |     |                          | 0                     |
| B1C-                                | 0   |     |                          |                       |
| A2C-                                | 0   |     |                          |                       |
| B2C-                                | 0   |     |                          | 6,2 x 10 <sup>1</sup> |
| A1(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | 46  | 49  | 4,9 x 10 <sup>1</sup>    |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | 142 | 170 | 1,7 x 10 <sup>2</sup>    |                       |
| A2(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | 15  | 15  | 1,5 x 10 <sup>1</sup>    |                       |
| B2(10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup>  | 12  | 12  | 1,2 x 10 <sup>1</sup>    | 1 x 10 <sup>0</sup>   |
| A1(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | 2   | 2   | 2 x 10 <sup>0</sup>      |                       |
| A1(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B2(10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup>  | 2   | 2   | 2 x 10 <sup>0</sup>      | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A2(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B2(10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A2(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B2(10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> | 0   | 0   | 0                        | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )0               | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )0               | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A2(10 <sup>5</sup> )0               | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B2(10 <sup>5</sup> )0               | 0   | 0   | 0                        | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )5               | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )5               | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A1(10 <sup>5</sup> )5               | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )5               | 0   | 0   | 0                        | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )10              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )10              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A2(10 <sup>5</sup> )10              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B2(10 <sup>5</sup> )10              | 0   | 0   | 0                        | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )15              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )15              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A1(10 <sup>5</sup> )15              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )15              | 0   | 0   | 0                        | 0                     |
| A1(10 <sup>5</sup> )20              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B1(10 <sup>5</sup> )20              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| A2(10 <sup>5</sup> )20              | 0   | 0   | 0                        |                       |
| B2(10 <sup>5</sup> )20              | 0   | 0   | 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

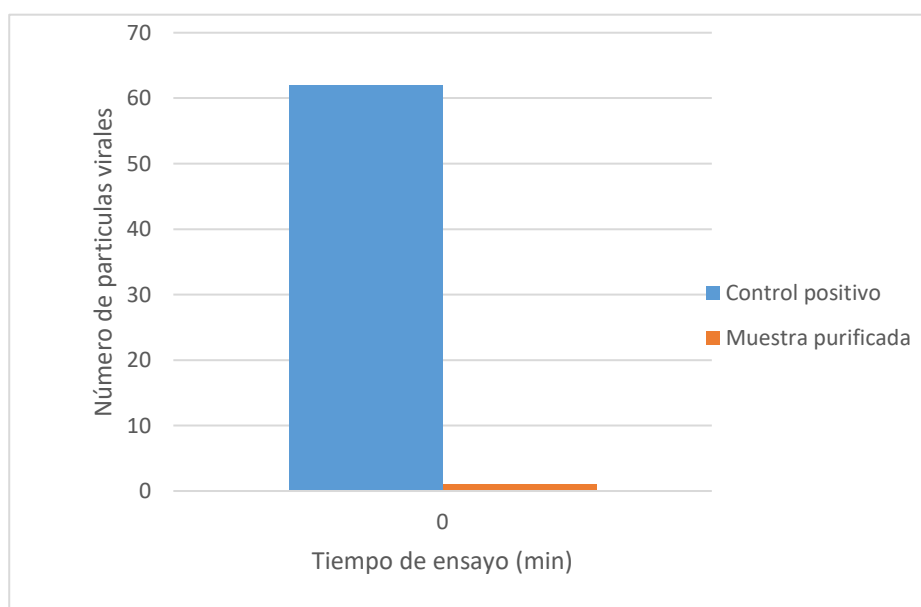


Se realizó una representación gráfica en la que se comparó el título viral (tabla VI) del control positivo y del bioaerosol sometido a purificación (figuras 10 y 11).



**Figura 10.** Comparativa del título viral (Log10) en ausencia (control positivo) y presencia del equipo de purificación (tiempo 5 minutos).

En la gráfica se observa que, después de desconectar el sistema de nebulización, hay una disminución del título viral en función del tiempo, aunque no se aplique el sistema de purificación (control positivo). Las partículas virales asociadas a moléculas de agua forman aglomerados de diferentes tamaños, cayendo aquellos que tienen mayor peso. Con el equipo de purificación en funcionamiento, inmediatamente después de desconectar el sistema de nebulización, el número de partículas decae drásticamente no detectándose virus en el aire (muestra purificada).



**Figura 11.** Comparativa del título viral en ausencia (control positivo) y presencia del equipo de purificación a tiempo cero.



En la gráfica se observa que, a tiempo cero, después de desconectar el sistema de nebulización, cuando el equipo de purificación está en funcionamiento, el número de partículas virales en el aire es 60 veces menor que en ausencia del sistema de purificación.

#### 7.4. Evaluación de la reducción de la infectividad utilizando el equipo de ionización

La reducción de la infectividad del bacteriófago se expresaría como la diferencia de los logaritmos del título viral de los bacteriófagos recogidos por impactación en medio sólido antes y después del tratamiento con el equipo de purificación, aplicando la ecuación 2 (tabla VII).

$$\log R = \log N - \log N' \quad (\text{ecuación 2})$$

Siendo:

**N:** Título viral de las muestras sin tratamiento (control positivo)

**N':** Título viral de las muestras tratadas con equipo de purificación

**Tabla VII:** Cálculo de la reducción de la infectividad expresada como log R

| Muestra (alias)                       | Ensayo           | Título viral          | log R  |
|---------------------------------------|------------------|-----------------------|--------|
| (10 <sup>5</sup> )0 <sup>+</sup> (N)  | Control positivo | 6,2 x 10 <sup>1</sup> | ≥ 1,79 |
| (10 <sup>5</sup> )0 (N')              | Descontaminación | 0                     |        |
| (10 <sup>5</sup> )5 <sup>+</sup> (N)  | Control positivo | 1 x 10 <sup>0</sup>   | -      |
| (10 <sup>5</sup> )5 (N')              | Descontaminación | 0                     |        |
| (10 <sup>5</sup> )10 <sup>+</sup> (N) | Control positivo | 0                     | -      |
| (10 <sup>5</sup> )10 (N')             | Descontaminación | 0                     |        |
| (10 <sup>5</sup> )15 <sup>+</sup> (N) | Control positivo | 0                     | -      |
| (10 <sup>5</sup> )15 (N')             | Descontaminación | 0                     |        |
| (10 <sup>5</sup> )20 <sup>+</sup> (N) | Control positivo | 0                     | -      |
| (10 <sup>5</sup> )20 (N')             | Descontaminación | 0                     |        |

Cuando el número de unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/mL) es cero, en las muestras sometidas a purificación, el valor del Log R está condicionado por la concentración de los controles utilizados como referencia y se indicará con el símbolo mayor o igual (≥).

Los resultados obtenidos en las condiciones ensayadas muestran que:

- Con el equipo de purificación en funcionamiento, la infectividad del bacteriófago MS2 en las muestras recogidas por impactación sobre medio sólido, se reduce en al menos 1,79 órdenes de magnitud. Esto supone una reducción de la infectividad en el aerosol de al menos un 98,38%\*.

#### 8. Declaración de conformidad (cuando proceda)

No aplica.

#### 9. Resumen, opiniones, interpretaciones

De los resultados obtenidos se puede deducir que:

- ✓ Con el equipo de purificación en funcionamiento, el número máximo de partículas totales que se alcanza en el bioaerosol es menor que en el control positivo (aproximadamente 0,5 órdenes de magnitud lo supone una reducción de un 70%).

*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*



- ✓ Después de 20 minutos, desde la desconexión de los nebulizadores, el número de partículas totales en presencia del purificador de aire está por debajo del número de partículas basales cuantificado al inicio del ensayo. Lo que supone una reducción de al menos un 96,2% del número de partículas totales en la muestra purificada respecto al control positivo.
- ✓ Con el equipo de purificación en funcionamiento, se puede observar que el título del bacteriófago es 60 veces menor, lo que supone una reducción de al menos 98,38% de la carga vírica en el aerosol.

En consecuencia, se puede concluir que el equipo de purificación es eficaz, en las condiciones testadas, para la disminución de la carga vírica en aire.



## 10. Anexos

### 10.1. Anexo 3. 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](http://www.atcc.org).
- ASTM-1053:97. Actividad viricida 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).
- Junho H., Sang-Gu L. and Jungho H. Application of corona discharge-generated air ions for filtration of aerosolized virus and inactivation of filtered virus. Journal of Aerosol Science. 2017, 107:31-40.
- Laura S. and Jan Manchak, Microbiology (1998), 144: 2579-2587.
- Log and percent reduction in microbiology and antimicrobial testing <https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing>
- 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.
- Rong Li, Long Cui, Meijuan Chen and Yu Huang. Nanomaterials for Airborne Virus Inactivation: A Short Review. Aerosol Science and Engineering 2021, 5:1–11 (2021).
- Schuit., Ratnesar-Shumate S., Yolitz J., Williams G., Weaver W., Green B., Miller D., Krause M., Beck K., Wood S., Holland B., Bohannon J., Freeburger D., Hooper I., Biryukov J., Altamura Louis A., Wahl V., Hevey M and Dabisch P. Airborne SARS-CoV-2 Is Rapidly Inactivated by Simulated Sunlight. The Journal of Infectious Diseases 2020, 222 (4): 564–571. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa334>.
- 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. Journal of Aerosol Science.
- Zhang R., Wang L., Wu Y., Guan Z. and Jia Z. Bacterial Decontamination of Water by Bipolar Pulsed Discharge in a Gas–Liquid–Solid Three-Phase Discharge Reactor. IEEE Transactions on Plasma Science. 2006, 34:1370-1374.