

14 Octubre 2009

Att: Joe Urso- Aerus – Electrolux / EcoQuest International  
De: James Marsden , Ph D.  
Asunto: Desactivación del Virus de la Influenza **AH1N1** utilizando la técnica de la Ionización Catalítica Radiante.

### INFORME PROVISIONAL DE PROGRESO

Esto es un informe provisional del progreso sobre la evaluación del sistema de RCI para desactivar el virus de la Gripe A **H1N1** sobre las superficies de nuestro entorno. Una investigación adicional está prevista para evaluar completamente el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS), producidas por el sistema RCI sobre el Virus de la Gripe A **H1N1** en condiciones controladas de laboratorio.

Los resultados de este estudio son preliminares y no deben ser utilizados para posicionar el sistema RCI como un dispositivo médico.

Mi recomendación sería que Aerus Corporation se reúna con oficiales de la FDA para orientarse sobre futuras investigaciones y como ofrecer la tecnología de RCI a los consumidores.

La gripe A (**N1H1**) es un nuevo virus de la influenza de origen porcino, que causo la primera enfermedad en Méjico y Estados Unidos en Marzo y Abril 2009. Es un virus respiratorio agudo, grave y altamente contagioso, muy similar a la gripe común pero que afecta a grupo de personas más jóvenes. Existe menos inmunidad para ésta gripe que la que existe para una gripe común. La gravedad del Virus de la Gripe A (**N1H1**) en seres humanos puede variar de leve a grave. Este virus se propaga de la misma manera que una gripe común: tos, estornudos, o al tocar superficies contaminadas para luego tocarse la boca, ojos, nariz. Este nuevo Virus de la Gripe A H1N1 produce una amplia gama de síntomas gripales como fiebre, tos, dolor de garganta, dolor corporal,

escalofríos y cansancio. Además se han notificado casos de personas que sienten náuseas, vómitos y o diarrea. El virus puede seguir vivo sobre superficies, manos y cuerpo como mínimo durante 2 horas.

El primer paciente con este virus se confirmó, mediante pruebas realizadas en los laboratorios del CDC el día 15 de Abril 2009. El segundo fue confirmado el 17 de Abril 2009. Se determinó que el virus se propagaba con rapidez mediante el contacto humano. El día 22 de Abril la CDC activó su centro de Operaciones de Emergencias para poder coordinar y responder mejor al público. EL 26 de Abril el Gobierno de los Estados Unidos declaró una emergencia de salud pública.

Para el 19 de Junio 2009, todos los 50 estados en Estados Unidos, el Distrito de Colombia, Puerto Rico y las Islas Vírgenes han informado de la infección del Virus N1H1. Mientras que el sistema nacional de estudio del Virus indican que está bajando en el país en estos momentos, nuevos brotes del virus van a más en distintas partes de Estados Unidos, y en algunos casos con actividad intensa.

### **Experimento Preliminar – Inactivación del Virus de la Gripe A H1N1 sobre superficies inoculadas de aluminio.**

El Virus de la Gripe A H1N1 (TTCC#VR-33) fue evaluado en este estudio. Los procedimientos para mantener el cultivo del virus y para enumerar el virus antes y después del tratamiento fueron obtenidos del Dr. Rick Falkenberg – FSPT.

*The virus culture was maintained on ATCC complete growth medium and minimum essential medium (ATCC, Manassas, VA., USA) with 2  $\mu$ M L-glutamine and Earle's BSS adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1  $\mu$ M non-essential amino acids, and 1.0  $\mu$ M sodium pyruvate, 90%; fetal bovine serum, 10% and cultured in Trypticase Soy Agar with added; sodium bicarbonate, non-essential amino acids, and combination of sodium pyruvate and fetal bovine serum, in aerobic growth conditions at 37.0°C and Influenza A at 33-35° C.1 Cells from both of the above (approx.  $1 \times 10^7$  CFU/ml) from a 24 hour static culture incubated at 37.0°C and Influenza A at 33-35°C were used to inoculate various 5 cm x 3 cm stainless steel coupons. The inoculum suspensions were enumerated by surface plating in duplicate samples on TSA after serial dilution in 0.1% peptone solution. The plates were incubated for 24 hour at 37.0°C.*

En un principio se utilizó, una gota de 100  $\mu$ l de cada una de las bacterias/virus, para inocular las superficies externas de 6.3 cm x 1.8 sobre cupones de acero inoxidable. El resultado del nivel de inoculación final fue aproximadamente de 7.0-log CFU/5 g por muestra. Las muestras inoculadas fueron secadas al aire durante 1 hora a 22 grados antes de utilizar el tratamiento de RCI. Esta hora de secado permite que las células inoculadas se adhieran a la superficie y minimizan el crecimiento de éstas durante el secado. Se utilizaron 4 cupones de acero inoxidable para cada tiempo de muestra.

Se equipó una cámara de contención biológica con una célula RCI, obtenida de EcoQuest International, durante 2 horas antes de colocar 12 cupones inoculados dentro de la cámara. El efecto del tratamiento de RCI se midió durante 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas. Se llevó a cabo otro

estudio en la misma cámara sin el tratamiento RCI. La temperatura, la humedad relativa, los niveles de ozono ambiental y los niveles de peróxido de hidrogeno fueron controlados en la cámara.

Después del tratamiento, cada uno de los cupones de 5 cm x 3cm fueron transferidos a una bolsa Stomacher (Fisher Scientific Inc, PA, USA) combinado con 50 mil de solución peptona estéril y se batieron con mezcla fácil Stomacher AES (AES Laboratories, Princeton, NJ, USA) durante 2 minutos a velocidad normal. El líquido de lavar fue diluido, seguido por el recuento de las placas de superficie. Un método de centrifugado (Mossel y otros 1991) fue modificado e utilizado para concentrar las poblaciones de bacteria y virus en el líquido de lavar para que menos de 250 CFU/ml de bacteria podía ser enumerada sobre placas de superficies.

RESULTADOS Y DISCUSIONES.

Tabla 1.- Recuperación media del Virus de la Gripe A H1N1 sobre superficies inoculadas de acero inoxidable tratados e utilizando la tecnología RCI durante periodos de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas.

Medidas	<i>Influenza A H1N1</i> tratada con una célula RCI™	<i>Influenza A H1N1</i> Control
Tiempo – 0	6.8	6.9
1 Hora	4.1	6.7
2 Horas	3.4	6.4
4 Horas	1.2	6.1
6 Horas	ISD*	5.5
8 Horas	ISD	5.7
12 Horas	ISD	5.7
24 Horas	ISD	5.7

\*IND : Inferior al nivel de detección

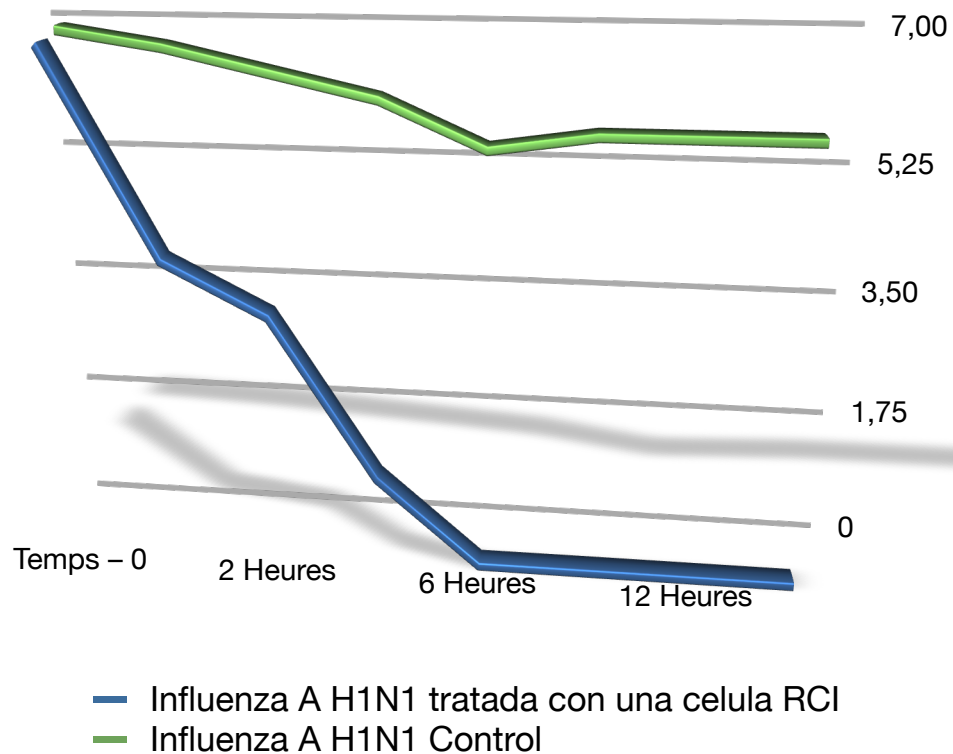


Tabla 1: Resume los resultados del estudio preliminar. El estudio demostró la efectividad de las especies reactivas de oxígeno producidas por la célula RCI en la desactivación del Virus de la Gripe A – H1N1. Después de 6 horas de tratamiento los niveles del virus H1N1 sobre cupones inoculados de acero inoxidable estaban por debajo del límite detectable. No se vio recuperación alguna a las 8, 12 y 24 horas. El nivel de ozono ambiental en la cámara estaba entre 0.02 – 0.04 PPM. Niveles de Hidrógeno de Peróxido vaporizado estaba entre 0.06 -0.09 PPM. La humedad relativa estaba entre 45 – 57% y la temperatura de 70-73 grados F.

Basado en los resultados del estudio preliminar, parece que las especies reactivas de oxígeno producidas por la Célula RCI son efectivas para desactivar el Virus de la Gripe A H1N1 sobre superficies inoculadas de acero inoxidable bajo las condiciones de esta prueba. Se recomienda pruebas adicionales para evaluar otros brotes del virus bajo otras condiciones ambientales, distintas superficies y parámetros aplicados.