



Firewall<sup>®</sup>  
SARS-CoV-2  
Testrapport

# Reductie van SARS-CoV-2 door het Waterlogic Firewall® water- zuiveringsstelsel

Kelly R. Bright, Ph.D.

Associate Research Professor

Charles P. Gerba Professor

The Water & Energy Sustainable Technology  
(WEST) Center

Universiteit van Arizona

6 november 2020



**Bedrijf:** Waterlogic Firewall®  
waterzuiveringsstelsel van  
Waterlogic

**Testorganisme:** SARS-CoV-2,  
USA-WA1/2020-isolaat (BEI  
Resources NR-52281)

**Testmedium:**  
ontchloord kraanwater

**Testomstandigheden:**  
uitgevoerd bij kamertemperatuur  
(22,3 °C)

# Experimenteel ontwerpmethode

Twee afzonderlijke Waterlogic Firewall<sup>®</sup> waterzuiveringsdispensers werden in verschillende tests beoordeeld op hun vermogen om SARS-CoV-2 in kraanwater onschadelijk te maken.

1. 1 liter steriel gedemineraliseerd water in het reservoir van het toestel geplaatst. Toestel aangesloten op het stopcontact en ingeschakeld, vervolgens 0,75 liter water getapt met het toestel. Het opgevangen water werd afgevoerd en het reservoir werd geleegd. Deze stap werd uitgevoerd om het toestel voor te bereiden (alle lucht uit het systeem te verwijderen) en het interne reservoir te vullen (dat een inhoud heeft van 0,39 liter).
2. 1 ml virusmateriaal met een gehalte van ongeveer  $1,0 \times 10^8$  TCID50 SARS-CoV-2, USA-WA1/2020-isolaat (BEI Resources NR-52281) toegevoegd aan 1 liter steriel, gedemineraliseerd kraanwater en grondig gemengd.
3. De volledige liter in het toestelreservoir geplaatst.
4. Drie monsters van 30 ml uit het reservoir verzameld in steriele conische tubes (instromende monsters A, B, & C).
5. 0,5 liter afgetapt in een afvalemmer (om het interne reservoir van 0,39 liter te spoelen om te verzekeren dat water met virus werd verdeeld voor de test).
6. Drie uitstromende monsters van 30 ml elk, verdeeld in steriele conische tubes van 50 ml (uitstromende monsters A, B, & C).

7. Binnenkant van het mondstuk van de tapkraan geïnoculeerd met een steriel polyester wattenstokje, dat werd gedrenkt in virusmateriaal met een gehalte van  $6,3 \times 10^6$  TCID50/ml SARS-CoV-2. Binnenkant van de tuit van het tappunt bestreken. Hierbij werd het wattenstokje zo ver als mogelijk geïntroduceerd en werd het met een draaiende beweging heen en weer bewogen. (De kop van de Firewall-behuizing is zo ontworpen en vormgegeven dat enig uv-licht het water uit de tapkraan volgt. Op een afstand van 1,27 cm buiten het tapmondstuk werd de dosis uv-licht gemeten als zijnde 12 uW-Sec/cm<sup>2</sup>).
8. Een volume van 10 ml water uit de dispenser getapt (om het tapmondstuk te kunnen blootstellen aan uv-licht).
9. Een steriel polyester wattenstokje in een afsluitbare tube van 5 ml met daarin 1 ml steriele fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) gedipt, en gebruikt om de binnenkant van het tapmondstuk te bestrijken. Het wattenstokje weer in de tube geplaatst en het uitstekende houtgedeelte afgebroken zodat het wattenstokje in de tube zou passen.
10. Deze tube gedurende 30 seconden laten rondwervelen om het virus uit het wattenstokje te wassen en vervolgens het wattenstokje op steriele wijze verwijderd en afgevoerd (deze oplossing was het 'tapmondstuk'-monster).

## Verzamelde en geanalyseerde monsters:

Toestel #1 - Instromend A	Toestel #2 - Instromend A
Instromend B	Instromend B
Instromend C	Instromend C
Uitstromend A	Uitstromend A
Uitstromend B	Uitstromend B
Uitstromend C	Uitstromend C
Tapmondstuk	Tapmondstuk

**11.** Virusconcentraties voor elk geneutraliseerd monster werden gemeten met behulp van de Reed-Muench-methode (Payment en Trudel 1993) ter bepaling van de infectieuze dosis die 50% van de celculturen in de plaatjes (Wells) aantastte (TCID50). De analyse werd uitgevoerd in celcultuurplaten met 96 plaatjes met monolayers van Vero E-6-cellen (ATCC# CRL-1586). Voorafgaand aan de analyse werden de Vero E-6-cellen tweemaal voorzichtig gespoeld met minimaal essentieel medium (MEM). De platen met 96 plaatjes werden vervolgens geïnoculeerd met de verdunde monsters 6 plaatjes geïnoculeerd met 100 microliter elk per verdunning). Ook werden cultuurflessen met monsters van 1 ml (in flessen van 25 cm<sup>2</sup>) en 10 ml (in flessen van 75 cm<sup>2</sup>) inbegrepen om de detectielimiet van het onderzoek te verlagen. De platen/cultuurflessen werden gedurende 1 uur bij 37 °C geïncubeerd in een atmosfeer van 5% CO<sub>2</sub> om de virusdeeltjes te laten adsorberen met de cellen.

**Opmerking:** elke plaat met 96 plaatjes plaatjes omvatte ook 6 negatieve controleplaatjes met enkel cellen (geen virus), met 100 microliter MEM toegevoegd.

**12.** Na deze incubatieperiode werd 85 microliter MEM met 2% runderfoetusserum (FBS) toegevoegd aan elk van de 96 plaatjes, 7 ml werd toegevoegd aan de cultuurflessen van 25 cm<sup>2</sup> en 20 ml werd toegevoegd aan de cultuurflessen van 75 cm<sup>2</sup>. De platen/cultuurflessen werden gedurende 7 dagen bij 37 °C geïncubeerd in een atmosfeer van 5% CO<sub>2</sub>.

**13.** De cellen werden dagelijks geobserveerd op virale cytopathische effecten (CPE) met behulp van een omkeermicroscop. De geïnoculeerde cellen werden vergeleken met de negatieve controlecellen van dezelfde plaat met 96 plaatjes om de CPE te kunnen differentiëren van niet-geïnoculeerde cellen. Negatieve controleflessen werden ook opgenomen in het onderzoek. Elk CPE dat binnen 24 uur na incubatie werd geobserveerd werd geacht te zijn veroorzaakt door cytotoxiciteit (veroorzaakt door gevoeligheid van de cellen voor het kraanwater), vermits CPE veroorzaakt door SARS-CoV-2 typisch ≥ 2 dagen vergen. Plaatjes die na 2 dagen CPE-positief waren, werden beschouwd als zijnde positief voor virale groei.

**Opmerking:** in geen enkele van de negatieve controlecellen werd een CPE geobserveerd.

**14.** Na de incubatieperiode werd de TCID50/monster bepaald. Zes plaatjes per verdunning werden gebruikt om een voldoende precisie van het onderzoek te verzekeren. De grootste verdunning waarin 50% of meer van de plaatjes positief was, werd gebruikt voor het bepalen van de virus TCID50/teststrookje, volgens de methode beschreven door Payment en Trudel (1993).

**15.** De gegevens werden aan de hand van de formule  $-\log_{10}$  (Neff/Ninf) geformuleerd als de logaritmische afname, waarbij Ninf de gemiddelde concentratie van het teruggevonden SARS-CoV-2 van de instromende monsters is en Neff de concentratie van het teruggevonden SARS-CoV-2 in de uitstromende monsters.

**16.** Een t-toets werd gebruikt om de het virus dat werd gerecupereerd in de instromende monsters (geen uv) en het virus dat werd gerecupereerd in de uitstromende monsters (behandeld met uv) statistisch te vergelijken. De afnames werden beschouwd als zijnde statistisch significant indien de resulterende P-waarde ≤ 0,05 was.

**17.** Het gemiddelde percentage afname werd ook berekend. De relatie tussen de  $\log_{10}$ -reductie en de procentuele afname is weergegeven in tabel 1 hieronder.

**Tabel 1.** Log<sub>10</sub>-reductie versus procentuele reductie.

Log <sub>10</sub> -reductie	Procentuele reductie (%)
1	90
2	99
3	99,9
4	99,99
5	99,999
6	99,9999

# Referenties

Payment P, Trudel M. (1993) Isolatie en identificatie van virussen. In Methods and Techniques in Virology. Payment P, Trudel M (eds.), pp. 32–33. New York: Marcel Dekker Inc.

# Resultaten

De resultaten van de tests worden hieronder weergegeven in de tabellen 2 en 3.

**Tabel 2.** Reductie van SARS-CoV-2 door de Waterlogic Firewall®-waterdispenser.

Toestel	Log <sub>10</sub> -reductie* per uitstromend monster	Gem. log <sub>10</sub> reductie ± SD	Gem. procentuele reductie
<b>Unit 1</b>	> 5,67 > 5,67 > 5,67	>5,67† ± 0,00	>99,99979
<b>Unit 2</b>	> 5,89 > 5,89 > 5,89	>5,89† ± 0,00	>99,99987

\* Het gemiddelde van de drie instromende monsters bedroeg 1,86×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml en 3,10×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml voor unit #1 en unit #2, respectievelijk. De log<sub>10</sub>-reducties in de uitstromende monsters werden berekend met behulp van deze waarden.

SD standaard deviatie

† De reducties in de behandelde monsters waren statistisch significant (P ≤ 0,05) in vergelijking met de instromende monsters (geen uv-behandeling).

**Tabel 3.** Reductie van SARS-CoV-2 op het tapmondstuk van de Waterlogic Firewall®-waterdispenser.

Toestel	Geschatte log <sub>10</sub> -reductie*	Procentuele reductie
<b>Unit 1</b>	3,20 tot 3,70	99,94 tot 99,98
<b>Unit 2</b>	> 3,20 tot > 3,70	> 99,94 tot > 99,98

\* Een geschatte 100 microliter van het inoculatievirusmateriaal met een gehalte van 6,3×10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> werd overgedragen van het wattenstokje naar het tapmondstuk. Gebaseerd op een geschatte recuperatie-efficiëntie van 10% (1,0 log<sub>10</sub>-verlies) tot 31,6% (0,5 log<sub>10</sub>-verlies) van SARS-CoV-2 van het mondstuk, gebruik makend van een wattenstokje gedrenkt in PBS, een geschat gehalte van 6,3×10<sup>4</sup> tot 2,0×10<sup>5</sup> virus zou worden gerecupereerd zonder enige uv-blootstelling. De log<sub>10</sub>- en procentuele reducties in de mondstukmonsters werden berekend aan de hand van deze geschatte waardebereiken.



## Discussie

Er werden bij geen enkele van de uitstromende watermonsters infectieuze SARS-CoV-2 deeltjes gerecupereerd na de behandeling door een van beide geteste Waterlogic Firewall®-waterdispensers.

De virusconcentratie lag zodoende in alle uitstromende monsters onder de detectielimiet van het onderzoek ( $3,98 \times 10^{-1}$  TCID<sub>50</sub>/ml). Dit was equivalent aan een  $\log_{10}$ -reductie van  $>5,67$  voor de test met unit #1, en een  $\log_{10}$ -reductie van  $>5,89$  voor de test met unit #2. Deze reducties waren statistisch significant in vergelijking met de instromende monsters ( $P = 1,4 \times 10^{-5}$  en  $1,9 \times 10^{-7}$ , respectievelijk).

Bovendien resulteerde de geschatte  $12 \text{ uW-sec/cm}^2$  uv-dosis ter hoogte van het Waterlogic Firewall™-tapmondstuk in een reductie van infectieus SARS-CoV-2-virus dat op het mondstuk zelf werd geïnoculeerd. Deze test werd uitgevoerd om een ziek persoon te simuleren die hoest of niest in de onmiddellijke omgeving van het toestel. Geschatte  $\log_{10}$ -reducties van 3,20 tot  $>3,70$  werden geobserveerd op het mondstuk; een deel van het virus op de mondstukken kan echter weggespoeld zijn bij de 10 ml-monsters die werden afgevoerd als deel van het monsternameproces.

## Better thinking, better water, beter for you, better for the planet™

Bij Waterlogic begint alles bij onze visie op water. Achter elke druppel Waterlogic-water schuilen jaren van kennis, innovatie en ervaring, gericht op het afleveren van zuiver, lekker drinkwater in het kader van een duurzame strategie.

Aangezien we onze eigen waterkoelers ontwerpen, produceren, verdelen, installeren en onderhouden, profiteert u van een ongeëvenaard kwaliteitsproduct én een brede waaier aan consumables en accessoires. Onze Total Care-dienstverlening is onberispelijk en speelt meteen op al uw behoeften in.

Neem vandaag nog contact met ons op voor meer informatie over Waterlogic en ontdek welke oplossing het best bij u past.

Bel +31 (0)88 165 3000 (NL)  
+32 (0) 2 556 37 97 (BE)

Mail [info@waterlogic.nl](mailto:info@waterlogic.nl)  
[info@waterlogic.be](mailto:info@waterlogic.be)

Bezoek onze website  
[www.waterlogic.nl](http://www.waterlogic.nl)  
[www.waterlogic.be](http://www.waterlogic.be)

