



Risultati dei tests  
del sistema Firewall™  
su SARS-CoV-2

# Riduzione di SARS-CoV-2 realizzata dal sistema di purificazione Waterlogic Firewall™

Kelly R. Bright, Ph.D.  
Associate Research Professor

Charles P. Gerba Professor

The Water & Energy Sustainable Technology (WEST) Center

The University of Arizona

6 Novembre, 2020

**Azienda:** sistema di purificazione Waterlogic Firewall™ di Waterlogic

**Organismo testato:** SARS-CoV-2, Isolato USA-WA1/2020 (BEI Resources NR-52281)

**Matrice Test:**

Acqua di rubinetto privata del cloro

**Condizioni del test:**

Condotto a temperatura ambiente (22.3°C)



# Struttura dell'esperimento

Due unità di purificazione Waterlogic Firewall™ sono state testate, per verificare la loro capacità di inattivare il SARS-CoV-2 nell'acqua del rubinetto, in due tests separati.

1. 1 litro di acqua sterile, de-ionizzata, è stata inserita nel serbatoio dell'unità. L'unità è stata accesa e sono stati erogati 0.75 litri. L'acqua erogata è stata scartata e il serbatoio è quindi stato svuotato. Questa fase è servita a preparare il dispositivo (rimuovendo tutta l'aria nel sistema) e a riempire il serbatoio interno (la sua capacità è di 0.39 litri).
2. 1 ml di materia virale contenente approssimativamente  $1.0 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub> SARS-CoV-2, Isolato USA-WA 1/2020 (BEI Resources NR-52281) è stato aggiunto in una bottiglia da 1 litro di acqua di rubinetto sterile, de-clorinata; il tutto è stato mescolato meticolosamente.
3. L'intero contenuto della bottiglia è stato inserito nel serbatoio dell'unità.
4. 3 campioni da 30 ml sono stati prelevati dal serbatoio con provette coniche sterili (campioni riferimento A, B, & C).
5. 0.5 litri sono stati erogati dall'unità e gettati (servivano solo per far uscire gli 0.39 litri presenti nel serbatoio interno e quindi assicurarsi che l'acqua successivamente erogata per il test contenesse il virus).
6. Sono quindi stati erogati 3 campioni d'acqua, ciascuno da 30 ml, in provette coniche sterili da 50 ml (campioni uscita A, B, & C).

7. Un tampone di poliestere, immerso precedentemente in una sostanza virale contenente  $6.3 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub>/ml SARS-CoV-2, è quindi stato strofinato all'interno della bocca di erogazione dell'unità. L'azione è consistita nell'inserire il tampone il più possibile all'interno e nel muoverlo avanti ed indietro (la parte terminale del sistema Firewall è progettata in modo che la luce UV possa raggiungere l'acqua anche quando questa sta uscendo dal rubinetto. A ½ pollice di distanza dall'uscita dell'acqua, l'intensità della luce UV è 12 uW-Sec/cm<sup>2</sup>).
8. Sono quindi stati erogati 10 ml d'acqua dall'unità (in modo da consentire l'esposizione dell'ugello alla luce UV).
9. È stato successivamente intinto un tampone di poliestere sterile in una provetta da 5 ml, contenente 1 ml di PBS sterile; si è quindi passato il tampone all'interno dell'ugello di erogazione. A questo punto si è riposto il tampone nella provetta, rompendo l'impugnatura di legno in modo che il resto del tampone potesse entrare interamente nella provetta.
10. La provetta è stata scossa per 30 secondi per far sì che il virus si staccasse dal tampone, dopodiché il tampone è stato rimosso asepticamente (questa soluzione è detta campione "Ugello").

## Campioni raccolti e analizzati:

Unità #1 -	Riferimento A	Unità #2 -	Riferimento A
	Riferimento B		Riferimento B
	Riferimento C		Riferimento C
	Uscita A		Uscita A
	Uscita B		Uscita B
	Uscita C		Uscita C
	Ugello		Ugello

**11.** La concentrazione di virus in ogni campione è stata quantificata usando il metodo Reed-Muench (Payment and Trudel 1993) per determinare la dose infettiva della coltura tissutale che ha interessato il 50% delle piastre (TCID<sub>50</sub>). Il test è stato eseguito su 96 piastre di coltura cellulare contenenti monostrati cellulari Vero E-6 (ATCC # CRL-1586). Prima del test, le cellule Vero E-6 sono state risciacquate delicatamente due volte con un mezzo essenziale minimo (MEM). Le 96 piastre sono state quindi inoculate con i campioni diluiti (6 pozzetti inoculati con 100 microlitri ciascuno per diluizione). Sono state incluse anche dosi da 1 ml (in matracci da 25 cm<sup>2</sup>) e da 10 ml (in matracci da 75 cm<sup>2</sup>) per ridurre il limite di misurazione del test.

Le piastre sono state incubate in un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 1 ora a 37 °C, per consentire alle particelle del virus di adsorbirsi alle cellule.

**Nota:** Ciascuna delle 96 piastre includeva anche almeno 6 pozzetti di controllo negativo contenenti solo cellule (nessun virus) con l'aggiunta di 100 microlitri di MEM.

**12.** Dopo questo periodo di incubazione, 85 microlitri di MEM contenente il 2% di siero bovino fetale (FBS) sono stati aggiunti a ciascuno delle 96 piastre, 7 ml sono stati aggiunti ai matracci da 25 cm<sup>2</sup> e 20 ml sono stati aggiunti ai matracci da 75 cm<sup>2</sup>. Le piastre e i matracci sono state quindi incubati in un'atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 7 giorni a 37 °C.

**13.** Le cellule sono state osservate quotidianamente per gli effetti citopatici virali (CPE) utilizzando un microscopio invertito. Le cellule inoculate sono state confrontate con le cellule di controllo negativo su ciascuna delle 96 piastre, per differenziare CPE dalle cellule non inoculate. Nel dosaggio sono state incluse anche le dosi di controllo negativo. Qualsiasi CPE osservato entro 24 ore dall'incubazione è stato considerato causato da citotossicità (causata dalla sensibilità delle cellule all'acqua del rubinetto) poiché CPE causato da SARS-CoV-2 richiede tipicamente ≥ 2 giorni. I pozzetti positivi per CPE dopo 2 giorni sono stati considerati positivi per la crescita virale.

**Nota:** Nessun CPE è stato osservato nelle dosi di controllo negativo.

**14.** Dopo il periodo di incubazione, è stato determinato il TCID<sub>50</sub> / campione. Sono stati utilizzati sei pozzetti per diluizione per garantire un'adeguata precisione del dosaggio. La diluizione massima in cui il 50% o più dei pozzetti era positivo è stata utilizzata per determinare il TCID<sub>50</sub> / coupon del virus, seguendo il metodo descritto da Payment e Trudel (93).

**15.** I dati sono stati riportati come riduzione logaritmica utilizzando la formula  $-\log_{10}(\text{Neff} / \text{Ninf})$ , dove Ninf era la concentrazione media del SARS-CoV-2 recuperato dai campioni riferimento e Neff era la concentrazione del SARS-CoV-2 recuperato nei campioni contaminati.

**16.** È stato utilizzato un test t di Student per confrontare statisticamente il virus recuperato dal riferimento (senza UV) e dai campioni di contaminato (trattati con UV). Le riduzioni sono state considerate statisticamente significative se il valore P risultante era ≤ 0,05.

**17.** È stata calcolata anche la riduzione percentuale media. La relazione tra riduzione  $\log_{10}$  e riduzione percentuale è illustrata nella Tabella 1 di seguito.

**Tabella 1.** Log<sub>10</sub> rimozione rispetto alla percentuale di riduzione

Log <sub>10</sub> Rimozione	Percent Riduzione (%)
1	90
2	99
3	99.9
4	99.99
5	99.999
6	99.9999

# Riferimenti

Payment P, Trudel M. (1993) Isolation and identification of viruses. In Methods and Techniques in Virology. Payment P, Trudel M (eds.), pp. 32-33. New York: Marcel Dekker Inc.

# Risultati

I risultati di tests sono illustrati nelle tabelle 2 e 3.

**Tabella 2.** Riduzione del SARS-CoV-2 da parte del sistema di purificazione dell'acqua Waterlogic Firewall™

Unità	Log <sub>10</sub> Riduzione* Per campione contaminato	Media Log <sub>10</sub> Riduzione ± DS	Media Riduzione Percentuale
	> 5.67		
<b>Unità 1</b>	> 5.67	>5.67 <sup>†</sup> ± 0.00	>99.99979
	> 5.67		
	> 5.89		
<b>Unità 2</b>	> 5.89	>5.89 <sup>†</sup> ± 0.00	>99.99987
	> 5.89		

\* La media dei tre campioni riferimento era  $1,86 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> / ml e  $3,10 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> / ml rispettivamente per l'unità n. 1 e per l'unità n. 2. Le riduzioni log<sub>10</sub> nei campioni contaminati sono state calcolate utilizzando questi valori. Deviazione standard SD

<sup>†</sup> Le riduzioni nei campioni trattati erano statisticamente significative ( $P \leq 0,05$ ) rispetto ai campioni riferimento (nessun trattamento UV).

**Tabella 3.** Riduzione del SARS-CoV-2 sull'ugello di erogazione del sistema di purificazione dell'acqua Waterlogic Firewall™.

Unità	Stima Log <sub>10</sub> Riduzione*	Riduzione Percentuale
<b>Unità 1</b>	3.20 a 3.70	99.94 a 99.98
<b>Unità 2</b>	> 3.20 a > 3.70	> 99.94 a > 99.98

\* Circa 100 microlitri dello stock di virus dell'inoculo contenente  $6,3 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> sono stati trasferiti dal tampone all'ugello del dispensatore. Sulla base di un'efficienza di recupero stimata dal 10% (perdita 1,0 log<sub>10</sub>) al 31,6% (perdita 0,5 log<sub>10</sub>) di SARS-CoV-2 dall'ugello utilizzando un tampone imbevuto di PBS, da  $6,3 \times 10^4$  a  $2,0 \times 10^5$  virus sarebbero stati riscontrati senza alcuna esposizione ai raggi UV. Il log<sub>10</sub> e le riduzioni percentuali nei campioni sull'ugello sono stati calcolati utilizzando questi intervalli di valori stimati.



## Sommario

Nessuna particella infetta da SARS -CoV -2 è stata riscontrata in nessuno dei campioni di acqua in uscita dai due erogatori testati, dotati del sistema di purificazione dell'acqua Waterlogic Firewall™

La concentrazione del virus era quindi al di sotto del limite di rilevamento del test ( $3,98 \times 10^{-1}$  TCID<sub>50</sub> / ml) in tutti i campioni in uscita. Ciò equivale a una riduzione  $> 5,67 \log_{10}$  per il test con l'unità n. 1 e a una riduzione  $> 5,89 \log_{10}$  con l'unità n. 2. Queste riduzioni sono statisticamente significative rispetto ai campioni di riferimento ( $P=1,4 \times 10^{-5}$  e  $1,9 \times 10^{-7}$ , rispettivamente).

Inoltre, la dose di UV approssimativa di  $12 \text{ uW-Sec / cm}^2$  all'ugello del rubinetto Waterlogic Firewall™ ha comportato una riduzione del SARS -CoV -2 infettivo inoculato sull'ugello stesso. Questo test è stato eseguito per simulare un individuo malato che tossisce o starnutisce in prossimità del dispositivo. Si sono osservate riduzioni stimate da  $3,20$  a  $3,70 \log_{10}$  sull'ugello; tuttavia, una parte del virus sugli ugelli potrebbe essere stata lavata via nei campioni da  $10 \text{ ml}$  che sono stati scartati come parte del processo di raccolta dei campioni.

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

In Waterlogic, tutto inizia con il modo in cui pensiamo all'acqua. Dietro ogni goccia d'acqua Waterlogic ci sono anni di conoscenza, innovazione ed esperienza per fornire acqua purificata e dal sapore eccezionale nel modo più sicuro e sostenibile.

Call + 353 1 293 1960

Email [exportsales@waterlogic.com](mailto:exportsales@waterlogic.com)

Visit [www.waterlogic.com](http://www.waterlogic.com)

