



Innehållsförteckning finns hos ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Starkt alkaliskt elektrolyserat vatten inaktiverar effektivt SARS-CoV-2, andra virus och gramnegativa bakterier



Youichi Suzuki^{a,*,1}, Takayuki Hishiki^{b,1}, Akino Emi^a, Shoichi Sakaguchi^a, Ronko Itamura^c, Rain Yamamoto^d, Tamio Matsuzawa^e, Kunitada Shimotohno^f, Masashi Mizokami^f, Takashi Nakano^a, Naoki Yamamoto^{f,**}

^a Department of Microbiology and Infection Control, Faculty of Medicine, Osaka Medical and Pharmaceutical University, Takatsuki, Japan

^b Department of Microbiology, Kanagawa Prefectural Institute of Public Health, Chigasaki, Japan

^c Department of Human and Engineered Environmental Studies, Graduate School of Frontier Sciences, University of Tokyo, Tokyo, Japan

^d Intelligence for Medical and Nutritional Research, Tokyo, Japan

^e E-PLAN Co. Ltd., Funabashi, Japan

^f Genome Medical Sciences Project, National Center for Global Health and Medicine, Ichikawa, Japan

ARTIKEL INFO

Om artikeln:

Mottagen 24 juli 2021

Mottagen i reviderad form

12 augusti 2021

Godkänd 19 augusti 2021

Tillgänglig online 23 augusti 2021

Nyckelord:

SAIW

Desinfektion

Klorfri

Höljeförsedda virus och nakna virus

Gramnegativa bakterier

Global mål för hållbar utveckling

(SDG:er)

ABSTRACT

Luften och ytorna på föremål i en patogenkontaminerad miljö kan i många fall vara en källa till smitta för människor. Desinfektion har blivit en vanlig åtgärd som innebär att man fokuserar på att reducera kontamineringsnivån. I denna studie undersökte vi effekten av SAIW, ett unikt elektrolyserat klorfritt vatten med högt pH-värde, hög koncentration av upplöst vätska och låg syrereduktionspotential, med avseende på inaktivering av flera virus och bakterier. Infektionsanalyser visade att initiala virusmängder av höljeförsedda virus och nakna virus, däribland SARS-CoV-2, influensa A-virus, herpes simplex-virus typ 1, humant coronavirus, felint calicivirus (FCV) och hundens parvovirus, minskade med 2,9- till 5,5-log₁₀ inom 30 sekunder efter exponering för SAIW. På motsvarande sätt minskade odlingsbarheten för tre gramnegativa bakterier (*Escherichia coli*, *Salmonella*, och *Legionella*) med 1,9- till 4,9-log₁₀ efter 30 sekunders SAIW-behandling. Mekaniskt visade sig behandlingen med SAIW väsentligen minska SARS-CoV-2:s förmåga att binda till och därefter tränga in i vero-celler. Till sist kunde vi visa att detta klorfria elektrolyserade joniserade vatten inte gav upphov till någon akut inhalationstoxicitet hos möss, vilket innebär att SAIW är lovande för en säkrare antiviral och antibakteriell desinficerande behandling.

© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Inledning

Virus och bakterier är vanliga orsaker till smittsamma sjukdomar i inomhusmiljöer, t.ex. sjukhus, skolor, bostäder och allmänna transportmedel [1] och har därför enormt stor påverkan på människors hälsa. Exempelvis virus svarar idag för cirka 60 % av alla infektioner hos människan, och de vanligaste sjukdomarna orsakas av RS-virus och gastrointestinala virus [2,3]. SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2), ett nytt betacoronavirus, har gett upphov till ekonomiskt och socialt kaos världen över [4]. Covid-19, som orsakas av SARS-

CoV-2, har visat sig vara förknippat med allvarliga symtom, bland annat andnödssyndrom, vaskulit, trombos, stroke, myokardiell reperfusionsskada och flerorgansvikt, inklusive akut njursvikt [5,6]. Många människor drabbas även av andra RS-virus, bland annat influensavirus under den kalla årstiden. Sådana virus kan orsaka olika andningsproblem, allt från lindrig övre luftvägsinfektion till akut lunginflammation, som potentiellt kan leda till att patienten dör [4]. Humant coronavirus OC43 (HCoV-OC43) orsakar övre luftvägsinfektion i näsan och halsen [7]. Dessutom orsakar herpes simplexvirus typ 1 (HSV-1) oral herpesinfektion, framförallt genom kontakt med HSV-1 som förekommer runt munhålan eller i sår, saliv och på huden [8]. Höljeförsedda virus är lättare att inaktivera med isopropylalkohol eller organiskt lösningsmedel än enterovirus, såsom norovirus och parvovirus, som saknar hölje (nakna virus) [9,10].

* Korresponderande författare. (Y. Suzuki).

** Korresponderande författare. (N. Yamamoto).

E-postadresser: californiacircle@gmail.com (Y. Suzuki), lb-2oyamamoto@hospk.ncgm.go.jp (N. Yamamoto).

¹ Bidragit i lika hög grad.

Gramnegativa bakterier består också av kliniskt viktiga patogener [11]. Vissa stammar av *Escherichia coli* (*E. coli*) orsakar infektioner i magtarmkanalen, urinvägarna och andra kroppsdelar. *E. coli*-infektioner uppstår i tarmarna vid intag av kontaminerad föda, kontakt med infekterade djur eller nedsväljning av kontaminerat vatten i bassänger, och ger upphov till diarré och buksmärtor, ibland med kraftiga blödningar. *Legionella* spp., bakterier som förekommer i naturliga miljöer och dess värd amöban, växer i miljöer med utrustning för konstgjord vattencirkulation, såsom fontäner, där *Legionellabakterier* förekommer i stora mängder. *Salmonellabakterier* lever i tarmarna hos människor, nötkreatur, grisar, kycklingar och annan boskap men även i naturen (vattendrag och avlopp). Därmed är kött – nötkött, fläskkött, kyckling och fisk – också källor till kontamination med dessa gramnegativa bakterier.

Antibiotika, antivirala medel och vacciner har ingen effekt på flera respiratoriska patogener och tarmpatogener. Spridning av sådana patogener kan stoppas med desinfektionsmedel – något som länge har använts som en mycket effektiv metod att skydda känsliga människor från infektionssjukdomar i offentliga miljöer, i synnerhet på sjukhus och vårdhem [12]. U.S. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) rekommenderar klor (natriumhypoklorit) som desinfektionsmedel för smittskydd (<https://www.cdc.gov/vhf/ebola/clinicians/non-us-healthcare-settings/chlorine-use.html>).

Klor är emellertid frätande, har en stickande lukt och kan i vissa fall vara olämpligt för användning på lång sikt på grund att det kan innebära hälsorisker. I denna studie utvärderade vi SAIW (Super Alkaline Ionized Water) som ett nytt desinfektionsmedel för inaktivering av olika höljevirus och nakna virus samt gramnegativa bakterier. SAIW är ett alkaliskt elektrolyserat vatten utan klorbaserade kemikalier. I detta sammanhang är det viktigt att SAIW innehåller endast en minimal mängd kaliumhydroxid (KOH) och att det är lätt att genom spädning omvandla det till vanligt vatten eller saltvatten. SAIW är vidare färglöst och transparent och icke frätande, vilket pekar på dess potential som ett miljövänligt desinfektionsmedel. Som förväntat visade sig SAIW ha starkt antiviral och antibakteriell effekt med extremt kort kontakttid. Mekaniskt dämpade SAIW-behandlingen SARS-CoV-2:s förmåga att binda till och tränga in i målceller. Dessutom visades *in vivo* att SAIW är säkert att använda på djur och människor.

2. Material och metoder

2.1. Framställning av SAIW

SAIW framställdes genom att kranvatten renades med användning av ett membran för omvänd osmos, som tar bort orenheter, och elektrolyserades i närvaro av livsmedelsklassad kaliumhydroxid som elektrolyt och ett katjonbytarmembran i en elektrolyskammare som separerar anod och katod. Under denna process utvanns SAIW från katoden. I denna studie tillfördes en mindre mängd råvatten till elektrolytcellens katodkammare än mängden råvatten, och kraftigt elektrolytiskt joniserat vatten med ett pH-värde som var högre än referens-pH-värdet kunde framställas (JP2014/069980).

2.2. Celler och virus

Alla cellkulturer förvarades vid en temperatur på 37 °C i närvaro av 5 % CO₂. Vero E6/TMPRSS2 och MRC-celler (fibroblaster från människofoster, ATCC CCL-171) bevarades med DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) kompletterat med 10 % fetalt bovint serum (FBS). Cellinjerna MDCK (NBL-2, celler från hundnjure, Health Science Research Resources Bank JCRB 9029), HEP-2

(larynxcancerprover från människa, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.), och CRFK (Crandell-Reese kattnjure, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.) och CRFK (Crandell-Reese kattnjure, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd) odlades med användning av Eagle's minimum essential medium (MEM) kompletterat med 10 % FBS. I vissa experiment där hundens parvovirus (CPV) användes bevarades CRFK-cellen med DMEM innehållande 10 % FBS.

Två kliniska isolat av SARS-CoV-2 (19e865 [GenBank Accession No. LC546038.1] och OMC-510 [GenBank Accession No. LC633518]) erhöles från covid-19-patienter och amplifierades med Vero E6/TMPRSS2-celler. Förökningen av influensa A-virus (H1N1 A/PR/8/34 [ATCC VR-1469]) och HSV-1 (KOS [ATCC

VR-1493]) skedde med användning av MDCK respektive HEP-2-celler. HCoV-OC43 (ATCC VR-759) förökades i MRC och virusets smittsamhet titrerades med plackanalys. Felint calicivirus (FCV F-9 [ATCC VR-782]) och CPV (förvarat vid Kitasato Research Center for Environmental Sciences, Japan) förökades med hjälp av CRFK-celler.

Virusens smittsamhet fastställdes på konventionellt sätt, antingen via plackanalys (för SARS-CoV-2) eller analys av 50 % infektiös dos i vävnadsodling (TCID₅₀) med användning av Reed-Muench-metoden (för influensavirus, HSV-1, HCoV-OC43, FCV och CPV) med lämpliga celler.

2.3. Antivirala analyser

Ett prov av SARS-CoV-2 (19e865) behandlades med en tiofaldig volym SAIW eller steriliserat vatten. Efter 30 sek. eller 2 minuters inkubation spädades blandningen 10 gånger med DMEM innehållande 10 % FBS, och den spädda lösningen inokulerades i VeroE6/TMPRSS2-celler odlade i en 96-brunnsplatta med en densitet på 5 × 10⁴/brunn. Efter 2 timmars inokulation tvättades cellerna i en fosfatbuffrad koksaltlösning (PBS) och odlades med DMEM innehållande 10 % FBS. För att mäta replikationen av SARS-CoV-2 extraherades virus-RNA från odlings supernatanten 48 tim. efter inokulation och genomgick omvänd kvantitativ PCR-analys (RT-qPCR) med användning av primer/probe-set specifika för den nukleokapsida regionen av det aktuella SARS-CoV-2-genomet [13].

Behandlingen av andra virus med SAIW gjordes genom att SAIW (eller steriliserat vatten) blandades med virusprover i förhållandet 10:1 (undantaget HCoV-OC43 och CPV) under 30 sek till 5 min vid rumstemperatur. Efter inkubation spädades blandningen 10-faldigt med ett odlingsmedium (med undantag för CPV) för att neutralisera reaktionen, och inokulerades in i respektive odlingsceller för att fastställa mängden virus med användning av TCID₅₀-analys.

Liksom för HCoV-OC43 blandades 30 µl av en seriell spädning av virusprovet med DMEM innehållande 0,2 % FBS med 30 µl SAIW. Efter inkubation tillsattes 180 µl SCDLP-medium för att neutralisera reaktionen och 100 µl av blandningen tillsattes till MRC5-celler i en 96-brunnsplatta. En timme efter exponering tvättades cellerna med PBS och odlades med DMEM kompletterat med 0,2 % FBS. Celldöd orsakad av HCoV-OC43-infektion analyserades 96 tim. efter infektion genom att cellerna fixerades med metanol och senare färgades med metylenblått.

Den antivirala analysen av CPV utfördes genom att 100 µl av virusprovet blandades med 900 µl SAIW. Efter inkubation spädades blandningen 10-faldigt med en 200 mM fosfatbuffert, pH 7, för att neutralisera reaktionen. Den seriella spädningen av blandningen utfördes med PBS, och 50 µl av spädningen inokulerades i CRFK-celler med DMEM innehållande 5 % FBS. Virusmängden fastställdes vara TCID₅₀ enligt den virala hemagglutinationsaktiviteten hos odlings supernatanter sju dagar efter infektion.

2.4. Plackreduktionsanalys

Tjugofem mikroliter SARS-CoV-2 (OMC-510) innehållande $2,5 \times 10^5$ PFU-virus inkuberades med 225 μ l SAIW (eller steriliserat vatten) under 30 sek. till 5 min. i rumstemperatur DMEM kompletterat med 10 % FBS. Därefter utsattes 200 μ l av en 10-faldig seriell spädning av blandningen för plackanalys.

2.5. Bindnings- och inträdesanalys

Tjugofem mikroliter SARS-CoV-2 innehållande $1,25 \times 10^6$ PFU-virus inkuberades med 225 μ l SAIW (eller steriliserat vatten) under 2 min. i rumstemperatur och tillsattes sedan till Vero E6/TMPRSS2-celldkulturen (odlad i en 6-brunnsplatta vid en densitet på 5×10^5 /brunn en dag före analysen) med 2 ml DMEM under 2 tim. på is (bindning) eller vid 37 °C (inträde). Efter exponering, tvättades cellerna tre gånger med kyld PBS för att avlägsna obundna eller icke-internaliserade virus. Sedan extraherades totalt RNA, och cell-associerat SARS-CoV-2-RNA kunde observeras via RT-qPCR.

2.6. Antibakteriell aktivitet

Efter behandling med 100 μ l lösning innehållande *E. coli* (NBRC 3972) eller *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*, GIFU 9134) med 10 ml SAIW vid 20 °C under 30 sek. till 15 min, kunde antalet viabla celler bestämmas som kolonibildande enheter (CFU)/ml. För mätningen av levande bakterier användes en odlingsmetod på flat utstrykplatta (35 °C, sju dagar) med användning av ett B-CYE α -agarmedium (EIKEN). Det bekräftades på förhand att antalet viabla celler kunde mätas utan att påverkas av provet genom att testlösningen späddes 10-falt med mediumet.

För *Salmonella Centricas* underart *arizonae* (*S. arizonae*, ATCC 13314), tillsattes 100 μ l av bakterielösningen till 10 ml SAIW, och blandningen behandlades vid 20 °C under 30 sek. till 15 min. Sedan fick 1 ml av respektive blandning passera genom ett membranfilter (0,45 μ m i diameter) och tvättades därefter med sterilt renat vatten. Detta filterpapper placerades i nära kontakt med agarnäringsmediet och odlades vid 35 °C under två dagar, och antalet viabla celler per ml mättes som CFU/ml. Samma procedur utfördes med användning av 150 ppm natriumhypoklorit som positiv kontroll.

2.7. Akut inhalationstoxicitet

Tio ICR-möss (fem hanar och fem honor) exponerades över hela kroppen för en utspädd SAIW-lösning i en 0,5 m³ (H120 x D60 x W70 cm) stor experimentbehållare enligt den metod som utvecklats av Yamashita et al. [14]. Mössen fick bo i burar tillverkade av metallnät placerade i mitten av behållaren. Exponeringen genomfördes med användning av en ultraljudsbefuktare inställd på stark effekt enligt följande: 1) fuktig luft sprutades tre gånger under 20 sek., vid varje tillfälle med 10 min. intervall, 2) 30 min. uppehåll, 3) ytterligare 20 sek. besprutning i tre gånger med 10 minutersintervaller och 4) 10 min. senare, 20 sek. besprutning fyra gånger med 5 min. intervall. Efter exponeringen observerades mössens allmäntillstånd och hur många som dog eller överlevde under 14 dagar, samtidigt som man uppmätte kroppsvikt och födointag. Sedan gjordes obduktioner för makroskopisk observation av olika organ och histopatologiska undersökningar av lungorna. Denna studie genomfördes korrekt i enlighet med Animal Care and Use Code of the Drug Safety Testing Center, Yoshimi, Saitama, Japan.

2.8. Lapptest

De 22 försökspersonerna var alla vuxna japaner (17 kvinnor och 5 män, i åldern 20-60 år när de samtyckte till att medverka i testet).

Den metod som användes var ett 24-timmars slutet lapptest med en observationsperiod på tre dagar [15]. Hudprovtejp preparerades med en lämplig mängd testlösning (cirka 0,03 ml) och fästes på försökspersonens rygg. 24 tim. senare togs ett foto med en digitalkamera varefter en läkare utvärderade huden enligt gällande kriterier (1 och 24 timmar efter borttagning).

En saltlösning och vitt vaselin användes som kontroll.

Denna studie genomfördes i enlighet med de etiska principerna i Helsingforsdeklarationen och godkändes av etiska kommittén hos SOUKEN Co Ltd (Tokyo, Japan). Skriftligt informerat samtycke erhöles från alla frivilliga innan testerna. De frivilliga fick på förhand tydlig information att det stod dem fritt att delta i studien men om de inte ville medverka skulle det inte på något sätt ge några negativa följdverkningar. Innan testet kontrollerades de frivilligas hälsostatus och att de inte hade någon historik med tung medicinering eller hudsjukdomar.

3. Resultat

3.1. Egenskaper hos ett nytt elektrolyserat vatten, SAIW

SAIW framställt i denna studie (under namnet e-WASH) var ett elektrolyserat alkaliskt vatten med hög koncentration av upplöst vätska, och dess beståndsdelar var 99,83 % vatten och 0,17 % KOH. Omedelbart efter framställningen innehöll SAIW inget fritt klor (under detektionsgränsen), och dess syrereducerande potential, koncentrationen av upplöst vätska och pH-värden var 700 till 900 mV, 423 ppb, respektive 12,5 (cirka ± 3 %). SAIW:s genomsnittliga pH-värde låg kvar på nästan samma nivå under 180 dagar och längre i förslutet skick, och 48 dagar eller längre vid frisläppning/utan förslutning??.

3.2. Inaktivering av SARS-CoV-2 med SAIW

Först undersöktes effekten av behandling med SAIW på SARS-CoV-2:s smittsamhet. När Vero E6/TMPRSS2-celler inokulerades med SARS-CoV-2 som hade behandlats med en 10-faldig volym SAIW under 2 min, hade nivån av viralt RNA i cellkultursupernatanten 48 timmar efter infektion minskat med 5-log₁₀ jämfört med virusprover behandlade med steriliserat vatten (kontroll) (Fig. 1A). Eftersom exponeringen med SAIW förmodades inaktivera sammansättningen av viruspartikelns yta, gjordes därefter en plackreduktionsanalys av det SAIW-behandlade viruset. Fig. 1B visar att även efter 30 sekunders behandling kunde inga plack bildad av SARS-CoV-2-infektion observeras, medan många plack erhöles efter förbehandling med steriliserat vatten.

Vi utvärderade också virusbindnings- och inträdesstegens effektivitet [16]. Vero E6/TMPRSS2-celler utsattes för SAIW- och kontrollbehandlat SARS-CoV-2 på is (bindningsanalys) eller vid 37 °C (inträdesanalys) under 2 tim. och efter tvättning med kyld PBS påvisades cellassocierat virus-RNA med RT-qPCR. Resultatet visade att, jämfört med kontrollen, hade SAIW-behandlingen markant minskat de virusbindande och efterföljande inträdesprocessernas effektivitet (Fig. 1C). Sammantagna indikerar dessa data att SAIW-behandlingen begränsade SARS-CoV-2:s smittsamhet, sannolikt genom att viruset nästan helt förlorade förmågan att binda till celler.

3.3. Antivirala aktiviteter mot andra höljevirus och nakna virus

Man testade också effekterna av SAIW på inaktivering av tre höljevirus (influenza A virus, HSV-1 och HCoV-OC43) och två nakna virus (FCV and CPV). Som framgår av Tabell 1, minskade SAIW smittsamheten hos influensa A-virus, HSV-1, HCoV-OC43, FCV och CPV med 5,5-, 3,5-, 4,5-, 4,5- respektive 2,9-log₁₀ PFU/ml eller TCID₅₀/ml efter 30 sek. behandling med SAIW.

3.4 Antibakteriella aktiviteter

De antibakteriella effekterna av SAIW undersöktes genom odling av bakterier på mjukagar.

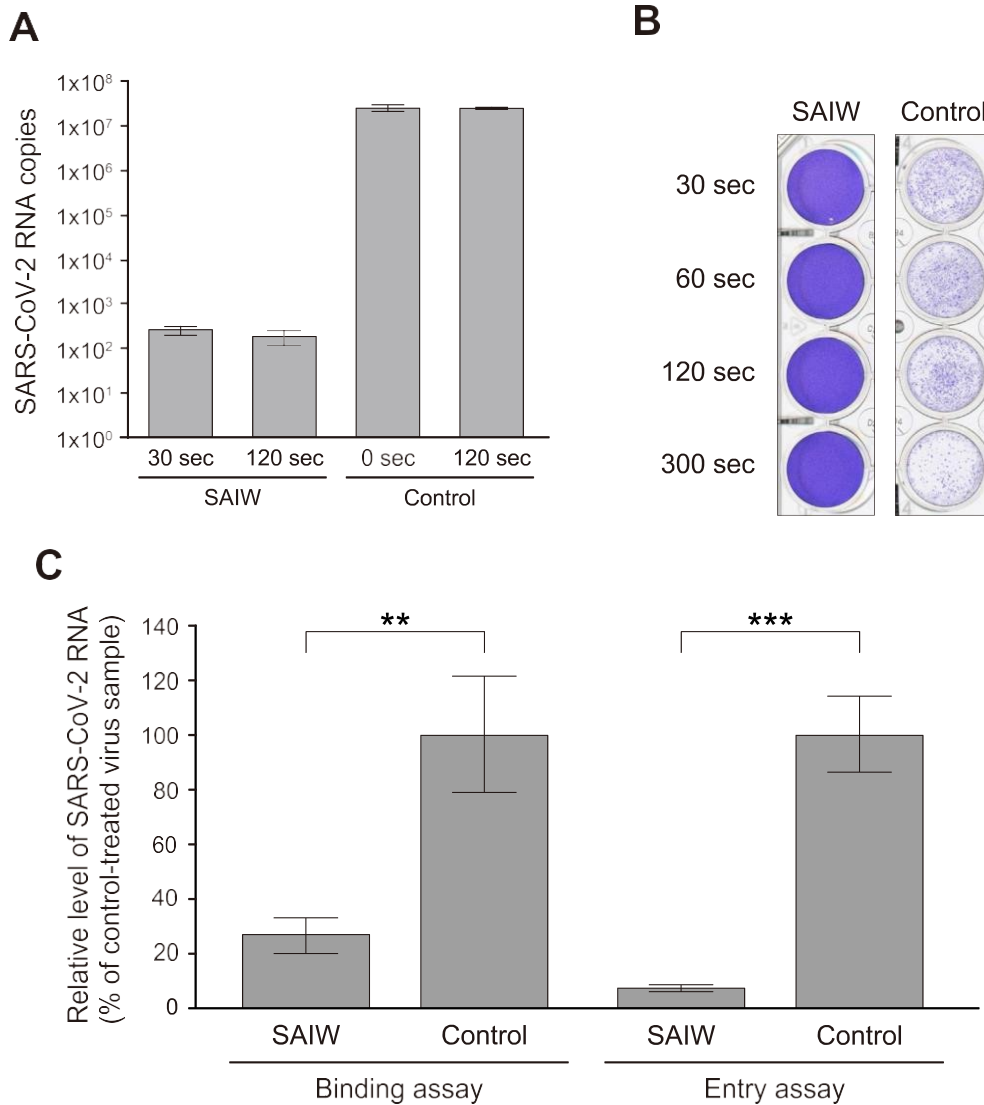


Fig. 1. Inaktivering av SARS-CoV-2:s smittsamhet med SAIW. (A) Replikationsanalys. SARS-CoV-2 exponerades för en 10-faldig volym SAIW eller steriliserat vatten (kontroll) under 30 sek. till 2 min. och tillsattes till Vero E6/TMPRSS2-celler. Replikationen av SARS-CoV-2 utvärderades genom mätning av nivån av virus-RNA med RT-qPCR-analys med användning av primer/probe-set specifika för virusgenomets nukleokapsidregion. (B) Plackreduktionsanalys. SARS-CoV-2 behandlades med SAIW eller steriliserat vatten (kontroll) under 30 sek. till 5 min (300 sek.) och genomgick en plackanalys med användning av Vero E6/TMPRSS2-celler. Representativa bilder av plackbildning två dagar efter exponeringen visas. (C) Analys av bindning och inträde. SARS-CoV-2 blandades med SAIW eller steriliserat vatten (kontroll) i förhållandet 1:9 under 2 min och tillsattes till Vero E6/TMPRSS2-celler i is (bindningsanalys) eller vid 37 °C (inträdesanalys). Efter 2 tim. tvättades de med kylt PBS tre gånger och efter tvättningen isolerades totalt RNA. Cell-associerat SARS-CoV-2-RNA påvisades med RT-qPCR-analys. De genomsnittliga värdena från tre oberoende experiment visas med felstaplar som anger standardavvikelser. Statistisk signifikans kunde bestämmas genom T-testet JMP Pro software (SAS Institute): **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$. P -värden lägre än 0,05 ansågs vara signifikanta.

Tabell 1

SAIW:s hämmande effekt på smittsamheten hos olika höljevirus och nakna virus^a.

Virus	Behandling	Exponeringstid (sekunder)						
		0	30	120	180	300		
Höljevirus	Influenzavirus typ H1N1 A/PR/8/34	Kontroll	1 × 10 ⁷	e ^b	1 × 10 ⁷⁻³	e	e	
	SAIW	E	<32 ^c	<32	e	e		
	Herpes simplexvirus typ 1 (HSV-1) KOS	Kontroll	1 × 10 ⁵	e	1 × 10 ⁵⁻⁸	e	E	
	SAIW	E	<32 ^c	<32	e	E		
Humant coronavirus (HCoV) OC43	Kontroll	1 × 10 ⁶	e	E	e	E		
	SAIW	E	<32 ^c	<32	e	E		
	Nakna virus	Felint calicivirus (FCV) F9	Kontroll	1 × 10 ⁶	e	E	e	1 × 10 ⁵⁻⁷
	SAIW	E	<32 ^c	E	e	<32		
Hundens parvovirus (CPV)	Kontroll	6.3 × 10 ⁴	e	E	6.2 × 10 ⁴	E		
	SAIW	E	72	<63 ^c	e	E		

^a Virusittrar fastställdes med TCID₅₀/ml.

^b Ej testat.

^c Under detektionsgränsen.

Tabell 2

SAIW:s hämmande effekt på gramnegativa bakteriers viabilitet ^a.

Bakterie	Behandling	Tid för exponering (sekunder)			
		0	30	300	900
<i>Escherichia coli</i>	Control	8,6 × 10 ⁵	e ^b	e	1,1 × 10 ⁶
	SAIW	E	<10 ^c	<10	<10
<i>Salmonella arizonae</i>	Control	7,6 × 10 ²	E	e	E
	SAIW	E	<10 ^c	<10	<10
<i>Legionella pneumophila</i>	Control	1,4 × 10 ⁷	E	e	2,0 × 10 ⁷
	SAIW	E	5,9 × 10 ⁴	<100 ^c	<100

^a Viabla bakterieceller fastställdes som CFU/ml.^b Ej testat.^c Under detektionsgränsen.

Tre gramnegativa bakteriestammar exponerades för SAIW i 30 sek. vilket resulterade i 4,9-, 1,9- och 2,4-log₁₀ reduktion i suspensioner av *E. coli*, *S. arizonae* respektive *L. pneumophila* (Tabell 2).

3.5 Akut inhalationstoxicitet för SAIW hos möss

När vi undersökte akut inhalationstoxicitet hos SAIW på ICR-möss, 5 hanar och 5 honor, kunde vi inte konstatera några abnormiteter eller dödsfall. När det gällde kroppsvikt kunde vi konstatera en minskning hos fyra av fem hanar (0,2, 0,4, 0,5, och 0,8 g), medan en av de fem honorna minskade i vikt (0,4 g) 1 dag efter exponering. Den genomsnittliga minskningen uppgick till 0,25 g, med ett intervall på 0,2-0,8 g. Dessa möss visade emellertid även viktökningar 2 eller 3 dagar efter exponering. Den genomsnittliga ökningen under 14 dagar var 6,58 g för hanar och 4,86 g för honor, och de visade samma tendenser som kontrollmössen. Efter 14 dagar fanns ingen viktskillnad jämfört med de oexponerade mössen. Under den tid studien pågick var födointaget 4,2-5,4 g/handjur/dag, och 3,8-4,4 g/hondjur/dag, samma som för kontrollmössen. Inget onormalt kunde konstateras vid obduktion och inga förändringar kunde konstateras hos vare sig hanar eller honor vid den histopatologiska undersökningen.

3.6 Lapptester på människor

Frivilliga män och kvinnor i åldersspannet 20-60 år fick genomgå ett slutet lapptest där de kontinuerligt tillfördes SAIW under kontrollerade former i 24 timmar. Hudirritationsindex konstaterades vara noll för samtliga frivilliga deltagare.

4 Diskussion

I denna studie visade vi att SAIW, ett unikt elektrolyserat vatten, var ett säkert desinfektionsmedel mot höljevirus, nakna virus och gramnegativa bakterier. Hittills har främst den antibakteriella effekten av surt elektrolyserat vatten studerats. I flera fall har studierna varit fokuserade på verkningarna av FAC (tillgängligt fritt klor) i elektrolyserat vatten [17,18]. Nyligen rapporterades att ett neutralt elektrolyserat vatten (pH 7) reducerade RNA-kopior av humant norovirus med 4,8-log₁₀ efter suspension under 1 min. i närvaro av 250 ppm FAC [19]. Dessutom påvisade Bui et al. en starkt virusdödande effekt på mul- och klövsjukavirus vid användning av alkaliskt elektrolyserat vatten (pH 12,1) innehållande 1,0 ppm FAC, vilket indikerar att effekten är oberoende av klornivån i lösningen [20]. En av de särskiljande egenskaperna hos SAIW är att detta elektrolyserade vatten inte innehåller några klorbaserade kemikalier. Dessutom är SAIW färglös, luktfritt, transparent och icke-frätande. Det kan enkelt omvandlas till vatten eller saltvatten genom spädning, vilket gör SAIW är extremt miljövänligt. Dessutom är SAIW ett kemiskt stabilt vatten under lång tid (flera månader eller längre). SAIW-generatorer är kommersiellt tillgängliga och har fördelen att de

enkelt kan användas för att framställa färskt elektrolytiskt vatten på plats genom användning av kranvatten och kaliumkarbonat, och kan därigenom bidra till att förebygga katastrofer i nödsituationer. Med hänsyn till dess säkerhetsprofil *in vivo*, som presenteras i denna studie, förväntas SAIW komma till användning, inte bara som en blötlägnings- och rengöringslösning utan också som desinfektionsmedel på ställen där det inte är tillåtet att använda alkohol.

Det är intressant att undersöka hur SAIW inaktiverar virus och bakterier. Mekanismen för denaturering av viruspartiklarna genom att ändra pH-värdet har studerats ingående med användning av tobaksmosaikvirus (TMV) [21]. En undersökning med elektronmikroskop visade att TMV-partiklarna var likformiga vid ett pH-värde på 6,8, medan låga koncentrationer av vätejoner inte gav upphov till någon aggregation, utan snarare till att de stavformade viruspartiklarna bröts av, vilket reducerade homogeniteten hos TMV-partiklarna [22]. Viktigt är att både smittsamheten och antigeniciteten upphörde helt vid pH-värdet 12,4, då strukturen hos virusstavnarna förstördes och producerade små globformade fällningar [22]. I en liknande studie där man använde nakna poliovirus rapporterades att behandlingen av viruspartiklar vid ett pH-värde på 10,0 frigjorde spårkomponenter rika på kapsidprotein VP4 från virusets kapsid och den återstående kapsidstrukturen visade samma H-antigenicitet som den intakta, fast det var tomma kapsider utan viralt RNA. Vid ett pH-värde på 12,0 bröts den ned till mindre beståndsdelar som inte visade någon H-antigenicitet [23]. Dessa resultat indikerar att den grundläggande strukturen och antigeniciteten hos viruspartiklar försämrades signifikant av den alkaliska behandlingen. I vår studie hämmade starkt alkaliskt SAIW (pH 12,5) smittsamheten hos alla testade virus (Fig. 1A och Tabell 1) och visades inaktivera SARS-CoV-2 bindning till målcellerna (Fig. 1C). På samma sätt hämmades tillväxten av tre gramnegativa bakterier totalt genom behandling med SAIW (Tabell 2). Eftersom virala och bakteriella infektionshändelser är känsliga och sådan biologisk aktivitet utövas effektivt vid fysiologiskt pH-värde, är det sannolikt att den dödliga biologiska förändringen av patogenen sker innan proteinkomponenterna denatureras. Slutsatsen är att SAIW utgör ett lovande alternativ för effektiv och säker desinficering. Eftersom SAIW består av vatten och en försurbar mängd KOH, bildar det inte klor, ger inte upphov till skarpa lukter och det utgör ingen risk eller skapar behov av första hjälpen. Dessutom bör SAIW inte vara beroende av geografiska förhållanden eftersom det kan framställas överallt där det finns tillgång till elektricitet. SAIW är ett miljövänligt och hållbart desinfektionsmedel som uppfyller kraven för att nå SDGs mål eftersom det är utspätt med vatten och pH-värdet blir neutralt och återgår till att vara naturligt vatten. Därför kommer vår framtida forskning att ägnas åt att validera huruvida SAIW kan fungera som ett nytt desinfektionsmedel för framtida smittskydd, i synnerhet om besprutning av slutna utrymmen fungerar som säker sanering av luften och miljön.

Deklaration för bedömning av jäv, intressekonflikter etc.

Tamio Matsuzawa är medarbetare hos E-PLAN Co. Ltd.

Tack

Vi tackar Ryusuke Matsuzawa för hans sakkunniga tekniska råd. Detta arbete har utförts med stöd av Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) under Tillståndsnummer JP19fk0108104.

Referenser

- [1] J. Barker, D. Stevens, S.F. Bloomfield, Spread and prevention of some
- [2] common viral infections in community facilities and domestic homes, *J. Appl. Microbiol.* 91 (2001) 7e21.
- [3] C.L.F. Walker, I. Rudan, L. Liu, H. Nair, E. Theodoratou, Z.A. Bhutta, K.L. O'Brien, H. Campbell, R.E. Black, Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea, *Lancet* 381 (2013) 1405e1416.

- [4] S.A. Boone, C.P. Gerba, Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease, *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (2007) 1687e1696.
- [5] E. Petersen, M. Koopmans, U. Go, D.H. Hamer, N. Petrosillo, F. Castelli, M. Storgaard, S.A. Khalili, L. Simonsen, Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics, *Lancet Infect. Dis.* 20 (2020) e238e244.
- [6] C. Wu, X. Chen, Y. Cai, J. Xia, X. Zhou, S. Xu, H. Huang, L. Zhang, X. Zhou, C. Du, Y. Zhang, J. Song, S. Wang, Y. Chao, Z. Yang, J. Xu, X. Zhou, D. Chen, W. Xiong, L. Xu, F. Zhou, J. Jiang, C. Bai, J. Zheng, Y. Song, Risk factors associated with acute respiratory distress syndrome and death in patients with coronavirus disease 2019 pneumonia in Wuhan, China, *JAMA Intern. Med.* 180 (2020) 934e943.
- [7] A. Colantuoni, R. Martini, P. Caprari, M. Ballestri, P.L. Capocchi, A. Gnasso, R.L. Presti, A. Marcocchia, M. Rossi, G. Caimi, COVID-19 Sepsis and microcirculation dysfunction, *Front. Physiol.* 11 (2020) 747.
- [8] C. Ogimi, Y.J. Kim, E.T. Martin, H.J. Huh, C.-H. Chiu, J.A. Englund, What's new with the old coronaviruses? *J. Pediatric. Infect. Dis. Soc.* 9 (2020) 210e217.
- [9] S.M. Garland, M. Steben, Genital herpes, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 28 (2014) 1098e1110.
- [10] R. Howie, M.J. Alfa, K. Coombs, Survival of enveloped and non-enveloped viruses on surfaces compared with other micro-organisms and impact of sub-optimal disinfectant exposure, *J. Hosp. Infect.* 69 (2008) 368e376.
- [11] K. B'anyai, M.K. Estes, V. Martella, U.D. Parashar, Viral gastroenteritis, *Lancet* 392 (2018) 175e186.
- [12] B. Holmes, M. Costas, M. Ganner, S.L. On, M. Stevens, Evaluation of Biolog system for identification of some Gram-negative bacteria of clinical importance, *J. Clin. Microbiol.* 32 (1994) 1970e1975.
- [13] W.A. Rutala, D.J. Weber, Disinfection and sterilization in health care facilities: an overview and current issues, *Infect. Dis. Clin.* 30 (2016) 609e637.
- [14] K. Shirato, N. Nao, H. Katano, I. Takayama, S. Saito, F. Kato, H. Katoh, M. Sakata, Y. Nakatsu, Y. Mori, T. Kageyama, S. Matsuyama, M. Takeda, Development of genetic diagnostic methods for novel coronavirus 2019 (nCoV-2019) in Japan, *Jpn. J. Infect. Dis.* 73 (2020) 304e307.
- [15] M. Yamashita, J. Tanaka, Pulmonary collapse and pneumonia due to inhalation of a waterproofing aerosol in female CD-1 Mice, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 33 (1995) 631e637.
- [16] J.E. Wahlberg, M. Lindberg, Patch testing, in: P.J. Frosch, T. Menne, J.P. Lepoittevin (Eds.), *Contact Dermatitis*, fourth ed., Springer, Germany, 2005, pp. 366e386.
- [17] S. Khongwichit, W. Sornjai, K. Jitobaom, M. Greenwood, M.P. Greenwood, A. Hitakarun, N. Wikan, D. Murphy, D.R. Smith, A functional interaction between GRP78 and Zika virus E protein, *Sci. Rep.* 11 (2021) 393.
- [18] D. Hricova, R. Stean, C. Zweifel, Electrolyzed water and its application in the food industry, *J. Food Protect.* 71 (2016) 1934e1947.
- [19] A.D. Ogunniyi, C.E. Dandie, S. Ferro, B. Hall, B. Drigo, G. Brunetti, H. Venter, B. Myers, P. Deo, E. Donner, E. Lombi, Comparative antibacterial activities of neutral electrolyzed oxidizing water and other chlorine-based sanitizers, *Sci. Rep.* 9 (2019) 19955.
- [20] E. Moorman, N. Montazeri, L. Jaykus, Efficacy of neutral electrolyzed water for inactivation of human norovirus, *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (2017) e00653, 17.
- [21] V. N Bui, K.V. Nguyen, N.T. Pham, A.N. Bui, T.D. Dao, T.T. Nguyen, H.T. Nguyen, D.Q. Trinh, K. Inui, H. Uchiyumi, H. Ogawa, K. Imai, Potential of electrolyzed water for disinfection of foot-and-mouth disease virus, *J. Vet. Med. Sci.* 79 (2017) 16e614.
- [22] M. Perutz, Electrostatic effects in proteins, *Science* 201 (1978) 1187e1191.
- [23] E. Shikata, Effects of different pH-values upon tobacco mosaic virus, *Mem. Fac. Agric. Hokkaido* 3 (1958) 154e161.
- [24] S. Katagiri, S. Aikawa, Y. Hinuma, Stepwise degradation of poliovirus capsid by alkaline treatment, *J. Gen. Virol.* 13 (1971) 101e109.