

OVERENI PREVOD SA ENGLESKOG JEZIKA

МИХАИЛО В. ГОЛУБОВИЋ
СУДСКИ ПРЕВОДИЛАЦ ЗА ЕНГЛЕСКИ,
НЕМАЧКИ И СЛОВЕНАЧКИ ЈЕЗИК
ШПАНСКИХ БОРАЦА 34, ТЕЛ. : 2131-566
НОВИ БЕОГРАД

Broj 165/2021:

Potvrđujem da ovaj prevod u potpunosti
odgovara izvorniku sačinjenom na engleskom
jeziku.

Beograd, 21. april 2021.



M. Golubović
MIHAILO V. GOLUBOVIĆ
sudski prevodilac za nemački,
engleski i slovenački jezik
Španskih boraca 34/3
11070 Novi Beograd
Tel.: (011) 2131 566
Faks: (011) 311 5144
pizonmvg@sezampro.rs

Postavljen rešenjem Republičkog sekretara za pravosuđe i
opštu upravu, Beograd, br. 74-28/83-04 od 05.10.1983.



DRUŠTVO ZA EKOLOŠKU I SANITARNU ZAŠTITU VISAN DOO

IZVEŠTAJ STUDIJE 2021 – 1701 / 21 23 00163

**Oslobađanje aktivnog hlora iz hipohloraste kiseline putem
elektrohemijske aktivacije**

**ANTIVIRUSNA AKTIVNOST PO STANDARDU EN 14476
PROTIV ADENOVIRUSA, VIRUSA DEČIJE PARALIZE, NOROVIRUSA MIŠA
I VACCINIA VIRUSA ZA PROIZVOD „OSLOBAĐANJE AKTIVNOG HLORA IZ
HIPOHLORASTE KISELINE PUTEM ELEKTROHEMIJSKE AKTIVACIJE“**



IDENTIFIKACIJA PROIZVODA

Šifra/naziv proizvoda	Oslobađanje aktivnog hlora iz hipohloraste kiseline putem elektrohemijske aktivacije
Datum prijema	17.02.2021.
Izgled proizvoda	Bistra, bezbojna tečnost
Čuvanje	Na sobnoj temperaturi (20°C)
Koncentracija korišćena za	97,0% primljenog proizvoda
Aktivna jedinjenja	Oslobađanje aktivnog hlora iz 0,05% hipohloraste kiseline

EKSPERIMENTALNI USLOVI

Method testiranja	14476:2013+A2:2019: „Hemijski dezinficijensi i antiseptici – Kvantitativni suspenzioni test za ocenu virocidne aktivnost u oblasti medicine - Metod testiranja i zahtevi (Faza 2/Korak 1)“
Period testiranja	17.02.2021.
Sojevi virusa	Adenovirus tip 5 (ATCC VR-5) Virus dečije paralize 1 Sabin soj, LSc-2ab (WHO) Norovirus miša (Soj S99 Berlin) Vaccinia virus (Soj MVA)
Ćelijske linije	Ćelije ljudskog epitela tip 2 (Hep-2) Ćelije ljudskog rabdomiosarkoma (RD) RAW 264.7 makrofage (ATCC) Bubrežni fibroblasti beba hrčaka (BHK ćelije)
Podloga za kulturu	DMEM (Dulbecco minimalna neophodna podloga)
Vreme kontakta	15 sekundi
Temperatura testiranja	Vodeno kupatilo, 20±1°C
Supstanca koja ometa	BSA 0,3 g/L (čisti uslovi)
Proces inaktivacije	Razblaženje 1/10 u ledeno hladnoj podlozi za održavanje
Tehnički nadzor	Pogka Vasiliki, dr.sci., Kalliaropoulos Antonios
Objekat	Objekat BSL-2, Public Health Laboratories, Hellenic Pasteur Institute.



1. Princip testa

97% razblaženje proizvoda „Oslobađanje aktivnog hlora iz hipohloraste kiseline putem elektrohemijske aktivacije“ je dodato u test suspenziju titriranih virusa u rastvoru goveđeg serum albumina 0,3 g/L (čisti uslovi). Mešavine su držane na 20°C tokom 15 sec. Na kraju vremena kontakta, uzet je alikvot i virocidna aktivnost je potisnuta razblaženjem u ledeno hladnoj podlozi za održavanje. Razblaženja su potom inokulirana u monoslojeve ćelija na pločama za kulture sa 96 otvora, radi titriranja preostalih virusa. Titri virusa izraženi kao TCID₅₀ vrednosti, su određeni posle 5-dnevne inkubacije i izražene na log skali. Smanjenje zaraznosti virusa je izračunato iz razlika log titara virusa pre (kontrola) i posle tretmana proizvodom. Prema standardu EN 14476 proizvod poseduje antivirusnu aktivnost kada je smanjenje virusa najmanje 4 log.

2. Test titracije virusa

Antivirusna aktivnost proizvoda je testirana na četiri soja virusa koja predlaže Standard EN 14476, adenovirusu tip 5, virusu dečije paralize, norovirusu miša i vaccinia virusu. Virusi su razmnožavani u odgovarajućem sistemu ćelijske kulture da bi se proizveo visok titar: Hep-2 monoslojevi za titraciju adenovirusa, BHK za vaccinia virus, monoslojevi RAW ćelija za titraciju norovirusa miša i monoslojevi RD ćelija za titraciju virusa dečije paralize. Svaki virus je testiran u decimalnim razblaženjima 10⁻³ do 10⁻¹⁰. Svako razblaženje je inokulirano 10x u otvorima pločica za kulturu sa 96 otvora sa odgovarajućim monoslojem ćelija. Inficirane ćelije su inkubirane na 37°C u atmosferi 5% CO₂ tokom 5 dana. Zarazna doza za ćelijsku kulturu (Tissue Culture Infectious Dose - TCID₅₀) tj. Zarazna doza suspenzije virusa koja indukuje citopatološki efekat (Cytopathic Effect - CPE) kod 50% jedinica ćelijske kulture su ocenjeni Spearman-Kärber metodom krajnje tačke:

$$\text{Log TCID}_{50} = L - d(S - 0,5),$$

gde je L najveća korišćena koncentracija virusa, d log razlika razblaženja, S suma % zahvaćenih (CPE) pri svakom razblaženju.

Standardna greška je izračunata po formuli:

$$\sigma_m = d \sqrt{\sum p_i(1-p_i)/(n_i-1)}$$

gde je d logaritam faktora razblaženja, p_i uočena stopa reakcije, n broj test predmeta po razblaženju i σ_m standardna greška logaritamskog titra.



CPE rezultati za svaki od virusa na odgovarajućoj liniji ćelija su prikazani u tabelama 1a, 1b, 1c i 1d, tim redom.

Tabela 1a. Titracija adenovirusa na Hep-2 ćelijama

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁴	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁵	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁷	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁸	4	4	0	4	4	0	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁹	4	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE

Tabela 1b. Titracija vaccinia virusa na BHK ćelijama

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁴	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁵	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁷	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁸	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁹	0	4	4	0	0	0	4	0	4	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE

Tabela 1c. Titracija norovirusa miša na RAW ćelijama

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁴	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁵	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁷	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁸	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁹	0	4	0	4	0	0	0	4	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE

Tabela 1d. Titracija virusa dečije paralize na RD ćelijama

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁴	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁵	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁶	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁷	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	0
10 ⁻⁸	4	4	4	4	0	4	0	4	4	4	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE

Primenom Spearman-Kärber formule na gore pomenute CPE rezultate, izračunati TCID₅₀ za sojeve adenovirusa, vaccinia virusa, norovirusa i virusa dečije paralize su bili 10^{-7.6}, 10^{-7.9}, 10^{-7.8}; 10^{-7.5} tim redom. Uzimajući u obzir standardnu grešku gornjeg proračuna, titri sijeva virusa korišćenih za testove su bili:

Početni titar adenovirusa tip 5	Log TCID ₅₀ /0,1mL = 7,6±0,224
Početni titar of vaccinia virusa	Log TCID ₅₀ /0,1mL = 7,9±0,163
Početni titar norovirusa miša	Log TCID ₅₀ /0,1mL = 7,8±0,153
Početni titar virusa dečije paralize	Log TCID ₅₀ /0,1mL = 7,5±0,189

3. Citotoksično dejstvo proizvoda

Odredili smo najvišu koncentracija proizvoda (97,0% konacna koncentracija) koja nema toksično dejstvo na ćelije koje se koriste za kontrola virusa. Razblaženja 10⁻¹ do 10⁻⁸ proizvoda u podlozi za kulturu sa 0,3 g/L BSA su inkubirana u ledeno hladnoj vodi tokom 30 min i potom je 100 µL od svakog razblaženja inokulirano na monoslojevima Hep-2, BHK, RAW i RD ćelija u otvorima pločica za kulturu. Zabeležene su sve mikroskopske promene na ćelijama nakon 5 dana inkubacije.

Nije primećeno bilo kakvo citotoksično dejstvo na Hep-2, BHK, RD i RAW ćelijama pri svim razblaženjima od 97,0% konačne koncentracije proizvoda.

4. Referentni test za inaktivaciju virusa

Formaldehid 0,7% (w/v) je uključen kao referentni test za validaciju prema Standardu EN 14476. Test citotoksičnosti kao i određivanje antivirusne aktivnosti su urađeni na RD ćelijama korišćenjem serijskih razblaženja do 10⁻⁸ gore pomenutog test rastvora formaldehida. Vremena



kontakta su bila 30 min i 60 min. Rezultati za citotoksičnost i testove inaktivacije virusa su prikazani u tabelama 2 i 3, tim redom (prikazani su samo rezultati za vreme kontakta 30 min).

Tabela 2: Test citotoksičnosti rastvora formaldehida na RD ćelijama

Razblaženja proizvoda	Prisustvo ili odsustvo ćelijske citotoksičnosti proizvoda (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻¹	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻²	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻³	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻⁴	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) tox = citotoksičnost, 0 = odsustvo citotoksičnosti

Tabela 3: Podaci o inaktivaciji rastvora formaldehida testirano na virusu dečije paralize

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻⁴	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻⁵	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻⁶	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	tox	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE, Tox = citotoksičnost

Smanjenje od najmanje 2,0 log za titar virusa dečije paralize je zabeleženo u prisustvu 0,7% (w/v) formaldehida. Više log smanjenje nije moglo biti viđeno usled toksičnosti formaldehida za RD ćelije. Po EN 14476 standardu, razlika između logaritamskog titra kontrole virusa i logaritamskog titra test organizma u referentnom testu inaktivacije treba da bude između 0,5 i 2,5 log nakon 30 min za virus dečije paralize da bi se verifikovao metod.

5. Antivirusna aktivnost proizvoda

Antivirusna aktivnost proizvoda u odnosu na sojeve adenovirusa, vaccinia virusa, norovirusa miša i virusa dečije paralize je određena za 15 sec na 20±1°C u 0,3 g/L (čisti uslovi). Odmah na kraju vremena kontakta, pripremljeno je 1/10 razblaženje u ledeno hladnoj podlozi za održavanje ćelija, a 30 min kasnije, potonja serijska razblaženja (razlike po 1:10) su inokulirana na monoslojeve ćelijskih kultura. Nakon inkubacije, izračunat je titar svakog virusa, a



smanjenje zaraznosti virusa je određeno iz log razlika titra virusa pre i nakon tretmana proizvodom. Rezultati su prikazani u tabelama 4, 5, 6 i 7 za adenovirus, vaccinia virus, norovirus miša i virus dečije paralize, tim redom.

Tabela 4: Titracija adenovirusa nakon 15 sec kontakta sa 97,0% konačne koncentracije proizvoda u 0,3% BSA

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE, Tox = citotoksičnost

Titar adenovirusa preostalog nakon tretmana proizvodom je:

$$\text{Log TCID}_{50} \text{ nakon tretmana: } \leq 1,5$$

$$\text{Log razlika} = \text{početni titar virusa} - \text{titar virusa nakon tretmana} = 7,6 - (\leq 1,5) = \geq 6,1$$

Tabela 5: Titracija vaccinia virusa nakon 15 sec kontakta sa 97,0% konačne koncentracije proizvoda u 0,3% BSA

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE, Tox = citotoksičnost

Titar vaccinia virusa preostalog nakon tretmana proizvodom je:

$$\text{Log TCID}_{50} \text{ nakon tretmana: } \leq 1,5$$

$$\text{Log razlika} = \text{početni titar virusa} - \text{titar virusa nakon tretmana} = 7,9 - (\leq 1,5) = \geq 6,4$$



Tabela 6: Titracija norovirusa miša nakon 15 sec kontakta sa 97,0% konačne koncentracije proizvoda u 0,3% BSA

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE, Tox = citotoksičnost

Titar norovirus miša preostalog nakon tretmana proizvodom je:

Log TCID₅₀ nakon tretmana: ≤1,5

Log razlika = početni titar virusa – titar virusa nakon tretmana = 7,8-(≤1,5) = ≥6,3

Tabela 7: Titracija virusa dečije paralize nakon 15 sec kontakta sa 97,0% konačne koncentracije proizvoda u 0,3% BSA

Razblaženja virusa	CPE u otvorima za ćelijske kulture pločice za kulturu (*)										Ćelijska kontrola	
10 ⁻³	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10 ⁻¹⁰	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) Ocena CPE u svakom otvoru: 0 = nema CPE, 1 = 25% CPE, 2 = 50% CPE, 3 = 75% CPE, 4 = 100% CPE, Tox = citotoksičnost

Titar virus dečije paralize preostalog nakon tretmana proizvodom je:

Log TCID₅₀ nakon tretmana: ≤1,5

Log razlika = početni titar virusa – titar virusa nakon tretmana = 7,5-(≤1,5) = ≥6,0

6. Zaključak

Antivirusna aktivnost proizvoda „Oslobađanje aktivnog hlora iz hipohloraste kiseline putem elektrohemijske aktivacije“ u odnosu na adenovirus tip 5, vaccinia virus, norovirus miša i virus dečije paralize je testirana po standardu EN 14476: „Hemijski dezinficijensi i antiseptici – Kvantitativni suspenzioni test za ocenu virocidne aktivnosti u oblasti medicine - Metod

testiranja i zahtevi (Faza 2/Korak 1)" Po standardu EN 14476 proizvod poseduje antivirusnu aktivnost kada je uočeno smanjenje od najmanje 4 log virusa.

Proizvod „Oslobađanje aktivnog hlora iz hipohloraste kiseline putem elektrohemijske aktivacije“ sa 97,0% konačnom koncentracijom, je pokazao:

- $\geq 6,1$ log smanjenje adenovirusa tip 5 (ATCC VR-5) nakon vremena kontakta od 15 sec u prisustvu 0,3 g/L BSA, na 20°C
- $\geq 6,4$ log smanjenje vaccinia virusa (soj MVA) nakon vremena kontakta od 15 sec u prisustvu 0,3 g/L BSA, na 20°C
- $\geq 6,3$ log smanjenje norovirusa miša (soj S99 Berlin) nakon vremena kontakta od 15 sec u prisustvu 0,3 g/L BSA, na 20°C
- $\geq 6,0$ log smanjenje virusa dečije paralize tip 1 nakon vremena kontakta od 15 sec u prisustvu 0,3 g/L BSA, na 20°C

Proizvod je pokazao antivirusnu aktivnost prema DNA adenovirusa bez ovojnice, RNA norovirusa miša bez ovojnice, RNA virusa dečije paralize bez ovojnice i DNA vaccinia virusa sa ovojnicom. Po EN 14476 standardu, smatra se da su proizvodi koji poseduju antivirusnu aktivnost prema adenovirusu, virusu dečije paralize i norovirusu miša aktivni prema svim virusima (sa ovojnicom i bez ovojnice).

Direktor studije:

(Pravougaoni pečat
QACS Laboratories
Potpis nečitak)

Kraj izveštaja studije

Lagiopoulos Giorgos
Tehnički direktor Odeljenja mikrobiologije,
mr Agronomije – Prehrambeni tehnolog sa
postdiplomskim sertifikatom iz Farmaceutske
mikrobiologije
Datum: 19.04.2021. godine

