Biomedical Science Research Institute
Hoseo University, 20, Hoseo-ro 79 beon-gil,
Baebang, Asan, KOREA 31499
Tel: +82-41-540-9675 Fax: +82-41-540-9829

호서대학교 바이오의과학연구센터
우 31499 충남 아산시 배방읍 호서로 79번길 20
전화: 041-540-9675 전송: 041-540-9829

최종연구보고서

African swine fever virus에 대한 팜크린 골드의 소독제 효력에 관한 연구

TR 19138 (30min)

2019. 12.

호서대학교 바이오의과학연구센터
호서대학교 산학협력단

개 요

제 목 : African swine fever virus에 대한 팜크린 골드의 소독제 효력에 관한 연구

의 뢰 자 : ㈜넬바이오텍
(17513) 경기도 안성시 삼죽면 덕산공단길 24
Tel: 031-674-0531, Fax: 031-674-0534

주 관 기 관 : 호서대학교 바이오의과학연구센터
(31499) 충청남도 아산시 배방읍 호서로 79번길 20
Tel : 041-540-9675 Fax : 041-540-9829

연 구 책 임 자 : 정상희(DVM, PhD, Professor)
호서대학교 임상병리학과, 바이오의과학연구소
Tel : 041-540-9675 Fax : 041-540-9829

연 구 담 당 자 : 민정란(DVM, MS, Researcher)

시 험 수 행 장 소 : Wageningen Bioveterinary Research
Department of Virology
Laboratory Classical and African Swine Fever and Aujeszky's Disease
(Animal Biosafety Level 4 Laboratory Facilities)
P.O. Box 65, 8200 AB Lelystad, The Netherlands

시험수행지책임자 : Mr. Michiel Kroese
Wageningen Bioveterinary Research
P.O.Box65 8200 AB Lelystad, The Netherlands
Tel) 0320238007 Fax) 0320238668

연 구 기 간 : 2019년 03월 07일 ~ 2019년 11월 30일

승 인

연 구 책 임 자 _____ 날짜 2019 년 12 월 03 일
정 상 희, DVM, PhD, Professor

목 차

1. 요 약 1
1.1. 팡크린 골드의 소독제 효력시험 결과 요약 1
1.2. 결과에 근거한 종합의견 1
2. 목 적 2
3. 재 료 2
3.1. 공시품 2
3.2. 공시 바이러스 2
3.3. 공시세포 2
3.4. 세포 배양액 2
3.5. 희석액 3
3.6. 중화배지 3
4. 방 법 3
4.1. 세포 준비 3
4.2. 바이러스액 준비 3
4.3. 소독제의 희석 3
4.4. 소독제 반응 및 중화반응 4
4.5. IPMA assay 4
4.6. 바이러스 함유량 계산 4
4.7. 대조군 4
4.8. 판정 기준 5
5. 결 과 6
5.1. 소독제 효력시험 결과 6
5.2. 소독제 유효희석배수 및 권장희석배수 6
6. 종합 의견 7

APPENDICES

Appendix 1. 소독제 함량시험 성적서 8
Appendix 2. ASFV Report (w/ raw data) 9

1. 요 약

1.1. 팜크린 골드의 소독제 효력시험 결과 요약

'팜크린 골드'은 African swine fever virus와 30분간 반응 시 소독제 함량이 증가할수록 바이러스 사멸효과가 증가하였으며, 공시 희석배수인 200배에서 바이러스 억제지수($log_{10}TCID_{50}$/mL)가 '4.38'으로 유효성이 인정되는 기준치인 '4' 보다 높게 나타나는 바, '팜크린 골드'의 유효희석배수는 200배로 확인되었다.

<팜크린 골드의 바이러스 억제 지수($log_{10}TCID_{50}$/mL)>

병원체	희석배수 (5% FCS)		
	×200	×400	×600
ASF virus	4.38	1.13	0.75

1.2. 결과에 근거한 종합의견

African swine fever virus에 대한 팜크린 골드의 권장희석배수는 160배로 판정하였다.

<팜크린 골드의 유효 및 권장희석배수>

병원체	유효희석배수	권장희석배수
ASF virus	200	160

2. 목 적

본 연구는 4급 암모늄염, 구연산 및 인산을 유효성분으로 하는 소독제인 '팜크린 골드'의 African swine fever virus에 대한 효력 시험을 실시하여 이의 유효성을 확인하고 적정 유효희석배수를 설정하고자 하였다.

3. 재 료

3.1. 공시품

1) 명 칭 : 팜크린 골드(Farmclean Gold)

2) 제 조 번 호 : 1903002

3) 제 조 일 자 : 2019.03.14

4) 조 성 (본제 1L 중)

- 4급 암모늄염(Quaternary ammonium chloride, 별규, 유효성분으로써)	----------	100 g
- 시트르산수화물(Citric acid hydrate, KVP)	----------	200 g
- 인산(Phosphoric acid, KVP)	----------	100 g
- 식용색소 청색 제1호(Blue No. 1, 식첨)	----------	적당량
- 정제수(Purified water, KP9)	----------	적당량

5) 제형 및 성상 : 액제, 엷은 청색의 맑은 액체

※ 소독제 효력지침(제2018-16호) 제4조2 ④항에 따라 공시제품의 봉인상태 및 함량시험 결과를 확인하여 이상이 없는 제품을 시험에 사용하였다.

3.2. 공시 바이러스

The Netherlands'86 ASFV

3.3. 공시세포

Porcine Alveolar Macrophage (PAM) cell

3.4. 세포 배양액

5% FCS와 1% 항생제(페니실린-스트렙토마이신)이 함유 된 RPMI 1640

3.5. 희석액

5% FCS 함유 경수 (WHO hard water, autoclave at 121°C, 15 min)

$CaCl_2$	0.304 g
$MgCl_2$	0.139g
Demineralized water	1L

3.6. 중화배지

10% FBS, 1% antibiotics 함유 RPMI 1640 배지

4. 방 법

African swine fever virus의 높은 전파력을 고려하여 시험의 수행은 ISO 9001 인증(네덜란드 공인) BioSafetyLaboratory-4grade의 시설을 갖춘 Wageningen Bioveterinary Research에서 이루어졌으며, 시험방법은 소독제 효력시험지침(농림축산검역본부 고시 제2018-16호, 2018.05.31)을 원칙으로 하여 유럽표준 소독제효력 시험법 "The European Standard EN 14675:2006 『Chemical disinfectant and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area-test method and requirements (phase 2/step1』 "와 이에 근거한 DEFAR 시험법(IAH-P-BSEC0DIS-002) 및 네덜란드 공인 소독제 시험법에 근거하여 실시하였다.

4.1. 세포 준비

효력시험을 수행하기 전에 1×10^6cell/mL 농도의 PAM cell을 96 well plate에 분주하여 배양하였다.

4.2. 바이러스액 준비

1) 바이러스 역가가 $10^{7.0}TCID_{50}$/mL 이상임이 확인된 ASF virus를 사용하였다.
2) 바이러스액은 유기물 희석액(5% FCS) 19 mL에 ASF virus 1mL를 혼합한 다음, 시험에 사용하기 전 4°C에서 최소 30분간 보관하였다.

4.3. 소독제의 희석

1) 소독제는 시험균액과의 반응 전 희석배수가 최종 희석배수가 되도록, 유기물 희석액(5% FCS)으로 아래와 같이 희석하였다.

- 유기물 조건: ×200, ×400, ×600

2) 시험당일에 소독제 희석액을 준비하여 4℃에서 최소 30분간 보관하였다.

4.4. 소독제 반응 및 중화반응

1) 바이러스액 2.5 mL를 4℃에 있는 각 소독제 희석액 2.5 mL이 들어있는 시험관에 넣고 혼합하였다.
2) 소독제 희석액과 바이러스액 혼합물(test mixture)을 4℃에서 30분간 반응시켰으며, 도중에 10분마다 잘 흔들어주었다.
3) test mixture을 잘 혼합하였다.
4) 반응이 끝난 즉시, 소독제를 중화하기 위하여 test mixture 1 mL를 4℃ water bath에 보관된 중화배지 1 mL에 첨가하였다.
5) 상기 혼합액(final mixture)을 4℃의 배지를 이용하여 10배 계단희석(10^{-2}~10^{-7})하였다.

4.5. IPMA assay

1) 각 희석배수 당 10배 계단희석액(10^{-2}~10^{-7}) 100 μL를 96 well plate의 8 well에 분주하고, PAM cell 100 μL를 첨가하였다.
2) 37℃, 5% CO_2 습윤 배양기에서 4일간 배양하였다.
3) 4일간 배양 후 세포를 고정시키고, ASF-HIS, Mouse-anti-Swine IgG/HRPO conjugate와 AEC로 염색하였다.
4) 현미경으로 Plate를 관찰하여 결과를 확인하였다.

4.6. 바이러스 함유량 계산

바이러스 역가는 Spearman-kärber 법으로 계산하였다.

4.7. 대조군

1) 병원체 대조군의 경우 바이러스 희석액 2.5 mL를 소독제가 포함되지 않는 경수와 유기물 희석액(5% FCS) 2.5 mL에 첨가하여 바이러스 역가를 측정하였다.
2) 양성대조군은 1% NaOH와 2% NaOH를 사용하였다. 1% NaOH와 2% NaOH 양성대조군에서 30분간 반응 시 바이러스 억제지수가 적어도 4 $\log_{10}TCID_{50}$/mL 이상임을 확인하였다.

3) 독성대조군에서는 소독제에 의한 세포독성이 일어나지 않음을 확인하였다.

4.8. 판정 기준

1) 소독제 시험결과는 병원체 대조군과 비교하여 유효희석배수를 확인하였다. 즉, 병원체 대조군과 비교하여 병원체가 10^4(최소 $4\log_{10}$)이상의 감소가 확인된 희석배수를 유효희석배수로 하였다.
2) 권장희석배수는 최종 유효희석배수의 80%값에 해당하는 희석배수로 하였다

5. 결 과

5.1. 소독제 효력시험 결과

- 소독제 '팜크린 골드'의 희석액을 African swine fever virus와 30분간 반응시킨 후 PAM cell에 접종하여 IPMA assay를 실시한 결과, 소독제 농도가 증가할수록 바이러스 사멸효과가 증가하였으며, 공시 희석배수 200배에서 바이러스 억제지수($log_{10}TCID_{50}$/mL)가 '4.38'으로 유효하다고 인정되는 수치인 '4' 보다 높게 나타났다.
- 병원체 대조군 바이러스 역가는 7.13 $log_{10}TCID_{50}$/mL이었다.
- 유효희석배수(200배)에서 소독제 독성이 약하게 관찰되었다.
- 1% NaOH와 2% NaOH에 의한 바이러스 억제지수는($log_{10}TCID_{50}$/mL) 각각 3.88 및 ≥4.63 이었다.

표 1. 팜크린 골드의 소독제 효력(30 분)

희석배수 (v/v)	Reduction ($log_{10}TCID_{50}$/mL)
1:200	4.38
1:400	1.13
1:600	0.75

※ 대조군

- The Netherlands'86 ASFV virus titer (log_{10} $TCID_{50}$/mL): 7.13
- 1% NaOH 및 2% NaOH에 바이러스 억제지수(log_{10} $TCID_{50}$/mL): 3.88 및 ≥ 4.63
- 소독제 독성: ×200 소독제 희석액에서 세포독성이 약하게 있음.

5.2. 소독제 유효희석배수 및 권장희석배수

African swine fever virus에 대한 팜크린 골드의 유효희석배수는 200배이었으며, 권장희석배수는 160배이었다.

병원체	유효희석배수	권장희석배수
ASF virus	200	160

6. 종합 의견

'팜크린 골드'은 African swine fever virus 에 30 분간 반응 시 공시 희석배수 200 배에서 바이러스 억제지수($log_{10}TCID_{50}$/mL)가 '4.38'으로 유효성이 인정되는 기준 치인 '4' 보다 높게 나타나는 바, '팜크린 골드'의 유효희석배수는 200 배로 확인되었으며, 권장희석배수는 160 배로 판정하였다.

APPENDICES

Appendix 1. 소독제 함량시험 성적서

제 20190329-2-000813 호

시험 · 검사 성적서

수 신 : (주)넬바이오텍
대 표 이은호

시료명칭	광크린골드		
제조일자	2019-03-14	제조번호	1903002
제조국가	KR/KOREA, REPUBLIC OF / R.KOREA KRM.	제조회사	넬바이오텍
의뢰목적	[40]기타용도/ASF 효력시험용		

시험방법	시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 성적
일반시험	성상	옅은 청색의 맑은 액체	확인됨
일반시험	확인시험(정성반응)	4급암모늄염이 확인되어야 함	확인됨
일반시험	확인시험	각 성분이 정량법에서 확인되어야 함	확인됨
일반시험	비중	1.05 - 1.15	1.121
일반시험	pH	0.5 - 1.5	1.13
일반시험	내용량시험	100% 이상	100.30%
함량시험	HPLC / Citric acid Monohydrate	200g/L	203.65g/L (101.83%)
함량시험	ICP-OES / Phosphoric acid	100g/L	100.02g/L (100.02%)
함량시험	적정 / Benzalkonium chloride (KP법)	100g/L	98.51g/L (98.51%)

내용량시험은 검체3개로 시험함

귀하가 (20190329-2-000813)으로 위탁 신청한 검체의 시험 · 검사 결과는 위와 같습니다.

2019 년 04 월 17 일

한국동물약품기술연구원장

* 이 성적은 제시된 검체에 한하며 시험 · 검사 의뢰목적외의 광고, 선전 등에 이용할 수 없습니다.

- P1 -

KA-KQP-08-F02(0) 한국동물약품기술연구원 A4(210 x 297)

Appendix 2. ASFV Report (w/ raw data)

Order: 2019 ASFV Hoseo-2

Water							**Water**						
Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 5 TCID50/ml: 8.00							Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 30 TCID50/ml: 7.13						
	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	
A	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	A
B	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	pos	B
C	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	pos	neg	C
D	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	D
E	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	E
F	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	F
G	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	neg	G
H	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg	H

Order: 2019 ASFV Hoseo-2

1% NaOH							**1% NaOH**						
Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 5 TCID50/ml: 3.63							Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 30 TCID50/ml: 3.25						
	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	
A	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	A
B	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	B
C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C
D	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	D
E	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos	pos	neg	neg	neg	neg	E
F	pos	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	F
G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	G
H	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	H

Order: 2019 ASFV Hoseo-2

2% NaOH							**2% NaOH**						
Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 5 TCID50/ml: 2.63							Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 30 TCID50/ml: ≤2.50						
	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-2	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	
A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	A
B	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	B
C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C
D	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	D
E	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	E
F	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	F
G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	G
H	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	H

Order: 2019 ASFV Hoseo-2													
Farmclean Gold X200							**Farmclean Gold X200**						
Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 5 TCID50/ml: ≤2.50							Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 30 TCID50/ml: 2.75						
	10^-2*	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-2*	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	
A	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	A
B	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	B
C	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	C
D	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	D
E	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	E
F	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	F
G	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	G
H	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	H

*Cytotoxicity

Order: 2019 ASFV Hoseo-2													
Farmclean Gold X400							**Farmclean Gold X400**						
Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 5 TCID50/ml: 6.50							Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 30 TCID50/ml: 6.00						
	10^-2*	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-2*	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	
A	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	A
B	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	B
C	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	C
D	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	D
E	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	E
F	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	F
G	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	G
H	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	H

*Cytotoxicity

Order: 2019 ASFV Hoseo-2													
Farmclean Gold X600							**Farmclean Gold X600**						
Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 5 TCID50/ml: 6.63							Temp: 4°C Soiling: low (5% FCS) Time (min): 30 TCID50/ml: 6.38						
	10^-2*	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	10^-2*	10^-3	10^-4	10^-5	10^-6	10^-7	
A	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	A
B	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	B
C	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	C
D	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	D
E	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	E
F	pos	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	F
G	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	pos	neg	neg	G
H	pos	pos	pos	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg	H

*Cytotoxicity