

시험성적서

	담당자	정세용	전화	031-982-3416
의뢰인	소속	엔씨에스	이메일	bnbchannel@naver.com
	주소	경기도 김포시 양촌읍 황금2로 76 가동		
의뢰내용	바이러스 불활화 실험			
시료	클리에어			
시료사용용도	살균, 소독제			
시험바이러스	Influenza (H1N1/A/PR8)	세포 주	MDCK	
시험번호	KR-2003-004-NCS01	시험기간	2020.04.06.-04.29	
시료상태	액체: 무색, 투명	시료희석	1X,10X,100X	
반응시간	60분	역가측정	CPE	
시험온도	상온 [약 20℃]	시험자	한 동 표 [인]	

시험결과

제품명 [성분]	희석배수	Influenza [10^4 TCID ₅₀]	Influenza [10^5 TCID ₅₀]	바이러스 감소율	
		바이러스 불활화	바이러스 불활화	[log]	[%]
클리에어	원액	6/6	6/6	5	99.999%
	10배	6/6	1/6	4	99.99%
	100배	6/6	1/6	4	99.99%

결과: 시험에 이용된 클리에어는 Influenza A (H1N1/A/PR8)에 대한 살균력시험 결과 100배 희석 농도액까지 99.99% 이상 인플루엔자 사멸 효능을 보였음.

2020 년 05 월 04 일

시험책임자: 김 영 봉



주식회사 케이알바이오텍

* 이 성적서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명에 한정된 결과로써 전체 제품에 대한 품질을 보증하지 않습니다.
* 이 성적서는 홍보, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.

첨부.

시험 요약:

본 시험은 ASTM E1052-11에 따라 의뢰자가 제시한 시료의 바이러스 불활화능 (Virucidal activity)을 측정하기 위하여 실시하였다.

시험 대상 바이러스는 인플루엔자 A 형 바이러스로 이 바이러스의 불활화 능력을 BSL-2 (제LML09-180) 바이러스 실험실에서 실시하였다. 클리에어 1/100 희석액은 인플루엔자 바이러스 (H1N1/A/PR8)를 5분 처리 결과 99.99% 사멸 효능을 보여주었다.

시료 사진



그림1. 클리에어 시료사진 (KR-2003-004-NCS01)

시험방법 및 시험결과

시험 방법

1. 세포 독성 시험

『의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격 - 24 - (식약청 고시 제 2006-32호)』 제9장 또는 ISO 10993-12 Sample preparation and reference materials에 따라 용출한 후 콜로이드 상태의 용출액을 여과하지 않고 ISO 10993-5 또는 『의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격(식약청 고시 제2006-32호)』 제2장에 따라 시험한다. 보통 직접접촉법에 의한 시험법에 따라 세포독성을 평가한다. 세포에 연속 희석한 시료를 처리하고 일정 시간 배양했을 때 세포 생존에 영향을 주지 않는 최대 농도를 찾기 위한 시험법이다.

세포 독성 시험은 당사 실험실 내 Cytotoxicity Test 지침서(문서번호 KRBOP-0803-01, Crystal violet method)에 따라 수행하였다.

1.1 세포독성 시험 방법

- ① 96 well plate에 세포를 배양하고, 시료를 10배 연속 희석하여 세포 배양액에 첨가한다. 이 때 음성 대조군으로 사용하기 위해 1열을 남겨둔다.
- ② 실험 계획에 따라 지정된 시간(약 3일) 동안 세포 배양기에서 배양한다
- ③ 광학 현미경을 사용해 세포 상태를 육안으로 확인한 후, 8 channel multi pipette를 사용하여 모든 well에 50 ul씩 Crystal violet 용액을 넣는다.
- ④ 실온에 30분 정도 두었다가 흐르는 물에 plate를 깨끗이 씻어준다.
- ⑤ Plate를 잘 건조하여 ELISA reader기로 575nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

1.2 결과 관찰 및 판정

- ① Multi well plate reader를 사용해 575 nm 파장에서 흡광도를 측정한다.
- ② 각 샘플의 시험에서 음성대조군과 비교하여 50% 이상의 흡광도(수치)가 나오면 독성이 없는 것으로 판단한다.

결과: 클리에어 원액, 10, 100, 200배 희석 후 MDCK 세포에 처리한 결과 대조군에 비해 세포 생존율이 10배 희석까지 세포독성을 보였다. 그러나 100배 희석액 (1% 클리에어)에서는 세포 독성을 보이지 않았다. 본 시험은 각 희석배율에 따른 소독제 효능 평가를 실시하였으며 살균제 자체의 세포 독성을 중화하기 위하여 “살균 소독제 효능 시험방법자료집

(NIER-GP2018-170)” 에서 제시한 중화제 (10% FBS)로 10배 희석하여 실시하였다.

2. 소독제 효능 시험

살균 · 소독제 효능을 평가하기 위하여 시행하는 생물시험은 규격화된 표준적인 방법에 따라 실시할 필요가 있지만, 살균 · 소독제는 대상 생물종, 사용 방법 및 그 종류에 따라 다양하고 그 시험방법도 다양하다. 따라서 살균 · 소독제의 모두에 대해서 획일적으로 시험법을 표준화하는 것에는 어려움이 있으므로 살생물제의 대상 생물 종 및 용량 · 용법을 고려하여 살생물제의 제형에 따라 적합한 시험방법을 선택하였다. 본 시험법은 ASTM E1052-11을 기준으로 액상제품의 특성을 고려하여 희석배수 시험 등을 실시하였고 원액, 10배, 100배, 200배 희석액에서 효능 시험을 실시하였다.

2.1 바이러스 특성

Influenza Virus (H1N1/A/PR8)

인플루엔자 바이러스는 Orthomyxoviridae 과, Influenza virus 속에 속하며, nucleocapsid (NP)와 matrix (M) 단백질의 항원성 차이에 의해 크게 A, B 및 C형으로 구분된다. 이중 A형은 HA 단백질의 항원 특성에 따라 H1형에서 H15형까지, NA 단백질 항원 특성에 따라 N1형에서 N9형의 아형으로 분류된다. 인플루엔자 바이러스 입자는 직경이 평균 80 ~ 120 nm 정도이며 외부에 돌기가 있는 구형이나, 유정란 및 감수성 세포 등에서 분리된 직후의 바이러스는 길이가 400 nm인 필라멘트 형태로 되어 있는 경우도 있다. 비리온은 피막 (envelope)을 갖고 있으며 에테르, 열 및 pH 등에 민감하다. 유전자는 단일 가닥의 분절화된 (-) RNA로 되어 있고 나선 캡시드 (capsid)로 싸여있다. A와 B형 바이러스는 각각 8개의 다른 RNA 분절을 갖는 반면에, C형은 7개의 분절이 있다.

인플루엔자 바이러스는 기본적으로 조류 인플루엔자 바이러스이며 대부분의 조류 인플루엔자 바이러스가 사람에게 직접 감염되진 않지만, 고병원성 바이러스 (H5N1)등이 사람에게 감염되어 높은 사망률이 나타난다.

● A 형 인플루엔자 바이러스 (Influenza Virus (H1N1/A/PR8))

－ 분류: Orthomyxoviridae 과

- 바이러스핵산: negative-single stranded RNA
- 외피(envelope): 있음
- 불활화저항성: 중간
- 주명칭: A/NWS/33 (H1N1)
- 바이러스감염가: 1.76×10^7 TCID₅₀/mL

2.2. 클리에어의 인플루엔자 바이러스 살균 (Virucidal) 효능 평가 (EN13610)

본 시험은 클리에어 희석액을 준비하여 시험 대상 인플루엔자 바이러스 (10^5 TCID, 10^4 TCID) 와 혼합한후 상온에서 한시간 반응하였다. 중화제 (10% FBS)로 10배 희석 후 MDCK 세포에 감염 후 바이러스에 의한 세포 병변 현상을 관찰하였다. 이때 대조군으로는 일반 생리식염수를 사용하였다.

시 험 결 과

제품명 (성분)	희석배수	Influenza (10^4 TCID ₅₀)	Influenza (10^5 TCID ₅₀)	바이러스 감소 율	
		바이러스 불활화	바이러스 불활화	(log)	(%)
클리에어	원액	6/6	6/6	5	99.999%
	10배	6/6	1/6	4	99.99%
	100배	6/6	1/6	4	99.99%

결과: 시험에 이용된 클리에어는 Influenza A (H1N1/A/PR8)에 대한 살균력시험 결과 100배 희석 농도액까지 99.99% 이상 인플루엔자 사멸 효능을 보였음.

2.3. 클리에어의 시간대별 인플루엔자 바이러스 살균 (Virucidal) 효능 평가

반응 시간별 바이러스 살균 효능을 평가하고자 각 희석액과 인플루엔자 바이러스 (10^5 TCID, 10^4 TCID) 를 혼합한 후 5분, 10분, 30분, 60분 처리하여 중화제 (10% FBS)로 10배 희석 후 MDCK 세포에 감염 후 바이러스에 의한 세포 병변 현상을 관찰하였다. 이때 대조군으로는 일반 생리식염수를 사용하였다.

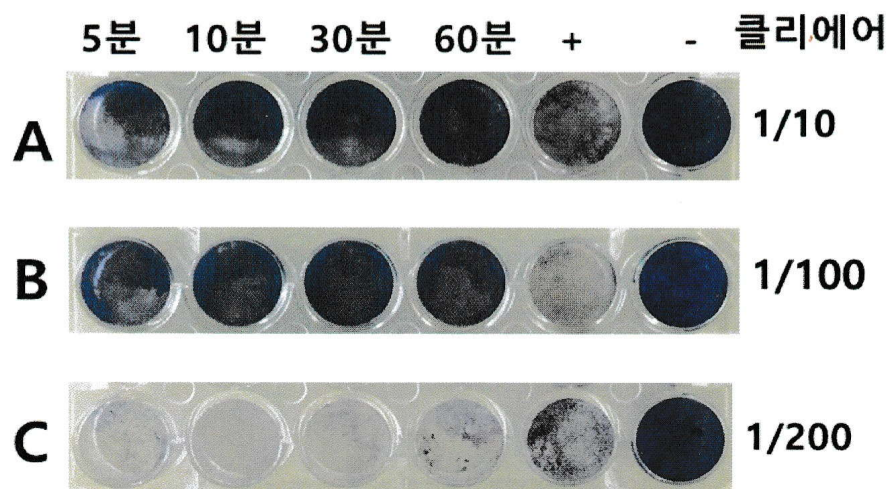


그림2. 클리에어의 시간대별 Influenza Virus에 대한 소독제 (바이러스 불활화) 효능
 A: Influenza Virus 10^4 에 대한 클리에어 1/10 희석액 소독제 효능 평가
 B: Influenza Virus 10^4 에 대한 클리에어 1/100 희석액 소독제 효능 평가
 C: Influenza Virus 10^4 에 대한 클리에어 1/200 희석액 소독제 효능 평가

결과 : 클리에어의 1/100 희석액은 인플루엔자 바이러스 (H1N1/A/PR8)를 5분 처리 결과 99.99% 사멸 효능을 보여주었다.

3. 참고문헌

- (1) ASTM E1052-11, Standard Test Method to Assess the Activity of Microbicides against Viruses in Suspension
- (2) Schmidt, N. J. et. Al., Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection, 7th edition, Am. Pub. Hlth. Assoc., Washington, DC, 1995.
- (3) BS EN 14476:2013 A1:2015, Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area
- (4) Test method for the evaluation of virucidal efficacy of three common liquid surface disinfectants on a simulation environmental surface. Appl Microbiol, 28(1974), pp.748-752
- (5) In vitro evaluation of antiviral and virucidal activity of a high molecular weight hyaluronic acid. Virology Journal 8, Article number:141(2011)
- (6) Virucidal and Neutralizing Activity Tests for Antiviral Substances and Antibodies 10.21769/BioProtoc.2855 Vol 8, Iss 10, May 20, 2018