

## 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	Human Coronavirus (HCoV-229E)	세포 주	MRC-5	
시험번호	KR-2003-004-NCS01	시험기간	2020.04.06.-04.29	
시료상태	액체: 무색, 투명	시료희석	1X,10X,100X	
반응시간	5분, 10분, 30분, 60분	역가측정	CPE	
시험온도	상온 [약 20℃]	시험자	한 동 표 [인]	

## 시험결과

제품명 [처리시간]	희석배수	Coronavirus [10 <sup>4</sup> TCID <sub>50</sub> ] 바이러스 불활화	Coronavirus [10 <sup>5</sup> TCID <sub>50</sub> ] 바이러스 불활화	바이러스 감소율	
				[log]	[%]
클리에어 5 분	10배	4/4	4/4	5	99.999%
	100배	4/4	4/4	5	99.999%
	200배	2/4	0/4	-	-

**결과:** 시험에 이용된 클리에어는 Human Coronavirus (HCoV-229E)에 대한 살균력시험 결과 100배 희석 농도액까지 5분처리에 99.99% 이상 Human Coronavirus (HCoV-229E)에 사멸 효능을 보였음.

2020 년 05 월 28 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 Human Coronavirus(HCoV-229E 로 이 바이러스의 불활화 능력을 BSL-2 (제LML09-180) 바이러스 실험실에서 실시하였다. 클리에어는 Human Coronavirus (HCoV-229E) 에 대한 살균력 시험 결과 100 배 희석 농도까지 5분 처리결과 99.99% 이상 사멸 효능을 보였음.

## 시료 사진



그림1, 엔씨에스에서 제공한 클리에어 시료사진



# 시험방법 및 시험결과

## 시험 방법

### 1. 세포 독성 시험

『의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격 - 24 - (식약청 고시 제2006-32호)』 제 9장 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 MRC-5 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

살균소독제 효능을 평가하기 위하여 시행하는 생물시험은 규격화된 표준적인 방법에 따라 실시할 필요가 있지만, 살균소독제는 대상 생물종, 사용 방법 및 그 종류에 따라 다양하고 그 시험방법도 다양하다. 따라서 살균소독제의 모두에 대해서 획일적으로 시험법을 표준화 하는 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

#### Human Coronavirus (HCov-229E)

Human coronavirus 229E (HCoV-229E)는 Coronaviridae 과, Alphacoronavirus 속에 속하며



외피 (envelope)에는 당단백질인 spike (S) 단백질과 transmembrane (M) 단백질이 포함되어 있고, 양성-단일가닥의 RNA를 유전물질을 가지는 바이러스다. 계절적으로 빈번한 일반 감기 증상을 일으키는 바이러스로 80-220nm 크기의 구형의 모양을 가지며, 소독제등에 대한 저항성은 중간급이다.

● Human Coronavirus 229E (HCoV-229E)

- 분류: *Coronaviridae* 과
- 바이러스 핵산: positive-single stranded RNA
- 외피(envelope): 있음
- 불활화저항성: 중간
- 주명칭: HuCoV-229E
- 바이러스감염가: 1.1 x 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL

2.2. 클리에어의 Coronavirus 살균 (Virucidal) 효능 평가

본 시험은 클리에어 희석액을 준비하여 시험 대상 Human Coronavirus 229E (10<sup>5</sup> TCID, 10<sup>4</sup> TCID) 와 혼합한후 상온에서 5분, 10분, 30분, 60분 처리하여 반응하였다. 중화제 (10% FBS)로 10배 희석 후 MRC-5 세포에 감염 후 바이러스에 의한 세포 병변 현상을 관찰하였다. 이때 대조군으로는 일반 생리식염수를 사용하였다.

시 험 결 과

Human Coronavirus(HCoV-229E (10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub> )

제품명 (성분)	희석배수	반응 시간 (분)				대조군	
		5	10	30	60	양성	음성

클리에어	10배	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	4/4
	100배	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	4/4
	200배	2/4	2/4	4/4	3/4	0/4	4/4

## 시 험 결 과

### Human Coronavirus(HCoV-229E ( $10^5$ TCID<sub>50</sub> )

제품명 (성분)	희석배수	반응 시간 (분)				대조군	
		5	10	30	60	양성	음성
클리에어	10배	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	4/4
	100배	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	4/4
	200배	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4

5분 10분 30분 60분 + - 클리에어

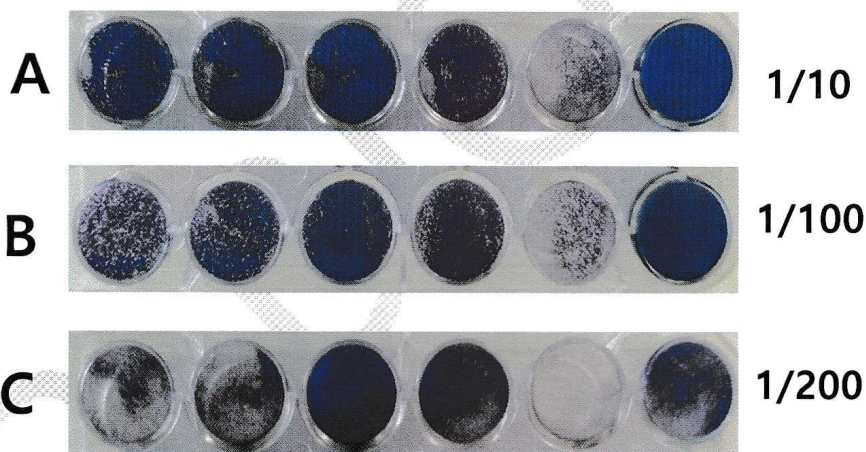


그림2. 클리에어의 시간대별 Human Coronavirus 229E 에 대한 소독제 효능

A: Human Coronavirus 229E  $10^4$ TCID<sub>50</sub>에 대한 클리에어 1/10 희석액 소독제 효능 평가  
 B: Human Coronavirus 229E  $10^4$ TCID<sub>50</sub>에 대한 클리에어 1/100 희석액 소독제 효능 평가  
 C: Human Coronavirus 229E  $10^4$ TCID<sub>50</sub>에 대한 클리에어 1/200 희석액 소독제 효능 평가

**결과:** 시험에 이용된 클리에어는 Human Coronavirus (HCoV-229E)에 대한 살균  
 력시험 결과 100배 희석 농도액까지 5분처리에 99.99% 사람코로나 사멸 효능을  
 보였음.



### 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
- (7) 외용소독제 (의약외품) 효력평가법 가이드라인 2014.8. 식품의약품안전평가원
- (8) 살균. 소독제 효능시험방법 자료집 2018. 12. 국립환경과학원