

3180332

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개(), 발간등록번호(O)

가축질병대응기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003194-01

환경독성 기준 재정립 최종보고서
AI·구제역 소독제 유효성 ,

2019

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

AI·구제역 소독제 유효성, 환경독성 기준 재정립

2020.07.17.

주관연구기관 / (주)크로엔
협동연구기관 / 농림축산검역본부

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “AI·구제역 소독제 유효성, 환경독성 기준 재정립”(개발기간 : 2018. 04. 26 ~ 2019. 12. 31) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 17.

주관연구기관명 : (주) (대표자)

협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자)

참여기관명 : 주식회사 카브 (대표자)



주관연구책임자 : 전 태 원

협동연구책임자 : 정 우 석

참여기관책임자 : 윤 하 나

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	3180332	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.26.- 2019.12.31	단 계 구 분	(2차년도)/ (2차년도)
연구사업명	단 위 사 업	농림식품연구개발사업			
	사 업 명	가축질병대응기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	AI·구제역 소독제 유효성, 환경독성 기준 재정립			
	세부 과제명	AI·구제역 소독제 환경독성 기준 재정립			
연구책임자	전 태 원	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 17명 내부: 17명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:245,000천원 민간:81,667천원 계:326,667천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)크로엔 일반독성팀			참여기업명 (주)크로엔 주식회사 카브	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: 주식회사 카브			연구책임자: 윤하나	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품중	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 국내외 소독제의 유효성 및 환경평가 기준 비교분석
 - 미국, 영국 등 축산 선진국의 소독제 유효성과 환경평가 기준 분석을 토대로 국내 실정에 맞는 기준안 제시
- AI,구제역 바이러스 차단 방역에 활용 가능한 소독제 평가 및 선정기준 제시
 - 대상 질병별(AI, 구제역) 사용 용도별(인체, 차량, 축사, 철새도래지 등)를 고려한 소독제 효능 실험
 - 국내외의 환경독성시험 지침을 바탕으로 한 소독제의 환경독성(자연환경에 미치는 영향) 평가 (수생환경 독성시험으로서 유효성분에 대해 어류, 수생 무척추동물 및 녹조류 시험 수행).
- AI,구제역 발생 시 사용 대상, 환경독성을 고려한 소독제 추천 매뉴얼 개발
- 기술이전을 통한 소독제의 유효성, 독성평가 대행 사업 추진
- 내동형 친환경 소독제의 개발 및 사업화
- 스프레이 코팅 소독제의 유효성 평가 기준안 마련 및 상용화

보고서 면수
105

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 방역현장 및 농가에서 AI 및 구제역 예방 또는 방제시 사용시기, 용도, 목적에 따라 소독제의 유효성과 위해성을 종합적으로 판단해서 적합한 소독제 선정이 가능하도록 과학적 근거에 따른 기준안 제시</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 국내외 소독제의 유효성 및 환경평가 기준 비교분석 - 미국, 영국 등 축산 선진국의 소독제 유효성과 환경평가 기준 분석을 토대로 국내 실정에 맞는 기준안 제시</p> <p>○ AI, 구제역 바이러스 차단 방역에 활용 가능한 소독제 평가 및 선정기준 제시 - 대상 질병별(AI, 구제역) 사용 용도별(인체, 차량, 축사, 철새도래지 등)를 고려한 소독제 효능 실험 - 국내외의 환경독성시험 지침을 바탕으로 한 소독제의 환경독성(자연환경에 미치는 영향) 평가 (수생환경 독성시험으로서 유효성분에 대해 어류, 수생 무척추동물 및 녹조류 시험 수행).</p> <p>○ AI, 구제역 발생 시 사용 대상, 환경독성을 고려한 소독제 추천 매뉴얼 개발</p> <p>○ 기술이전을 통한 소독제의 유효성, 독성평가 대행 사업 추진</p> <p>○ 내동형 친환경 소독제의 개발 및 사업화</p> <p>○ 스프레이 코팅 소독제의 유효성 평가 기준안 마련 및 상용화</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 겨울철 방역 현장에 적용할 수 있는 내동형 친환경 소독제 사용 매뉴얼 개발</p> <p>○ 스프레이형 코팅 소독제의 효능평가에 대한 매뉴얼 개발</p> <p>○ 새로운 기준안을 바탕으로 한 효능 재 인증 작업의 토대 마련</p> <p>○ 소독수의 환경독성 평가를 통해 유실 소독수에 대한 국가적 우려 저감</p> <p>○ 농림식품검역본부의 소독수 유효성 및 환경독성 기준에 대한 개정안 제시</p> <p>○ 개정안을 바탕으로 한 소독제 효능평가 및 환경독성 평가의 사업화 모델 구축</p> <p>○ 엄격한 소독제 인증을 통한 국내 소독제 인증 시장의 글로벌화</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>소독제 선정</p>	<p>조류인플루엔자</p>	<p>구제역</p>	<p>환경독성</p>	<p>유효성</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Disinfectant selection</p>	<p>Avian influenza</p>	<p>Foot and mouth disease</p>	<p>Environmental toxicity</p>	<p>Effectiveness</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	16
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	98
4. 연구결과의 활용 계획 등	102
붙임. 참고 문헌	

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

구분	내용
최종 목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외 소독제의 유효성 및 환경독성평가 기준 비교분석 <ul style="list-style-type: none"> - 축산 선진국의 소독제 유효성 및 환경독성 평가방법 수집 - 국내 소독제의 유효성과 환경독성 평가방법 분석 - 현재 국내에서 문제되고 있는 유효성과 환경독성 평가방법에 대한 개선안 제시 - 문헌조사 및 사전 실험을 통해 개발한 효능평가 및 환경평가 시험의 적정성 평가 ○ AI,구제역 바이러스 차단 방역에 활용 가능한 소독제의 효능 및 환경독성평가 <ul style="list-style-type: none"> - 대상 질병별(AI, 구제역) 사용 용도별(인체, 차량, 축사, 철새도래지 등)를 고려한 소독제 효능 실험 평가 - AI,구제역 바이러스를 이용한 온도 조건별, 반응 시간별 소독제 효능 평가실험 진행 - 가장 많이 판매되는 소독제와 대표적 제형을 중심으로 한 위해성 및 환경독성 실험 진행 ○ 소독제 효능평가와 환경평가 기준안을 바탕으로 한 소독제 매뉴얼 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 겨울철에 상황별 (인체, 차량, 축사, 철새도래지 등)로 이용할 수 있는 소독제 등급 체계 구성 - 구제역, AI바이러스 각각에 대한 상황별 소독제 이용 매뉴얼 개발 ○ 내동형 친환경 소독제의 개발 및 사업화 ○ 스프레이 코팅 소독제의 유효성 평가 기준안 마련 및 상용화
세부 목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내외 소독제의 환경평가 기준 비교분석(1세부: (주)크로엔) <ul style="list-style-type: none"> - 축산 선진국의 소독제 환경독성 평가방법 수집 - 국내 소독제의 환경독성 평가방법 분석 - 현재 국내에서 문제되고 있는 위해성과 환경독성 평가방법에 대한 해결책 제시 ○ AI, 구제역에 이용되는 소독제의 환경독성평가 진행(1세부: (주)크로엔) <ul style="list-style-type: none"> - 국내, 국외 기준안을 종합하여 개선된 환경독성평가 실험법 정립 - 가장 많이 시판되는 소독제를 중심으로 한 환경독성 실험 진행 ○ 국내외 소독제의 유효성 평가 기준 비교분석(위탁: (주)카브)

- 축산 선진국의 소독제 유효성 평가방법 수집
- 국내 소독제의 유효성 평가방법 분석
- 인체, 차량, 축사, 철새도래지 상황을 모사한 소독제 효능평가 선행실험 실시

○ **고병원성, 저병원성 AI 바이러스 방역에 활용 가능한 소독제 효능 평가기준 개선(위탁: (주)카브)**

- 문헌 조사를 통한 개선된 유효성 평가실험법 도입
- AI 바이러스를 이용한 온도 조건별 소독제 효능 평가실험 진행
- AI 바이러스를 이용한 반응 시간별 소독제 효능 평가실험 진행
- AI 바이러스를 이용한 적용 대상별(인체, 차량, 축사, 철새도래지) 소독제 효능 평가실험 진행

○ **구제역 바이러스 방역에 활용 가능한 소독제 효능평가실험(협동: 농림축산검역본부)**

- 문헌 조사를 통한 개선된 유효성 평가실험법 도입
- 구제역 바이러스를 이용한 온도 조건별 소독제 효능 평가실험 진행
- 구제역 바이러스를 이용한 반응 시간별 소독제 효능 평가실험 진행
- 구제역 바이러스를 이용한 적용 대상별(인체, 차량, 축사, 철새도래지) 소독제 효능 평가실험 진행

○ **소독제 효능평가와 환경평가 기준안을 바탕으로 한 소독제 매뉴얼 개발(협동: 농림축산검역본부/위탁: (주)카브 공동추진)**

- 상황별 (인체, 차량, 축사, 철새도래지)로 이용할 수 있는 소독제 등급 체계 구성
- 농림축산검역본부의 환경평가, 유효성 평가 기준에 대한 개정안 추진

○ **내동형 친환경 소독제의 개발 및 사업화(위탁: (주)카브)**

- 내동형 친환경 소독제의 개발을 통해 사업화 모델 구축
- 소독제의 효능 평가에 있어 제 3기관의 평가를 함께하여 객관성 획득

○ **스프레이 코팅 소독제의 유효성 평가 기준안 마련 및 상용화(위탁: (주)카브)**

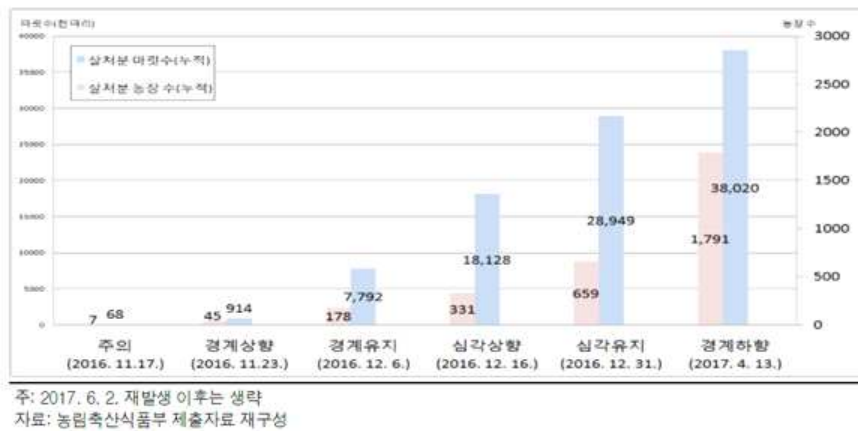
- 새로운 제형의 소독제에 대한 평가법을 제안하고, 국내특허 획득

나. 연구개발의 필요성

(1) 연구 배경 및 필요성

(가) 국내 조류인플루엔자 및 구제역 발생 현황

- ① 매년 겨울철마다 국내에서 구제역 혹은 조류인플루엔자의 발생이 나타나고 있으며 국, 내외적으로 큰 이슈를 불러일으키고 있음.
- ② 고병원성 조류 인플루엔자(AI)의 경우, 1996년 중국 광둥에서 발생을 시작으로 현재까지 중국을 포함한 동남아 지역에 지속적으로 발생하고 있으며, 우리나라의 경우도 2003년부터 올해까지 총 7 차례에 걸쳐서 발생하여 막대한 경제적 피해를 초래하였음.
- ③ 2016년 11월부터 2017년 4월까지 발생한 AI는 차량과 사람의 출입이 빈번한 대규모 산란계 및 오리농장에서 집중적으로 발생했으며, 418개 농장에서 가금류 총 3,907만 마리가 살처분되는 등 사상 최대의 피해규모를 기록함. (그림 1)



<그림 1. 2017년 AI 위기별 살처분 현황_농림축산식품부>

- ④ 구제역의 경우 1911년 처음 국내 발생 후 2000년대 이후로 9건이 발생했으며, 광주 및 전남을 제외한 전국에서 발생함. 재정 소요 금액은 살처분 및 매몰비용, 살처분 보상비용, 생계안정비용, 가축수매비용, 방역비용 등이 포함되어 있으며 2016년 까지 한국에서 구제역 때문에 소모된 비용만 3조2883억 원임. (표 1)

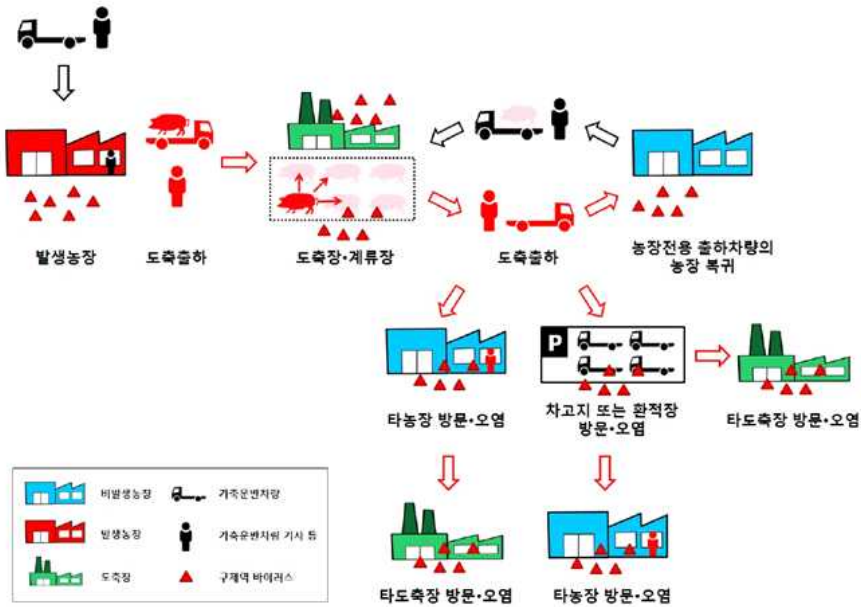
발생시기	발생지역	죽은		발생원	살처분	재정소요	비고
		소	돼지				
1911년		10마리					최초국내발생
1918년		4,899마리					
1934년		2마리					몰락
2000년 5월 24일 ~ 2000년 6월 15일	경기도 의주	81마리(122)		소형	2,214마리(182농가)	2428억	대형차살처분(단양 500마)
2002년 5월 24일 ~ 2002년 6월 23일	경기도 양주, 용인, 양평, 충북 단양	19마리(12)		소형	160,192마리(162농가)	1988억	대형차살처분(소 양평 800, 돼지 양평 8마)
2010년 1월 24일 ~ 2010년 1월 29일	경기도 화성, 인천	29마리(62)		소형	8,968마리(88농가)		
2010년 4월 14일 ~ 2010년 5월 4일	인천 강화, 경기도 고양, 충청남도 아산시	52마리(72)	9마리(12)	소형	88,822마리(88농가)	13800	
2010년 11월 28일 ~ 2011년 4월 21일	경북 경주, 강원 양양, 전남 진안, 전북 무주, 경북 울진, 제주 고성	347마리(52)		소형			
2014년 7월 23일 ~ 2014년 9월 4일	경북 경주, 강원 양양, 전남 진안, 전북 무주, 경북 울진, 제주 고성	49마리(72)		소형			
2014년 12월 8일 ~ 2015년 4월 28일	인천 강화, 경기도 고양, 충청남도 아산시, 충청북도 옥천, 강원 양양, 전남 진안, 전북 무주, 경북 울진, 제주 고성	1,000마리(1,000)		소형			
2016년 11월 17일 ~ 1월 23일	경북 경주, 강원 양양, 전남 진안, 전북 무주, 경북 울진, 제주 고성	3,907마리(3,907)		소형			
2017년 2월 25일 ~ 2017년 2월 19일	경북 경주, 강원 양양, 전남 진안, 전북 무주, 경북 울진, 제주 고성	39마리(52)		소형			대형차 살처분

- 2000년대 이후 9건 발생
- 광주광역시, 전남 지역제외 전국 발생
- O형, A형 혈청형
- 20억 1천만 마리 살처분
- 재정소요 3조 3천억 원

<표 1. 국내 구제역 발생 현황>

(나) AI.구제역 소독제 유효성평가 기준 재정립의 필요성

- ① 바이러스 자체가 공기전파가 가능하기도 하지만 주요 전파 경로는 차량, 사람 등의 매개체를 통한 전파가 가장 많았음. 이를 해결하기 위한 방안으로 적절한 상황에 소독제를 적용하는 것이 필수적임.(그림 2)



<그림 2. 도축 출하와 관련된 바이러스 전파 모식도_농림축산검역본부>

- ② 매년 수 천톤의 소독제를 사용해 차단방역을 실시하지만 결과로 매년 같은 피해양상을 보였으며, 소독제의 효능에 관한 사회적 의구심이 증대됨. 이를 종식하기 위해 국가적으로 축산용 소독제의 전수조사를 실시함.
- ③ 농림축산검역본부 고시 제2016-29호에 고시된 “소독제 효력지침”에 따라 실험을 진행한 결과 실제 소독제의 효능은 큰 문제가 없는 것으로 판명 됨.
- ④ 평가 방법은 경수, 유기물 조건아래서 소독제를 혼합하고 4°C에서 30분간 소독제와 바이러스를 반응 하여 바이러스 역가 측정결과 ml당 10⁴배 이상의 불활화가 확인된 희석배수를 유효하다고 판정하고 있음.
- ⑤ 그러나 이 실험 조건은 한 겨울의 낮은 온도조건을 반영하지 못했으며, 온도가 낮아질수록 소독제의 소독효과가 떨어지는 점을 감안 한다면 실제 소독 효과를 제대로 평가하지 못했음을 알 수 있음.
- ⑥ 2017년 11월에 감사원에서 진행된 조류 인플루엔자 감사 보고서에 따르면, 실제 야외 상황을 모사한 소독 반응 조건인 온도 -10°C, -5°C, 10°C, 접촉시간 1분,5분,15분 등 추가 조건을 도입하여 실험 한 결과 권장하는 희석배수보다 더 높은 농도로 소독제를 사용해야 적절한 효과를 보이는 것으로 확인됨.(표 2)

소독제 효력시험 결과

1. 효력시험대상 소독제

제품명	분류	권장희석배수 [유기물(고) 조건]	대상병원체
ㄱ	산화제	1:200	저병원성 시 바이러스(H9N2)
ㄴ	산성제	1:200	
ㄷ	알데하이드	1:500	

2. 효력시험 결과

시험조건		1차 시험		2차 시험		비고
		ㄱ (1:200)	ㄴ (1:200)	ㄴ (권장희석배수의 2배 1:100)	ㄷ (1:500)	
4℃	30분	5.7 ⁹⁾	5.7	-	6.1	대조군의 수치는 시험마다 다름
-6℃	1분	5.9	3.8	5.5	2.0	

<표 2. 표준시험조건과 낮은온도조건에서의 소독효과
비교_농림축산검역본부 제출자료>

- ⑦ 현재까지 등록된 축산용 소독제중 겨울철 조건을 고려하여 효력시험이 인증된 제품은 없음.
- ⑧ 소독제를 이용한 방역은 가축질병을 제어하는 가장 기본적인며 효과적인 방법임. 현장에 적용했을 때에도 동일한 효능을 보일 수 있도록 농림축산검역본부의 표준 시험 조건에 대한 개정안이 필수적임.
- ⑨ 현재 우리나라에서 소독제를 등록하기 위한 절차로 업체 및 시험기관에서 효능 평가 실험을 진행해야 함. 시험기관은 수의과 대학 등 공인시험검사기관을 지시하고 있음. 그러나 기관들마다 실험 방법이 조금씩 다르고 실제 실험자에 관한 검증이 제대로 이루어지고 있지 않은 실정임.
- ⑩ 소독제의 효능 평가에 있어서 Good Laboratory Practice (GLP) 혹은 준GLP 수준의 공인된 검사기관을 통해 효능을 검증하는 것이 중요하며 범제화 시킬 필요가 있음(그림 3)



<그림 3. 임상시험 실험실 승인 주요 개념 요약도>

(다) AI.구제역 소독제의 환경독성평가 기준 제정립의 필요성

- ① 구제역이나 AI와 같은 재난형 전염성 질병이 발발하면 전국적으로 소독제를 사용하게 됨. 2010년 구제역 발병시 소독제 사용 실태를 살펴보면 방역 소독제의 종류는 176종이며, 사용량은 경상북도122톤, 충청북도 984톤, 충청남도 388톤, 경상남도 176톤, 경기도 1,150톤, 전라남도 895톤, 강원도 94톤, 인천광역시 84톤, 울산광역시 47톤, 전라북도 40톤, 서울특별시 12톤, 부산광역시 7톤, 대구광역시 6톤이었음. (그림 4)



<그림 4. 전국 지자체 방역 소독제 사용량(단위: 톤)지도_환경부>

- ② 이용되는 방역소독제의 90%는 도로변에, 나머지는 축사 및 구제역 발생지 부근에 집중 살포되었고 매몰지에는 생석회가 다량 살포되었음. 이렇게 단기간 안에 많은 양의 소독제가 자연계로 흘러들어간다면 장기적으로 봤을 때 환경에 큰 영향을 줄 수 있을 것으로 판단됨. (그림 5)



<그림 5. 광범위하게 살포되고 있는 소독제>

- ③ 현 동물용의약외품의 안전성·유효성 심사에 관한 규정은 제품의 특성에 따라 자료의 일부 또는 전부를 면제할 수 있으며(5조2항), 이미 허가된 바 있는 품목과 유효성분 등의 종류가 같은 경우(제3조) 유효성분에 대한 독성시험자료를 기존의 인체·환경독성 자료로 갈음하는 경우가 다수임.
- ④ 그러나 같은 유효성분일지라도(예: 4가 암모늄) 다양한 화학식을 가진 화학물이 있으며, 실제 소독제 원액 또는 희석 농도가 인체·환경에 적용되는 것을 고려하지 않음. 여러 가지 유효성분이 혼합된 소독제의 경우, 각 성분에 대한 독성시험자료를 기존 연구로 갈음하게 되면 혼합된 최종 제품의 독성에 대한 평가가 이루어지지 않는 맹점이 있음.
- ⑤ 또한 동물용의약외품의 안전성·유효성 심사에 관한 규정상 별도의 환경 독성 시험에 관한 내용은 없는데, 소독제의 다량 사용에 따른 환경의 노출확률도 높아짐에 따라 기본적인 환경독성 실험에 관한 평가가 이루어져야함.



<그림 6. 차단 방역시 소독제에 노출되는 사람들>

- ⑥ 이와 같은 이유들을 종합하여 고려할 때, 사용 중인 소독제 및 소독 제제에 관한 환경독성 평가가 절실한 시점임.

다. 연구개발 범위

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2018)	구제역, AI에 적용 가능한 소독제 환경독성 기준 재정립	국내외 소독제의 환경 평가 기준 비교분석	- 축산 선진국의 소독제 환경독성 평가방법 수 집 및 분석	- 국내외 환경독성 평가 방법에 대한 고찰 및 개선방안 제시
		AI,구제역 바이러스 차단 방역에 활용 가능한 소독 제의 환경독성평가	- 대표적 제형을 중심으 로한 소독제 선정 및 어류급성독성시험 수행	- 어류독성실험 진행 완 료 및 고찰
	국내외 소독제의 유효성 평가기준 비교 분석	한국, 미국, 영국 및 유럽 의 소독제 유효성 평가방 법 수집	- 한국, 미국 영국에서 고시하는 소독제 유효성 평가법 수집	- 소독제 유효성 평가를 위한 실험 Protocol확보 미국: ASTM 2197 영국: BS EN14675:2015 BS EN 17111
		국내와 해외의 소독제 유효 성 평가방법 비교분석	- 국내와 미국, 영국의 소독제 유효성 평가법에 대해 비교분석	- Disk carrier test에 대해 집중 분석
	조류인플루엔 자 방역에 활용 가능한 소독제 효능평가기준 개선을 위한 선행실험 진행	미국 EPA 기준인 Disk carrier test를 모델로 한 소독제 효능 평가 선행실험	- 스테인레스 스틸의 Disk 제작과 바이러스 재분리 양에 대해 평가함	- 실험용 조류 인플루엔자 바이러스 확보 및 선행실험
		소독제의 적용 재질별 소 독효능 검증을 위한 선행 실험	- 방역현장을 모사한 다양한 재질의 실험대상 확보	- Disk carrier test에 이용할 수 있는 다양한 재질의 Disk 제작
	구제역 바이러스 방역에 활용 가능한 소독제 효능평가 선행실험 진행	국내외 소독제의 유효성 평가(영하 조건)를 위한 장치 개발	- 영하 30℃까지 온도 설 정이 가능하고 냉동고 내 에서 실험자가 직접 조작 가능한 “저온 소독제 효 력시험장치” 개발	- 현재 농림축산검역본부 구제역백신연구센터 BL3 연구시설에 “저온 소독제 효력시험장치” 설치함
		Disk를 이용한 소독제 효 력 평가를 위한 고역가의 바이러스 균주 확보 및 세 포주 관리	- LFBK 세포주를 이용 한 바이러스의 배양 및 역가 확인 - 계대 배양을 통한 고역 가의 바이러스 확보	- 농림축산검역본부 구제 역백신연구센터 BL3 초 저온냉동고에 바이러스 보관

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2019)	조류인플루엔 자 방역에 활용 가능한 소독제 효능평가기준 개선을 위한 실험 진행	Disk 재질별 소독제 유효성 평가 실험	- 1차년도에 정립한 소독제 유효성 평가법을 적용하여 Disk 재질별 소독제 유효성 평가 실험 진행	- 소독제의 재형, Disk의 재질별 소독효과 확인
		단시간 내의 소독제 유효성 평가 실험	- 1차년도에 정립한 소독제 유효성 평가법을 적용하여 10분이내의 소독제 유효성 평가 실험 진행	- 1분, 5분, 10분에서의 소독제 권장 희석배수 제시
		저온 조건에서의 소독제 유효성 평가 실험	- 1차년도에 정립한 소독제 유효성 평가법을 적용하여 4℃, 0℃, -5℃에서의 소독제 유효성 평가 실험 진행	- 4℃, 0℃, -5℃에서의 소독제 권장 희석배수 제시
		철, 알루미늄에 대한 소독제의 금속 부식성 실험	- 소독제로 인해 생기는 차량의 부식성을 확인하기 위한 실험 진행	- 소독제 재형별 금속 부식성 정도 확인
	소독제의 개발	내동형 친환경 소독제 개발	- 얼지 않으면서 저온에서도 효과를 보일 수 있는 소독제 개발	- 관련 기술 특허 출원
	스프레이 코팅 소독제 평가 기준안 마련	새로운 제형의 소독제 평가 기준안 정립	- 현재 스프레이 코팅형 소독제에 대한 평가 기준안이 없으므로 이에 대한 기준안 정립	- 검역원에서 코팅형 소독제에 대한 평가 실험 진행

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 국내외 소독제의 환경독성평가 기준 비교 분석

(주관연구기관 : (주)크로엔)

(1) 1차년도 연구수행 내용 및 결과

(가) 국내외 소독제의 유효성 평가 기준의 비교

① 축산 선진국의 소독제 환경독성 평가방법 수집 (일본 및 EU의 소독제 환경독성 평가 가이드라인 수집 및 분석)

- ㉠ 일본: 動物用医薬品の環境影響評価ガイドライン解説書 [동물용의약품의 환경영향평가 지침 해설서]
- ㉡ EU: Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal product in support of the VICH guidelines GL6 and GL38 [VICH 가이드라인 GL6, GL38에 따른 동물용의약품 환경영향평가 가이드라인]

② 국내 소독제의 환경독성 평가방법 분석

- ㉢ 2017년 1월 농림축산검역본부에서 고시안의 “동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험 지침”을 바탕으로 문헌 분석을 진행함.
- ㉣ 현재 우리나라 소독제 등록 절차 중 소독제에 관해 환경평가를 필수로 하지 않고 있으므로 “동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험 지침”이 실제 소독제의 환경독성평가 시험을 하는데 있어서 얼마만큼 효용성이 있을지에 대해 고찰함.
- ㉤ 현 동물용의약품의 안전성·유효성 심사에 관한 규정은 제품의 특성에 따라 자료의 일부 또는 전부를 면제할 수 있으며(5조2항), 이미 허가된 바 있는 품목과 유효성분 등의 종류가 같은 경우(제3조) 유효성분에 대한 독성시험자료를 기존의 인체·환경독성 자료로 갈음하는 경우가 다수임.
- ㉥ 그러나 같은 유효성분일지라도(예: 4가 암모늄) 다양한 화학식을 가진 화학물이 있으며, 실제 소독제 원액 또는 희석 농도가 인체·환경에 적용되는 것을 고려하지 않음. 여러 가지 유효성분이 혼합된 소독제의 경우, 각 성분에 대한 독성시험자료를 기존 연구로 갈음하게 되면 혼합된 최종 제품의 독성에 대한 평가가 이루어지지 않는 맹점이 있음.
- ㉦ 또한 동물용의약품의 안전성·유효성 심사에 관한 규정상 별도의 환경 독성 시험에 관한 내용은 없는데, 소독제의 다량 사용에 따른 환경의 노출확률도 높아짐에 따라 기본적인 환경독성 실험에 관한 평가가 이루어져야함.
- ㉧ 이와 같은 이유들을 종합하여 고려할 때, 사용 중인 소독제 및 소독 제제에 관한 환경독성 평가가 절실한 시점임.

③ AI 구제역 소독제 환경독성 기준 재정립

㉨ 국내 동물용의약품 (소독제 포함)의 환경독성 항목 조사

AI, 구제역 소독제를 포함하는 동물용의약품 등은 약사법 제 85조 및 의료기기법 제 46

조에 따라 동물용의약품의 국가 출하 승인에 관한 사항과 동물용의약품, 동물용의약외품 및 동물용의료기기의 제조, 수입, 판매에 관한 사항을 규정함을 목적으로 하는 [농림축산식품부령] 제324호 “동물용 의약품등 취급규칙” 제7조 “동물용의약품등의 품목에 대한 안전성, 유효성 등의 심사”를 받아야 하며, 해당 자료에 대한 면제범위와 심사기준에 관한 세부 사항은 검역본부장 또는 수산과학원장이 정하도록 규정되어 있다.

동물용의약품등의 품목에 대한 안전성, 유효성 등의 심사 자료 중 “4호 독성에 관한 자료”가 포함되어 있고, 검역본부장 또는 수산과학원장이 정한 세부규칙은 위임행정규칙으로 규정되어 있다.

㉞ 위임행정규칙 검토

[동물용의약품등 독성시험 지침]

약사법 제31조, 제42조, 제85조 제1항 동물용의약품등취급규칙 제7조, 제1항, 제2항 “동물용의약품등 안전성 유효성 심사에 관한 규정” 제7조 제1항 제4호에 따라 15가지의 위임행정규칙을 정하고 있으며, 위임행정규칙 중 동물용의약품등의 독성시험에 관한 세부사항을 정함을 목적으로 하는 “동물용의약품등 독성시험지침”이 규정되어 있다.

“동물용의약품등 독성시험 지침”을 보면 급성독성시험, 아급성 만성독성시험, 생식독성시험, 최기형성시험, 1세대 또는 후세대 생식독성시험, 변이원성시험, 암원성시험 등의 시험항목이 정의되어 있으나, **환경독성시험에 대한 항목은 포함되어 있지 않다.**

[동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정]

동물용의약품등 취급규칙 제5조, 제7조, 제16조 및 제46조의 규정에 의하여 동물용의약품, 동물용의약외품 및 동물용의료기기의 제조 또는 수입품목허가 시 첨부되는 안전성 유효성 심사에 필요한 세부사항을 정함을 목적으로 하는 “동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정”이 위임행정규칙에 포함되어 있다.

“동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정” 제5조 (동물용의약품등의 첨부자료의 종류와 범위)에 심사자료의 범위가 규정되어 있으며, 4호 독성에 관한 자료가 포함되어 있으나, 급성독성, 아급성독성, 만성독성, 생식독성, 변이원성, 암원성, 미생물학적독성, 국소독성, 면역독성, 흡입독성 등의 특수독성 항목이 규정되어 있고 **환경독성은 포함되어 있지 않다.**

동 위임행정규칙 제5조 (동물용의약품등의 첨부자료의 종류와 범위) 심사자료 7호 잔류에 관한 자료 중 7-3호 자연환경에 미치는 영향 평가자료가 명시되어 있다.

[동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험지침]

약사법 제31조, 제42조, 제85조 제1항 동물용의약품등취급규칙 제7조 제1항, 제2항 “동물용의약품등 안전성 유효성 심사에 관한 규정” 제7조 제1항 제7호에 따라 제출되는 “동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험지침”에 관한 세부사항을 정하기 위한 목적으로 위임행정규칙이 규정되어 있다.

위임행정규칙 내 [별표] 동물용의약품등 환경영향평가 시험방법이 수록되어 있다. 동물용의약품등 환경영향평가는 제1상과 제2상으로 구분되며, 제1상에서 동물용의약품등의 용법

용량에 근거한 환경유입농도 및 직접적 유입유무 등 환경노출 가능성을 일련의 의사결정 과정을 통하여 **총 19 문항의 질의를 통한 서면평가를 실시한다**. 제2상은 환경영향평가 시험으로 제1단계 단기시험과 제2단계 장기시험으로 구분되며 단계적 시험절차에 따라서 실시한다.

제1단계에서는 동물용의약품등이 환경으로 배출될 때 균일하게 분포한다는 가정하에 실시하며, 환경노출 결과에 근거한 위해성평가로서 제한된 영향을 평가하고, 제1단계에서 환경위해성이 예측되면, 환경영향평가 결과를 보정하기 위하여 제2단계 장기시험을 실시한다.

㉔ 검토결과

AI, 구제역 소독제는 동물용의약품의 범주에 포함되어 약사법 제85조 및 의료기기법 제46조에 따라 [농림축산식품부령] 제324호 “동물용 의약품등 취급규칙” 제7조 “동물용의약품등의 품목에 대한 안전성, 유효성 등의 심사”를 받아야 한다.

그러나, 검토결과 환경독성항목은 위임행정규칙 “동물용의약품등 독성시험 지침” 내 포함되어 있지 않으며, 위임행정규칙 “동물용의약품등 안전성, 유효성 심사에 관한 규정” 내 심사자료의 종류 중 독성에 관한 자료에도 포함되어 있지 않다.

동물용의약품등의 독성시험이 동물용의약품등이 적용대는 대상동물 및 대상동물에 적용을 통한 대사산물에 집중되어 있어서 독성시험항목 내 환경에 대한 위해성을 포함하고 있지 않은 것으로 판단된다. 이것은 옥외 도로변, 축사 및 질병발생지에 살포되는 소독제의 사용법에 대한 고려가 없는 것으로 단기간에 다량의 소독제가 자연환경에 직접 노출되는 용법에 근거한 환경독성의 평가 필요하다고 판단되며, 따라서 독성시험 항목 수생독성항목을 포함하여 기본적인 환경독성에 대한 안전성을 확인할 필요가 있다.

동물용의약품등의 안전성, 유효성 심사에 관한 규정에 의하여 제품의 특성에 따라 일부 또는 전체 심사자료의 면제가 가능하며, 이미 허가된 품목과 유효성분 등 종류가 동일한 경우, 유효성분에 대한 독성시험자료가 심사자료를 같음하기 때문에, 원칙적으로 유효성분 기준으로 심사자료가 준비되어 제품에 대한 독성 평가가 이루어지기 힘들다는 맹점이 있다.

위임행정규칙 “동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험지침” [별표] 동물용의약품등 환경영향평가 시험방법을 검토해보면, 수생독성시험의 경우 제2상 1단계 단기시험 중 환경독성시험 내 수행 항목으로 규정되어 있으며, 어류 1종, 수생 무척추동물 1종, 녹조류 1종에서 최소 3종의 생물종에 대한 시험을 권장한다고 명시되어 있으나, 단계적 검토를 통하여 필요하다고 판단되는 경우에만 실시한다는 제한사항이 있다.

또한, 지속적으로 환경 중 살포되는 소독제의 특성에 따른 2단계 장기 (만성) 독성시험에 대한 고려는 1단계 시험의 평가결과를 바탕으로 시험의 진행이 필요하다고 판단되는 경우 실시하도록 되어 있으나, 1단계 시험이 필수가 아닌 현재 상황에서 2단계에 대한

고려는 현실적으로 이루어지지 않고 있다고 판단된다.

본 연구에서 위임행정규칙 “동물용의약품등이 자연소독제 매뉴얼 개발환경에 미치는 영향 평가 시험지침” [별표] 동물용의약품등 환경영향평가 시험방법과 축산선진군 (일본, EU)에서 시행되는 환경영향평가 방법을 비교하여, 동물용의약품등의 환경영향평가 방법의 차이를 알아보고자 하였으며, 현행 소독제 심사 규정의 환경독성평가 영역의 실효성을 향상시킬 수 있는 법률 구조의 개선안을 제안하고자 함.

④ 동물용의약품등의 환경영향평가 시험지침 비교

	한국	일본	EU
지침명	농림축산검역본부 고시 [동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험지침]	動物用医薬品の環境影響評 価ガイドライン 解説書 [동물용의약품의 환경영향평가 지침 해설서]	Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal product in support of the VICH guidelines GL6 and GL38 [VICH 가이드라인 GL6, GL38에 따른 동물용의약품 환경영향평가 가이드라인]
구분	제1상 환경노출 가능성 평가 제2상 환경영향평가 시험	1상 환경 노출 정도 평가 2상 시험을 실시하여 위해성 평가	1단계(Phase 1) 환경 노출 정도를 추정 2단계(Phase 2) 환경 잔류물의 영향을 평가
1상 (1단계)	제1상 환경노출 가능성 평가 용법용량에 근거한 환경노출 가능성 평가 [평가 방법 : 1~19 문항에 대한 서면평가를 실시]	1상 환경 노출 정도를 평가, 기본적으로 시험의 실시를 수반하지 않는 서명평가 [평가 방법 : 1~19 질문에 대한 평가]	1단계 (Phase 1) 제품, 활성물질 및 기타성분에 대한 환경노출 가능성 평가 [평가 방법 : 1~19 질문으로 평가]
2상 (2단계)	제2상 환경영향평가 시험 제1단계(단기)시험 및 제2단계(장기)시험으로 구분	2상 시험을 실시하고, 위해성 평가 진행 A단계 단기영향 평가와 B단계 장기영향 평가로 구분	2단계 (Phase 2) 환경노출에 대한 상세한 평가 Tier A 어류 급성 독성 시험 (담수 및 해수) Tier B 장기 영향 평가 (해양)
기준	원칙적으로 유효성분 기준으로 시험을 실시	원칙적으로 유효성분을 기준으로 수행	시험수행기준이 명시되어 있지 않았으나 결과해석을 유효성분으로 함.
시험법	시험방법은 OECD 또는 ISO 가이드라인 준용	-	EIA에서 제시하는 ASTM의 어류 급성 독성 시험 시행 지침, EPA 어류 급성 독성 시험
환경독성 시험수행	제2상 1단계 중 환경독성시험 구분 1) 수생환경 독성시험 2) 육상환경 독성시험	제2상 A단계 1) 물리/화학적 특성 시험 2) 환경 거동 시험 3) 환경 영향 시험 (1) 수생	2단계(Phase 2) Tier A 1) 물리-화학적 특성 연구 2) 환경 거동 연구 3) Tier A효과 시험 (1) 수생 효과 연구 (2) 육상 효과 연구
수생독성 시험수행	제2상 1단계 단기(급성) 1)수행환경 독성시험 중 3종의 시험생물 권장 (어류, 무척추동물, 녹조류)	제2상 A단계 1) 광분해 시험 2) 해수 어류 급성 독성 시험 3) 똥파리 유충 시험 4) 쇠똥 구리 에벌레 시험 제2상 B단계 1)해수 갑각류 만성 독성 또는 번식 시험 2) 해수 어류 만성 독성 시험 3) 해수의 저서 무척추 동물 중 독성 시험	2단계(Phase 2) Tier A (급성) 2단계(Phase 2) Tier B (만성) 1) 해수 갑각류 만성 독성 2) 중서부 및 해양 무척 동물과 함께 퇴적물 관련 오염 물질의 독성 측정을 위한 표준 시험 3) 해양 및 강어귀 다모류에서의 퇴적물 독성 시험 4) 해양 저서 갯벌을 이용한 재생 마이크로 플레이트 기반 수명 주기 독성 시험

한국, 일본 및 EU의 “동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험지침” 비교결과, 공통적으로 단계적인 검토를 통하여 영향을 평가하고 있으며, 제1상 (1단계)에서 환경 노출 가능성에 대하여 문항에 대한 질의응답을 통한 서면으로 평가를 실시하고, 제2상 (2단계)에서 직접 시험을 수행하여 위해성 평가를 실시하고 있었다.

차이점을 살펴보면, 시험방법에서 국내는 OECD 및 ISO 시험방법을 준용하고 있었으나, EU는 EPA 기준을 따르고 일본에서는 시험방법에 대하여 명시되어 있지 않았다. 또한, 직접 시험을 수행할 경우, 국내와 일본에서는 원칙적으로 유효성분을 기준으로 실시하지만 EU에서는 기준에 대하여 명시되어 있지 않았다.

동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향 평가 시험지침의 경우, 축산선진군 (일본, EU)과 비교해 보았을 때, 평가 방법에서 차이점은 크지 않았다.

⑤ 국내 현행 법률 구조 및 제안

		현 행
농림축산식품부령		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: right;">[현 황]</p> <p>농림축산식품부령</p> <ul style="list-style-type: none"> 동물용 의약품등 취급규칙 <ul style="list-style-type: none"> 제7조 동물용의약품등의 품목에 대한 안전성 유효성 등의 심사 <ul style="list-style-type: none"> · 4호 독성에 관한 자료 <ul style="list-style-type: none"> · </div>
위임행정규칙		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>위임행정규칙</p> <ul style="list-style-type: none"> 2. 동물용의약품등 독성시험지침 → 환경독성 (수생) 항목 없음 4. 동물용의약품등 안전성 유효성 심사에 관한 규정 <ul style="list-style-type: none"> 제5조 동물용의약품등의 첨부자료의 종류와 범위 <ul style="list-style-type: none"> 4호 독성에 관한 자료 → 환경독성 (수생) 항목 없음 제5조 동물용의약품등의 첨부자료의 종류와 범위 <ul style="list-style-type: none"> 7호 잔류에 관한 자료 7.3호 자연환경에 미치는 영향 평가 자료 8. 동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향평가 시험지침 <ul style="list-style-type: none"> 별표. 동물용의약품등 환경영향평가 시험방법 <ul style="list-style-type: none"> 제1상 환경노출 가능성 평가 (서면평가) 제2상 환경영향평가 시험 <ul style="list-style-type: none"> 제1단계 단기 시험 <ul style="list-style-type: none"> 다. 환경독성시험 1)수생환경 독성시험 </div>
		제 안
농림축산식품부령		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p style="text-align: right;">[제안(안)]</p> <p>농림축산식품부령</p> <ul style="list-style-type: none"> 동물용 의약품등 취급규칙 <ul style="list-style-type: none"> 제7조 동물용의약품등의 품목에 대한 안전성 유효성 등의 심사 <ul style="list-style-type: none"> · 4호 독성에 관한 자료 <ul style="list-style-type: none"> · </div>
위임행정규칙		<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>위임행정규칙</p> <ul style="list-style-type: none"> 2. 동물용의약품등 독성시험지침 → 환경독성 (수생) 항목 추가 4. 동물용의약품등 안전성 유효성 심사에 관한 규정 <ul style="list-style-type: none"> 제5조 동물용의약품등의 첨부자료의 종류와 범위 <ul style="list-style-type: none"> 4호 독성에 관한 자료 제5조 동물용의약품등의 첨부자료의 종류와 범위 <ul style="list-style-type: none"> 7호 잔류에 관한 자료 7.3호 자연환경에 미치는 영향 평가 자료 8. 동물용의약품등이 자연환경에 미치는 영향평가 시험지침 <ul style="list-style-type: none"> 별표. 동물용의약품등 환경영향평가 시험방법 <ul style="list-style-type: none"> 제1상 환경노출 가능성 평가 (서면평가) 제2상 환경영향평가 시험 <ul style="list-style-type: none"> 제1단계 단기 시험 <ul style="list-style-type: none"> 다. 환경독성시험 1)수생환경 독성시험 </div>

⑥ AI, 구제역에 이용되는 소독제의 환경독성평가

가장 많이 시판되는 소독제의 대표적인 제형은 삼중염, 과초산+과산화수소, 알데히드, 4급암모늄, 복합 4급 암모늄, 차아염소산 등이 있으며, 제형별 대표 6종을 선정하여 환경독성평가의 일환으로 어류(잉어)급성독성시험을 진행함.

㉔ 제형별 소독제 6종 환경독성평가(어류급성독성) 시험 요약

시험목적	본 시험은 시험물질(소독제)의 어류 (잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험에서 나타나는 독성영향을 평가하고, 반수치사농도(LC ₅₀)를 산출하고자 수행하였다.
시험기준	“OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203, Fish, Acute Toxicity Test” (Adopted : July 17, 1992) “농약 및 원제의 등록기준” 농촌진흥청 고시 제 2018 - 20 호 (2018년 09월14일) “화학물질의 시험방법에 관한 규정” 국립환경과학원 고시 제2018 - 12 호 (2018년 04월 09일)
시험물질(제형별 소독제 6종) 및 선정근거	1. 제품 A (알데히드제제) 2. 제품 B (4급 암모늄+구연산) 3. 제품 C (과초산+과산화수소) 4. 제품 D (4급 암모늄) 5. 제품 E (염기제제-3중 염) 6. 제품 F (산화제제-염소계)
시험생물	어류 (잉어, <i>Cyprinus carpio</i>) OECD Guideline에 지정되어 있는 종으로, 어류급성독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 입수처 : 오창양어장 (충청북도 청원군 오창읍 중신리 331번지)
종합 결과, 고찰 및 결론	1. 제품 A 방역 시 권장희석배수 (AI-1:250, 구제역-1:100)를 농도로 환산 (AI: 4 mg/L, 구제역: 10 mg/L). 시험결과 96시간 반수치사농도(LC ₅₀)는 70.69 mg/L. 농도 환산 권장희석배수와 비교 시, AI 희석배수의 약 18배, 구제역 희석배수의 약 7배 높은 농도에서 LC ₅₀ 값이 도출. 2. 제품 B 방역 시 권장희석배수 (AI-1:150, 구제역-1:600)를 농도로 환산 (AI: 6.67 mg/L, 구제역: 1.67 mg/L). 시험결과 96시간 LC ₅₀ 은 9.87 mg/L. AI 희석배수의 약 1.5배, 구제역 희석배수의 약 6배 높은 농도에서 LC ₅₀ 값이 도출.

종합 결과, 고찰
및 결론 (계속)

3. 제품 C

방역 시 권장희석배수 (AI-1:1600, 구제역-1:600)를 농도로 환산 (AI: 0.625 mg/L, 구제역: 1.67 mg/L). 시험결과 96시간 LC₅₀은 13.87 mg/L. AI 희석배수의 약 22배, 구제역 희석배수의 약 8배 높은 농도에서 LC₅₀ 값이 도출.

4. 제품 D

방역 시 권장희석배수 (AI-1:50, 구제역-1:50)를 농도로 환산 (AI: 20 mg/L, 구제역 : 20 mg/L). 시험결과 96시간 LC₅₀은 12.65 mg/L. AI 희석배수의 약 0.6배, 구제역 희석배수의 약 0.6배 낮은 농도에서 LC₅₀ 값이 도출.

5. 제품 E

방역 시 권장희석배수 (AI-1:400, 구제역-1:1000)를 농도로 환산 (AI: 2.5 mg/L, 구제역: 1 mg/L). 시험결과 96시간 LC₅₀은 44.818 mg/L. AI 희석배수의 약 18배, 구제역 희석배수의 약 45배 높은 농도에서 LC₅₀ 값이 도출.

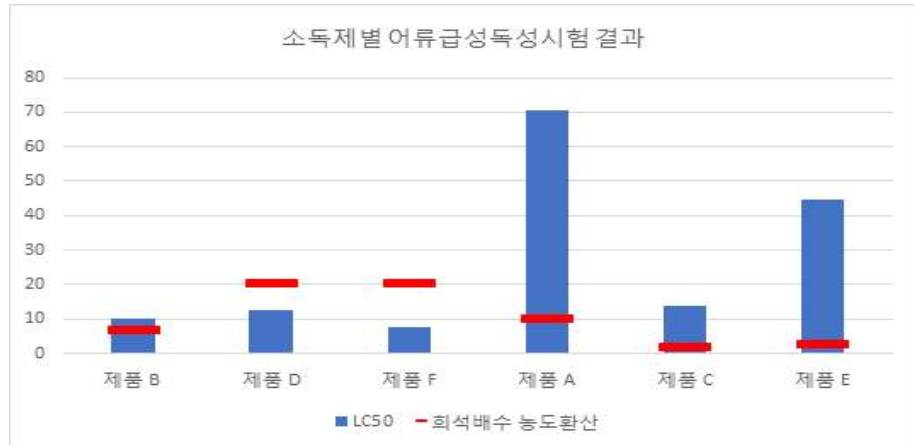
6. 제품 F

구제역 방역 시 권장희석배수 (1:50)를 농도로 환산 (구제역: 20 mg/L)(AI-정보 없음). 시험결과 96시간 LC₅₀은 7.731 mg/L. 구제역 희석배수의 약 2.6배 낮은 농도에서 LC₅₀ 값이 도출.

상기 결과로부터 6종의 제형별 소독제 중에서 대부분이 권장희석배수의 10배 이내로 진하게 사용할 경우 환경독성(어류 영향)을 야기할 가능성이 높을 것으로 사료되며, 특히 제품 D 및 제품 F은 권장희석배수가 이미 반수치사농도를 초과하므로 이 희석배수로 방역소독에 사용시 심각한 환경독성을 초래할 것으로 사료된다.

소독제	질병구분	권장 희석배수	농도환산 (mg/L)	시험결과 LC ₅₀ (mg/L)
제품 B	AI	1:150	6.67	9.87
	구제역	1:600	1.67	
제품 D	AI	1:50	20	12.65
	구제역	1:50	20	
제품 F	AI	-	-	7.73
	구제역	1:50	20	
제품 A	AI	1:250	4	70.69
	구제역	1:100	10	
제품 C	AI	1:1600	0.625	13.87
	구제역	1:600	1.67	
제품 E	AI	1:400	2.5	44.82
	구제역	1:1000	1	

<표 1. 소독제별 어류급성독성시험 결과 정리표>



<그림 1. 어류급성독성시험 결과 그래프>

국내에서 이용되는 방역소독제의 90%는 도로변에, 나머지는 축사 및 질병 발생지 부근에 집중 살포되고 있는 실정을 고려해 볼 때, 다음의 경우 더욱 심각한 환경오염을 야기할 수 있을 것이다.

- 권장 회석배수 보다 낮게 희석하여 고농도로 환경에 방출 될 때
- 방제시스템 없이 무분별하게 많이 사용하여 하천 등으로 무단 방류될 때
- 주로 겨울철에 발생하는 계절적 특징에 따라 여름철 대비 환경 농축이 진행될 가능성이 높음.

종합해 볼 때, 본 연구에서 선정한 제형별 대표 6종 소독제의 환경독성 평가 결과로부터 이들 소독제의 무분별한 사용이 환경독성을 초래할 수 있다는 개연성을 충분히 확인하였으므로, 방역소독제의 등록 시 환경독성평가 영역을 강화할 필요성이 있으며, 방법적으로 초기 단계에서 어류급성독성시험을 수행하여 1단계 영향을 평가한 후, 물벼룩, 조류 및 미꾸리 등의 생물에 미치는 환경독성 영향 평가 시험을 추가단계에서 진행하여 평가해야 할 것으로 사료된다.

소독제 제품명

1. 제품 A

시험성적서

□ 함료 □ 자체 ■ 제조

시험성적서

□ 함료 □ 자체 ■ 제조

품질관리팀

용 명	031001	규 드 번 호	
제 조 번 호	100%	제 조 / 의 료 부 서	
제 조 수 량	2018.02.10 / 2018.02.19	의 료 번 호	
제 조 / 의 료 일 자	2018.02.10 / 2018.02.19	검 체 제 치 일 자	2018.02.10
유 효 기 간	제조일로부터 24개월	제 취 량 / 제 취 차	1100ml /
우 선 순 위		시 험 기 준	KF, USP, JP, EP, CP, 고시 항기, 식약, 용약, 별규
<input checked="" type="checkbox"/> 보통 <input type="checkbox"/> 우선 <input type="checkbox"/> 최우선			

시 험 장 특	기 준	검 과 제 시 험 일	시 험 차
1. 성 상	백이 내색 나는 무색 투명한 액	적 합	2018.02.10
2. 확인시험	Glutaraldehyde가 확인되어야 함	적 합	2018.02.10
3. 비 중	1.000 - 1.100	1.009	2018.02.10
4. pH	2.70 - 3.70	3.14	2018.02.10
5. 내 용 량	100% 이상	적 합	2018.02.10
6. 할 당 량	Glutaraldehyde 100 mg/mL	103.77 mg/mL	2018.02.12

성 적 번 호 : 2018P-0078
 시 험 관 료 일 자 : 2018.02.12

Qualified

검 달 자 : 확인 자 : 부 서 장 :

제 자 :

상적번호 : 2018P-0078 에 의거하여
 위 제품의 출하를 승인합니다.

MSDS

**물질안전보건자료
(Material Safety Data Sheet)**

제 품 명	명 칭	CAS No.	Content %	위험성
주요 구성 성분	Glutaraldehyde	111-30-8	10%	Yes
	Purified Water		QS	

1. 화학제품과 회사에 관한 정보

가. 제품명 :
 나. 일반적인 특성 :
 - 화학물질명: 소독제
 다. 유해성 분류 : 자극성 물질
 라. 제품의 용도: 환자, 기구, 가족 등의 소독
 마. 제조자 정보 :
 바. 공급자/유용업자 정보: 제조자 정보와 동일
 사. 작성부서 및 이름:

2. 유해성, 위험성

가. 눈에 대한 영향 :
 - 부식성
 - 본 제품의 증기는 눈에 자극 또는 손상을 야기할 수 있음.
 - 본 제품에 눈 접촉 시 심각한 화상과 영구적 눈 손상을 야기할 수 있음.
 나. 피부에 대한 영향 :
 - 본 제품에 피부에 자극을 야기할 수 있으며, 발적, 가려움 또는 통증의 증상을 보일 수 있음.
 - 본 제품을 장기간 피부에 접촉 시 화상을 야기 할 수 있으며, 흡수 될 경우 전신적 영향을 줄 가능성이 있음.
 다. 흡입 시에 영향 :
 - 본 제품을 흡입 시 호흡기관 자극을 야기할 수 있으며, 기침, 호흡곤란의 증상을 보일 수 있음.
 - 가운뎃길 증 등 중한 자극을 야기할 수 있음.
 라. 섭취 시에 영향 :
 - 본 제품을 섭취 시 위장관 자극을 야기할 수 있으며, 오심, 구토 및 설사의 증상을 보일 수 있음.

2. 제품 B

시험·검사 성적서

수 신 :

시 험 명 칭	1		
제 조 일 자	2018-05-08	제 조 번 호	
제 조 국 가	KOREA, REPUBLIC OF / KOREA, KIN.	제 조 회사	
의 료 목 적	150(보관용/진료용) 내부용		

시 험 장 특	시 험 · 검 사 항 목	시 험 · 검 사 기 준	시 험 · 검 사 성 적
외관시험	색상	광투 투명한 무색 액체	확인됨
확인시험	확인시험	7% 염색액, 알콜용액에서 용해되어야 함	확인됨
용액시험	pH	4.0 이하	1.10
용액시험	내용량시험	100% 이상	100.0%
용액시험	H ₂ O ₂ / Hydrogen peroxide	200mg/100ml(%)	187.90mg/100.00%
용액시험	활소 / Oxidizing potential chlorine	100mg/100ml(%)	98.27mg/100.00%

내용량시험은 국제 130번 시험법
 ※ 소독제의 유효성분 활성시험기준은 동일용량시험용 기준규격, 활성시험기준에 따라 90 ~ 100%임.

귀하가 ())으로 위하 신청한 결과의 시험·검사 결과는 위와 같습니다.
 2018년 05월 21일

* 위 성적란 외사항 결과에 한하여 시험·검사 증명서를 발급, 소문 통문 이용할 수 없습니다.
 - 1 -

**물질안전보건자료
(Material Safety Data Sheet)**

1. 제품과 회사에 관한 정보

가. 제품명 :
 나. 제조자 정보 :

2. 구성성분의 명칭 및 함유량

명칭	Concentration (g/kg)	CAS
복합4급알코올	100	61789-71-7
이소프로판올	200	77-92-9
락톤산염	인양	NOT ASSIGNED
인공색소 및 향료	인양	NOT ASSIGNED

3. 위험·유해성

본과 조종기에 적용을 당도함, 흡입과 피부 접촉으로 인해 자극을 당도할 수 있음.

4. 응급조치 요령

3. 제품 C

시험·검사 성적서

수 신 :

시 험 명 칭	1		
제 조 일 자	2018-04-25	제 조 번 호	002061915
제 조 국 가	KOREA, REPUBLIC OF / KOREA, KIN.	제 조 회사	
의 료 목 적	150(보관용)		

시 험 장 특	시 험 · 검 사 항 목	시 험 · 검 사 기 준	시 험 · 검 사 성 적
외관시험	색상	투명한 무색 액체	확인됨
용액시험	pH	1.0 이하	0.63
용액시험	내용량시험	100% 이상	101.06%
용액시험	활소 / Hydrogen peroxide	270mg/100ml(%)	286.94% (107.6%)
용액시험	활소 / Peroxyacetic acid	90mg/100ml(%)	83.95% (110.2%)

내용량시험은 국제 130번 시험법
 ※ 소독제의 유효성분 활성시험기준은 동일용량시험용 기준규격, 활성시험기준에 따라 90 ~ 100%임.

귀하가 (20180502-001458)으로 위하 신청한 결과의 시험·검사 결과는 위와 같습니다.
 2018년 05월 04일

* 위 성적란 외사항 결과에 한하여 시험·검사 증명서를 발급, 소문 통문 이용할 수 없습니다.
 - 1 -

MSDS

물질안전보건자료(MSDS)

1. 화학제품과 회사에 관한 정보

제품명 : **활소**
 제조자 정보 : 소독제(동물용의약품)
 제조사 : **한진**
 주소 : **한진**
 연락처 : **한진**

2. 구성 성분과 명칭 및 조성

화학물질명	CAS 번호	함량 (%)
Peroxyacetic acid	79-21-0	5.5-6.5
Hydrogen peroxide	7722-84-1	20.2
Acetic acid	64-19-7	10.2%

3. 위험, 유해성

가. 긴급한 위험·위해성정보 : 피부 및 점막에 화상을 유발할 수 있음
 나. 눈에 대한 영향 : 염색 및 접촉 시 심한 자극과 눈물의 과잉 분비, 연막의 부종 및 시력 손상을 유발할 수 있음
 다. 피부에 대한 영향 : 염색 또는 흡입 시 심한 자극을 유발할 수 있음
 라. 흡입시의 영향 : 호흡기 점막에 심한 자극과 통증을 유발할 수 있고 일시적 호흡곤란 혹은 기침이 발생할 수 있음
 마. 섭취시의 영향 : 소화기 점막에 심한 자극과 화상 및 구도의 염증을 유발할 수 있음
 바. 만성중독의 증상 : 장기간 혹은 반복적인 노출은 구토와 설사, 기침을 일으킬 수 있음

4. 응급조치 요령

가. 눈에 들어 갔을 때 :
 - 염색 즉시 대량의 흐르는 물로 적어도 15분 이상 즉시 의사의 검사를 받을 것
 나. 피부에 접촉했을 때 :
 - 즉시 오염된 의복과 신발을 벗고 약물이 피부에서 확산되지 않게 하며, 대량의 흐르는 물로 약물이 남아 있지 않을 때까지 씻어내야 함
 다. 흡입했을 때 :
 - 흡입했을 때 즉시, 환자를 신선한 공기 중으로 이동시키고 호흡을 구할 것
 라. 먹었을 때 :
 - 즉시 대량의 물로 구강을 세척하여 양치질 구토를 일으키지 않도록 하고 즉시 의사의 검사를 받을 것
 마. 폐사의 주의사항 : 치료 없음

5. 폭발, 화재 시 대처방법

가. 소화제 : 물, 건조분말, 이산화탄소
 나. 사용 금지 물질 : 없음
 다. 방화 및 방염성 : 호흡기구를 이용하여 화재 예방과 방화 안전을 사용해야 함.
 라. 소화방법 및 장비 : 독립된 소화장비를 사용하여 함

소독제 제품명

시험성적서

MSDS

4. 제품 D

성적서

제 품 명 : 2018. 09. 07
제 조 연 호 : 2018. 09. 07

시험 항목	분 량	시험 기준	결 과
성상		무색-미광택의 맑은 액체로 특이한 냄새가 있음	적합
pH 측정		6.0~9.0	7.51
확인시험		적합하여야 함	적합
함량시험 Total Quaternary Ammonium Chloride	75g/L	90.0 ~ 120.0% (67.5~96.0g/L)	107.2% (80.4g/L)
내용량시험	18L	표시량의 100% 이상	101.1% (18.2L)

관 경 격 합 : Q.C.

물질안전보건자료 (Material Safety Data Sheet)

고용노동부
안전보건공단

품목명	CAS No.	KE No.	UN No.	던 No.
45도 양이온 제형암모늄염, 디-C8-10-알킬디아미늄염...	68424-99-3	KE-29885		270-331-5

- 1. 유해물질과 회사에 관한 정보**
 - 가. 제품명 : 45도 양이온 제형암모늄염, 디-C8-10-알킬디아미늄염, 염화(GUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS...)
 - 나. 제품의 제조 용도와 사용상의 제한 : 제품용 용기 용도 : 적요함 / 제품의 사용상의 제한 : 적요함
 - 다. 유해물질(수용액)과 폐기 방법 : 폐기 방법 : 적요함 / 주의 : 적요함 / 주의 : 적요함 / 안전보건표 : 적요함
- 2. 유해성-위험성**
 - 가. 유해성-위험성 분류 : GHS 09 (수생독성) - H400 (수생생물에 유해함) / H411 (수생생물에 장기적 또는 중장기적으로 유해함)
 - 나. 유해성분(성분)을 포함한 제조공정 단계 : 없음
- 3. 유해성-위험성**
 - 가. 유해성분(성분)을 포함한 제조공정 단계 : 없음
- 4. 응급조치요령**
 - 가. 인체 노출시 응급조치요령 : 구토, 흡입, 흡입, 눈, 피부, 물로 씻기

5. 제품 E

시험·검사 성적서

제 품 명 : 20180309-2-000795 호

사용업체	제조번호		
제조사	제조회사		
검사항목	검사항목		
시험항목	시험·검사 항목	시험·검사 기준	시험·검사 성적
일반시험	성상	모양에 맞지 않는 불투명	확인됨
일반시험	pH	1.9 ~ 2.5	1.95
일반시험	내용량 시험	100% 이상	102.8%
함량시험	HPLC / Sodium dichloroacrylate(염류)	50% 이상(표시량)*	46.50% (93.00%)
함량시험	적중 / 염류(중량산소분)	중량산소분 2.05% ~ 2.7%	2.36%

2018년 03월 22일

물질안전보건자료 (Material Safety Data Sheet)

- 1. 제품과 회사에 관한 정보**
 - 제품명 : ...
- 2. 위험성 및 그 분류**
 - 상표약물 및 용량 (분제 1kg 중)
 - 트라이칼륨의 염화염화염(Potassium perchlorate; Triple salt, 명곡) : 500 g
 - 이 염화염화염의 나트륨염(Sodium dichloroacrylate; 인성) : 500 g
 - 황화수소(Sulphamic acid, USP) : 150 g
 - 헥사메타인산염(Sodium hexametaphosphate; 명곡) : 240 g
 - 디클로로벤젠 황산염(Sodium dichlorobenzenesulfonate; 명곡) : 50 g
 - 식품색소(Food Red No.2, 인성) : 적요함
 - 레몬향(Lemon micron, 명곡) : 적요함
- 3. 유해 위험성**

6. 제품 F

생산자로부터 미제공

물질안전보건자료 (Material Safety Data Sheet)

제 품 명	1/7
-------	-----

- 1. 유해물질과 회사에 관한 정보**
 - 가. 제품명 : ...
 - 나. 제품의 제조 용도와 사용상의 제한 : ...
 - 다. 유해물질(수용액)과 폐기 방법 : ...
- 2. 유해성-위험성**
 - 가. 유해성분(성분)을 포함한 제조공정 단계 : ...
- 3. 유해성-위험성**
 - 가. 유해성분(성분)을 포함한 제조공정 단계 : ...
- 4. 응급조치요령**
 - 가. 인체 노출시 응급조치요령 : ...

[1. 제품 A]

시험물질	제품 A	시험번호	C18CA-287N	
시험제목	제품 A의 어류(잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 A	제조번호	931607
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1145.8 g
	제조일	2016년 11월 28일	외관 및 색상	특이 냄새 나는 무색투명 액체
	유효기간	제조일로부터 24개월	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:250, 구제역 - 1:100)를 농도로 환산하였다.</p> <p>예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 4 mg/L, 구제역 : 10 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 음성대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 음성대조군, 10, 18, 32, 56 및 100 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-LC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-LC ₅₀ : 70.69(63.45~78.76), NOEC : 32			
	48 시간-LC ₅₀ : 70.69(63.45~78.76), NOEC : 32			
	72 시간-LC ₅₀ : 70.69(63.45~78.76), NOEC : 32			
	96 시간-LC ₅₀ : 70.69(63.45~78.76), NOEC : 32			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:250, 구제역 - 1:100)를 농도로 환산하였다 (AI : 4 mg/L, 구제역 : 10 mg/L).</p> <p>시험결과 96시간 LC₅₀ 은 70.69 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 18배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 7배 높은 농도에서 반수치사농도 (LC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[2. 제품 B]

시험물질	제품 B	시험번호	C18CA-288N	
시험제목	제품 B의 어류(잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 B	제조번호	186029
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1137.6 g
	제조일	2018년 05월 08일	외관 및 정상	열은 청색 맑은 액체
	유효기간	2020년 05월 07일	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:150, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다.</p> <p>예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 6.67 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 음성대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 음성대조군, 4, 9, 21, 45 및 100 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 2.2) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-LC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-LC ₅₀ : 9.87 (7.63~12.76), NOEC : 4			
	48 시간-LC ₅₀ : 9.87 (7.63~12.76), NOEC : 4			
	72 시간-LC ₅₀ : 9.87 (7.63~12.76), NOEC : 4			
	96 시간-LC ₅₀ : 9.87 (7.63~12.76), NOEC : 4			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:150, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다 (AI : 6.67 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L).</p> <p>시험결과 96시간 LC₅₀ 은 9.87 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 1.5배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 6배 높은 농도에서 반수치사농도 (LC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[3. 제품 C]

시험물질	제품 C	시험번호	C18CA-289N	
시험제목	제품 C의 어류(잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 C	제조번호	DS0361845
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1236.1 g
	제조일	2018년 04월 25일	외관 및 성상	투명한 액체
	유효기간	제조일로부터 18개월	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:1600, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다.</p> <p>예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 0.625 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 음성대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 음성대조군, 10, 18, 32, 56 및 100 mg/L의 시험 물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-LC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-LC ₅₀ : 13.87 (12.72~15.45), NOEC : < 10			
	48 시간-LC ₅₀ : 13.87 (12.72~15.45), NOEC : < 10			
	72 시간-LC ₅₀ : 13.87 (12.72~15.45), NOEC : < 10			
	96 시간-LC ₅₀ : 13.87 (12.72~15.45), NOEC : < 10			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:1600, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다 (AI : 0.625 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L).</p> <p>시험결과 96시간 LC₅₀ 은 13.87 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 22배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 8배 높은 농도에서 반수치사농도 (LC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[4. 제품 D]

시험물질	제품 D	시험번호	C18CA-290N	
시험제목	제품 D의 어류(잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 D	제조번호	140286
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1134.8 g
	제조일	2018년 07월 19일	외관 및 색상	투명한 액체
	유효기간	2020년 07월 18일	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:50, 구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다.</p> <p>예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 20 mg/L, 구제역 : 20 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 음성대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 음성대조군, 4, 9, 21, 45 및 100 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 2.2) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-LC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-LC ₅₀ : 12.65 (10.81~14.81), NOEC : 4			
	48 시간-LC ₅₀ : 12.65 (10.81~14.81), NOEC : 4			
	72 시간-LC ₅₀ : 12.65 (10.81~14.81), NOEC : 4			
	96 시간-LC ₅₀ : 12.65 (10.81~14.81), NOEC : 4			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:50, 구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다 (AI : 20 mg/L, 구제역 : 20 mg/L).</p> <p>시험결과 96시간 LC₅₀ 은 12.65 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 0.6배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 0.6배 낮은 농도에서 반수치사농도 (LC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			


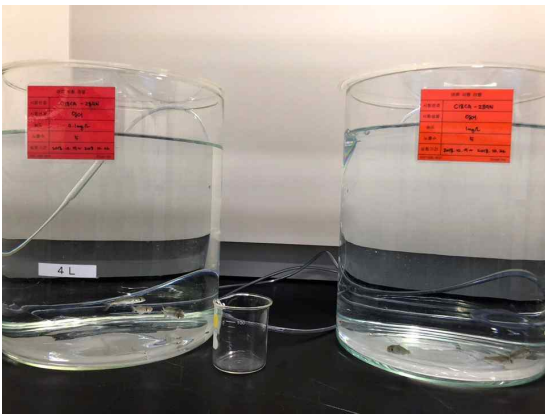
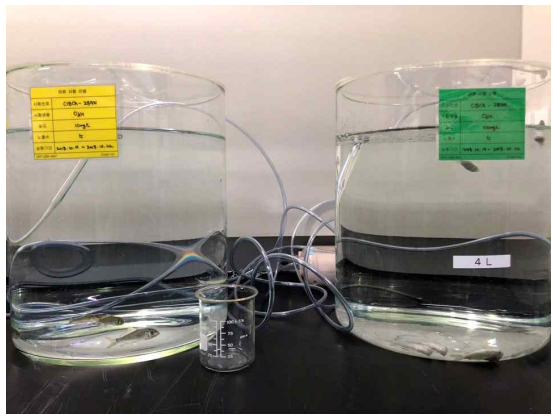


[5. 제품 E]

시험물질	제품 E	시험번호	C18CA-291N	
시험제목	제품 E의 어류(잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 E	제조번호	176038
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1129.4 g
	제조일	2017년 12월 19일	외관 및 정상	보라색 내지 회색 분말
	유효기간	2019년 12월 18일	보관조건	실온 (40℃ 이하)
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:400, 구제역 - 1:1000)를 농도로 환산하였다. 예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 2.5 mg/L, 구제역 : 1 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 음성대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 음성대조군, 10, 18, 32, 56 및 100 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-LC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-LC ₅₀ : 47.440 (41.070~54.800), NOEC : 18			
	48 시간-LC ₅₀ : 44.818 (35.954~55.811), NOEC : 18			
	72 시간-LC ₅₀ : 44.818 (35.954~55.811), NOEC : 18			
	96 시간-LC ₅₀ : 44.818 (35.954~55.811), NOEC : 18			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:400, 구제역 - 1:1000)를 농도로 환산하였다 (AI : 2.5 mg/L, 구제역 : 1 mg/L).</p> <p>시험결과 96시간 LC₅₀ 은 44.818 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 18배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 45배 높은 농도에서 반수치사농도 (LC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[6. 제품 F]

시험물질	제품 F	시험번호	C18CA-292N	
시험제목	제품 F의 어류(잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 F	제조번호	176038
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	4 L
	제조일	2018년 07월 17일	외관 및 색상	담황록색 액체
	유효기간	제조일로부터 18개월	보관조건	냉장 (냉암소)
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 정보없음, 구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다. 예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (구제역 : 20 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 음성대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 음성대조군, 1, 1.8, 3.5, 5.6 및 10 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-LC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-LC ₅₀ : 7.731 (7.102~8.599), NOEC : 5.6			
	48 시간-LC ₅₀ : 7.731 (7.102~8.599), NOEC : 5.6			
	72 시간-LC ₅₀ : 7.731 (7.102~8.599), NOEC : 5.6			
	96 시간-LC ₅₀ : 7.731 (7.102~8.599), NOEC : 5.6			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 구제역 방역 시 권장희석배수 (1:50)를 농도로 환산하였다 (구제역 : 20 mg/L).</p> <p>시험결과 96시간 LC₅₀ 은 7.731 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 2.6배 낮은 농도에서 반수치사농도 (LC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[어류(잉어)급성독성시험 - 대표사례]

<p>전체 군구성</p>		
<p>용량별 군구성</p>	<p>0.1 mg/L & 1 mg/L</p> 	<p>10 mg/L & 100 mg/L</p> 
<p>사망례</p>		

(2) 2차년도 연구수행 내용 및 결과

(가) 소독제의 환경독성 평가

2018년 1차년도 연구에서 선정된 제형별 대표 6종 소독제에 대한 어류급성독성시험을 수행하여 1단계적인 환경독성 영향을 평가한 결과로부터 이들 소독제의 무분별한 사용이 환경독성을 초래할 수 있다는 개연성을 충분히 확인하였으므로, 물벼룩 및 담수조류를 통하여 수생생물에 미치는 환경독성 영향 평가 시험을 추가 진행하여 수생생태계에 미치는 영향을 확인하고자 추가 시험을 수행하였으며, 해외에서 가장 많이 팔리고 있는 소독제인 제품 G를 추가하였다.

(나) 환경독성평가 결과

- ① AI, 구제역에 이용되는 시판 소독제에 의한 수생생물의 급성독성영향이 나타남을 확인할 수 있었으며, 어류, 물벼룩 및 담수조류 각 시험계에 따라 소독제의 독성영향이 다르게 나타나는 것이 확인되었음.

소독제	어류	물벼룩	담수조류
	LC ₅₀ (mg/L)	EC ₅₀ (mg/L)	EyC ₅₀ (mg/L)
제품 B	9.87	0.31	0.23
제품 D	12.65	0.44	0.15
제품 F	7.73	2.64	0.17
제품 G	100	68.05	14.68

<표 2. 수생생물 급성독성시험 결과표>

- ② 또한, 시험을 실시한 모든 소독제에서 공통적으로 생태계의 생산자에 해당하는 담수조류에서 높은 독성영향이 나타나는 것을 확인하였음.



<그림 2. 수생생물 급성독성시험결과 그래프>

- ③ 시판 소독제 제품에 대한 환경독성평가 실시 : 소독제 제품의 특성에 따라 자료의 일부 또는 전부를 면제 받거나, 여러 가지 유효성분이 혼합된 소독제의 경우, 각 성분에 대한 독성 시험자료를 기존 연구로 갈음하게 되어 최종 제품의 독성에 대한 평가가 이루어지지 않는 맹점을 타개하기 위하여, 시판되는 최종 소독제 제품에 대한 환경독성평가 실시가 필요하다고 사료된다.
- ④ 체계적인 환경독성평가 기준 확립 : 생물종에 따른 소독제의 독성영향이 차이를 보이는 연구결과를 토대로, 소독제가 환경에 미치는 영향을 체계적으로 확인하기 위하여 생산자 및 소비자에 해당하는 어류급성독성시험, 물벼룩급성독성시험 및 담수조류생장저해시험을 모두 실시해야 된다고 판단된다.

(다) 인축독성 또는 육상생물에 대한 독성자료 문헌 검색

- ① Keyword : 제품명, 각 소독제 원료명, 제형, 구제역, AI, 소독제, 독성, 유해성
- ② 문헌검색 방법
 - ㉠ 주요포털 : 네이버, 다음, 구글 등
 - ㉡ 학술정보, 논문 검색 : 한국학술정보, 학술연구정보서비스, DBpia, 한국과학기술정보연구원, 농림축산검역본부 동물용의약품 관리시스템 등
 - ㉢ 각 소독제 원료의 MSDS 확인하여 독성값 조사

③ 결과

- ㉠ 시판 소독제 제품 및 원료에 대한 인축독성 및 육상생물에 대한 독성 및 유해성에 관한 자료를 확인할 수 없었음.
- ㉡ 매물지 방역소독제 사용실태조사 및 독성평가[국립환경과학원 환경건강연구부 위해성평가연구과, 2011) 자료를 보면, 제품에 대한 독성자료는 수생태계에 대한 독성이 예측되지만, 인체 건강영향은 적고, 생분해도가 높아 토양과 물 등 자연계에서 빨리 분해되는 편이고, 사용 시 물에 희석하여 사용하기 때문에 인체에 대한 영향을 평가하기에는 어려움이 있다고 확인됨.
- ㉢ MSDS 확인하여 원료에 대한 독성수치 검색한 결과

소독제명	원료(유효성분)	독성수치
제품 A	글루타알데하이드 (Glutaraldehyde)	Rat LD ₅₀ (경구):200mg/kg Rat LD ₅₀ (경피):>2000mg/kg
제품 B	확인된 성분 : Alkyl Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride	Rat LD ₅₀ (경구):240mg/kg Rat LD ₅₀ (경피):930mg/kg
제품 C	과산화수소 (Hydrogen peroxide)	Rat LD ₅₀ (경구):805mg/kg Rat LD ₅₀ (경피):>2000mg/kg
제품 D	확인된 성분 Didecyl Dimethyl Ammonium Chloride	Mouse LD ₅₀ (경구):238mg/kg Rat LD ₅₀ (경피):>2000mg/kg
제품 E	Potassium monopersulfate	자료없음
제품 F	차아염소산나트륨	Rat LD ₅₀ (경구):8800mg/kg

	(Sodium hypochlorute)	
제품 G	복합 4급암모늄 (확인된 성분 : Alkyl Dimethyl Benzyl Ammonium Chloride)	Rat LD ₅₀ (경구):240mg/kg Rat LD ₅₀ (경피):930mg/kg

(라) 기대성과 및 파급효과

시판 소독제의 환경에 미치는 독성학적 영향을 수생생물을 대상으로 체계적으로 비교 평가하였다는 점에서 연구의 가치가 있으며, 본 연구과제에서 실시한 환경독성시험 (어류급성독성시험, 물벼룩급성독성시험, 담수조류생장저해시험) 결과로부터 AI 및 구제역 발생지 부근에 집중 살포되는 방역소독제 뿐만 아니라, 매년 대량 발생하는 유실 소독수에 대한 환경 영향을 평가할 수 있는 기초자료로서 활용이 가능할 것으로 사료된다.

(3) 제형별 소독제의 환경독성평가 실험결과 요약

<p>시험목적</p>	<p>본 시험은 시험물질(소독제)의 급성독성시험에서 나타나는 독성영향을 평가하고, 반수치사농도(LC₅₀) 및 반수영향농도(EC₅₀)를 산출하고자 수행하였다.</p>
<p>시험기준</p>	<p>“OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 203, Fish, Acute Toxicity Test” (Adopted : July 17, 1992)</p> <p>“OECD Guideline for testing of chemicals No.202, <i>Daphnia</i> sp., Acute Immobilisation Test” (Adopted: Apr. 13, 2004)</p> <p>“OECD Guideline for testing of chemicals No. 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test” (Adopted: Jul. 28, 2011)</p> <p>“농약 및 원제의 등록기준” 농촌진흥청 고시 제 2019 - 26 호 (2019 년 09 월 02 일)</p>
<p>시험물질 (제형별 소독제)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 제품 B (물벼룩, 담수조류) 2. 제품 C (물벼룩, 담수조류) 3. 제품 D (물벼룩, 담수조류) 4. 제품 F (물벼룩, 담수조류) 5. 제품 G (어류, 물벼룩, 담수조류)
<p>시험생물</p>	<p>어류 (잉어, <i>Cyprinus carpio</i>) OECD Guideline에 지정되어 있는 종으로, 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 입수처 : 오창양어장 (충청북도 청원군 오창읍 중신리 331번지)</p> <p>물벼룩 (<i>Daphnia magna</i>) OECD Guideline에 지정되어 있는 종으로, 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 입수처 : 호서대학교 안전성평가센터 (충청남도 아산시 배방읍)</p> <p>담수조류 (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>) OECD Guideline에 지정되어 있는 종으로, 독성시험에 널리 사용되고 있고, 풍부한 시험기초자료가 축적되어 있으며, 시험결과의 해석 및 평가에 이러한 자료를 이용할 수 있어 선택하였다. 입수처 : American Type Culture Collection (ATCC)</p>

[제품 G] - 어류급성독성시험

시험물질	제품 G		시험번호	C19CA-233N
시험제목	제품 G의 어류(잉어, <i>Cyprinus carpio</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 G	제조번호	1801004
	입수일	2019년 05월	입수량	500 mL
	제조일	2018년 08월 31일	외관 및 성상	무색 액체
	유효기간	제조일로부터 36개월	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>예비시험농도는 대조군, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>본시험에서는 예비시험 결과를 바탕으로 대조군 및 100 mg/L 설정하여 한계시험을 실시하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-LC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-LC ₅₀ : >100, NOEC : 100			
	48 시간-LC ₅₀ : >100, NOEC : 100			
	72 시간-LC ₅₀ : >100, NOEC : 100			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량이 지정되어 있지 않아, 시험물질 원액을 사용하여 시험을 진행하였다.</p> <p>시험결과 96시간 LC₅₀ 은 한계농도 이상 (>100 mg/L)으로 반수치사농도 (LC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[제품 G] - 물벼룩급성독성시험

시험물질	제품 G		시험번호	C19FA-234N
시험제목	제품 G의 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 G	제조번호	1801004
	입수일	2019년 05월	입수량	500 mL
	제조일	2018년 08월 31일	외관 및 성상	무색 액체
	유효기간	제조일로부터 36개월	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>예비시험농도는 대조군, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>본시험에서는 예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 10, 18, 32, 56 및 100 mg/L 으로 농도를 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-EC ₅₀ : 86.076, NOEC : 32			
	48 시간-EC ₅₀ : 68.05, NOEC : 32			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량이 지정되어 있지 않아, 시험물질 원액을 사용하여 시험을 진행하였다.</p> <p>시험결과 48시간 EC₅₀ 은 68.05 mg/L으로 반수영향농도값이 도출되었다.</p>			

[제품 G] - 담수조류생장저해시험

시험물질	제품 G	시험번호	C19PA-235N	
시험제목	제품 G의 담수조류 (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)를 이용한 생장저해 시험			
시험물질정보	명칭	제품 G	제조번호	1801004
	입수일	2019년 05월	입수량	500 mL
	제조일	2018년 08월 31일	외관 및 색상	무색 액체
	유효기간	제조일로부터 36개월	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>예비시험농도는 대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>본시험에서는 예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 10, 18, 32, 56 및 100 mg/L 으로 농도를 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ , NOEC (mg/L)			
	평균비생장률의 저해율에 대한 72 시간-ErC ₅₀ : 28.45, NOEC : 10			
	수율의 저해율에 대한 72 시간-EyC ₅₀ : 14.68, NOEC : 10			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량이 지정되어 있지 않아, 시험물질 원액을 사용하여 시험을 진행하였다.</p> <p>시험결과 72시간 EC₅₀ 은 평균비생장률의 저해율에 대하여 ErC₅₀은 28.45 mg/L, 수율의 저해율에 대하여 EyC₅₀은 14.68 mg/L 으로 반수영향농도값이 도출되었다.</p>			

[제품 B] - 물벼룩급성독성시험

시험물질	제품 B	시험번호	C19FA-227N	
시험제목	제품 B의 물벼룩 (<i>Daphnia magna</i>)을 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 B	제조번호	186029
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1137.6 g
	제조일	2018년 05월 08일	외관 및 성상	열은 청색 맑은 액체
	유효기간	2020년 05월 07일	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:150, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다. 예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 6.67 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 0.10, 0.18, 0.32, 0.56 및 1.0 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-EC ₅₀ : 0.660 (7.63~12.76), NOEC : 0.18			
	48 시간-EC ₅₀ : 0.31 (7.63~12.76), NOEC : 0.10			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:150, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다 (AI : 6.67 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L).</p> <p>시험결과 48시간 EC₅₀ 은 0.31 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 21.5배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 5.4배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[제품 B] - 담수조류생장저해시험

시험물질	제품 B	시험번호	C19PA-228N	
시험제목	제품 B의 담수조류(<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)를 이용한 생장저해 시험			
시험물질정보	명칭	제품 B	제조번호	186029
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1137.6 g
	제조일	2018년 05월 08일	외관 및 정상	열은 청색 맑은 액체
	유효기간	2020년 05월 07일	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:150, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다. 예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 6.67 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 대조군, 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 0.10, 0.18, 0.32, 0.56 및 1.0 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ , NOEC (mg/L)			
	평균비생장률의 저해율에 대한 72 시간-ErC ₅₀ : 0.34, NOEC : 0.18			
	수율의 저해율에 대한 72 시간-EyC ₅₀ : 0.23, NOEC : 0.10			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:150, 구제역 - 1:600)를 농도로 환산하였다 (AI : 6.67 mg/L, 구제역 : 1.67 mg/L).</p> <p>시험결과 72시간 - ErC₅₀은 0.34 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 19.6 배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 4.9배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀)값이 도출되었으며, 72시간 - EyC₅₀은 0.23 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 29 배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 7.3배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀)값이 도출되었다.</p>			

[제품 D] - 물벼룩급성독성시험

시험물질	제품 D	시험번호	C19FA-229N	
시험제목	제품 D의 물벼룩 (<i>Daphnia magna</i>)을 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 D	제조번호	140286
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1134.8 g
	제조일	2018년 07월 19일	외관 및 성상	투명한 액체
	유효기간	2020년 07월 18일	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:50, 구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다.</p> <p>예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 20 mg/L, 구제역 : 20 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 대조군, 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 0.3, 0.6, 1.3, 2.5, 5.0 및 10 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 2.0) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-EC ₅₀ : 0.681 (10.81~14.81), NOEC : 0.3			
	48 시간-EC ₅₀ : 0.429 (10.81~14.81), NOEC : < 0.3			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:50, 구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다 (AI : 20 mg/L, 구제역 : 20 mg/L).</p> <p>시험결과 48시간 EC₅₀ 은 0.429 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 46배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 46배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀) 값이 도출되었다.</p>			

[제품 D] - 담수조류생장저해시험

시험물질	제품 D	시험번호	C19PA-230N	
시험제목	제품 D의 담수조류(<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)를 이용한 성장저해 시험			
시험물질정보	명칭	제품 D	제조번호	140286
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	1134.8 g
	제조일	2018년 07월 19일	외관 및 색상	투명한 액체
	유효기간	2020년 07월 18일	보관조건	실온
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:50, 구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다. 예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (AI : 20 mg/L, 구제역 : 20 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 대조군, 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 0.10, 0.18, 0.32, 0.56 및 1.0 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ , NOEC (mg/L)			
	평균비성장률의 저해율에 대한 72 시간-ErC ₅₀ : 0.28, NOEC : 0.18			
	수질의 저해율에 대한 72 시간-EyC ₅₀ : 0.149, NOEC : < 0.10			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (AI - 1:50, 구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다 (AI : 20 mg/L, 구제역 : 20 mg/L).</p> <p>시험결과 72시간 - ErC₅₀은 0.28 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 71.4 배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 71.4 배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀)값이 도출되었으며, 72시간 - EyC₅₀은 0.149 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 AI 방역 시 권장희석배수의 약 134.2 배, 구제역 방역 시 권장희석배수의 약 134.2 배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀)값이 도출되었다.</p>			

[제품 F] - 물벼룩급성독성시험

시험물질	제품 F	시험번호	C19FA-231N	
시험제목	제품 F의 물벼룩(<i>Daphnia magna</i>)를 이용한 급성독성시험			
시험물질정보	명칭	제품 F	제조번호	176038
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	4 L
	제조일	2018년 07월 17일	외관 및 성상	담황록색 액체
	유효기간	제조일로부터 18개월	보관조건	냉장 (냉암소)
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다.</p> <p>예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (구제역 : 20 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 1, 1.8, 3.2, 5.6 및 10 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ (95%신뢰한계), NOEC (mg/L)			
	24 시간-EC ₅₀ : 4.091 (3.566~4.698), NOEC : 1.8			
	48 시간-EC ₅₀ : 2.64 (2.43~2.86), NOEC : 1.8			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 구제역 방역 시 권장희석배수 (1:50)를 농도로 환산하였다 (구제역 : 20 mg/L).</p> <p>시험결과 48시간 - EC₅₀은 2.64 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 약 7.6배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀)값이 도출되었다.</p>			

[제품 F] - 담수조류생장저해시험

시험물질	제품 F	시험번호	C19PA-232N	
시험제목	제품 F의 담수조류(<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)를 이용한 생장저해 시험			
시험물질정보	명칭	제품 F	제조번호	176038
	입수일	2018년 10월 02일	입수량	4 L
	제조일	2018년 07월 17일	외관 및 색상	담황록색 액체
	유효기간	제조일로부터 18개월	보관조건	냉장 (냉암소)
	제조사	OOO	주의사항	MSDS 참고
농도설정	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 AI (조류인플루엔자) 및 구제역 방역 시 권장희석배수 (구제역 - 1:50)를 농도로 환산하였다.</p> <p>예비시험농도는 권장희석배수를 환산 한 농도 (구제역 : 20 mg/L)가 범위에 포함되도록 설정하여, 대조군, 0.1, 1, 10 및 100 mg/L의 농도에서 시험을 실시하였다.</p> <p>예비시험 결과를 바탕으로 대조군, 0.10, 0.18, 0.32, 0.56 및 1 mg/L의 시험물질 처리군 (공비 : 1.78) (설정농도, nominal concentration)으로 설정하였다.</p>			
시험결과 (mg/L)	시간-EC ₅₀ , NOEC (mg/L)			
	평균비생장률의 저해율에 대한 72 시간-ErC ₅₀ : 0.32, NOEC : 0.10			
	수질의 저해율에 대한 72 시간-EyC ₅₀ : 0.17, NOEC : < 0.10			
고찰	<p>시험물질의 용법 및 용량을 바탕으로 구제역 방역 시 권장희석배수 (1:50)를 농도로 환산하였다 (구제역 : 20 mg/L).</p> <p>시험결과 72시간 - ErC₅₀은 0.32 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 약 62.5 배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀)값이 도출되었으며, 72시간 - EyC₅₀은 0.17 mg/L으로 농도로 환산한 권장희석배수와 비교해보면 약 117.6 배 낮은 농도에서 반수영향농도 (EC₅₀)값이 도출되었다.</p>			

나. AI 소독제 유효성 및 효능 평가 (위탁연구기관 : 주식회사 카브)

(1) 1차년도 연구수행 내용 및 결과

(가) 국내외 소독제의 유효성 평가 기준의 비교 분석

① 한국, 미국, 영국 및 유럽의 소독제 유효성 평가방법 수집

㉠ 한국은 농림축산 검역본부에서 고시하는 ‘소독제 효력 지침’에 따라 축산용 바이러스 소독제의 유효성 평가 기준안을 마련하였으며, 6차 개정안인 제2018-16호 까지 고시되어 있음.

첨부파일 1개/37KB (전체저장 버튼 클릭 시 압축파일로 저장됩니다.) 전체저장

제2016-91호, 소독제 효력시험지침.hwp (37KB)

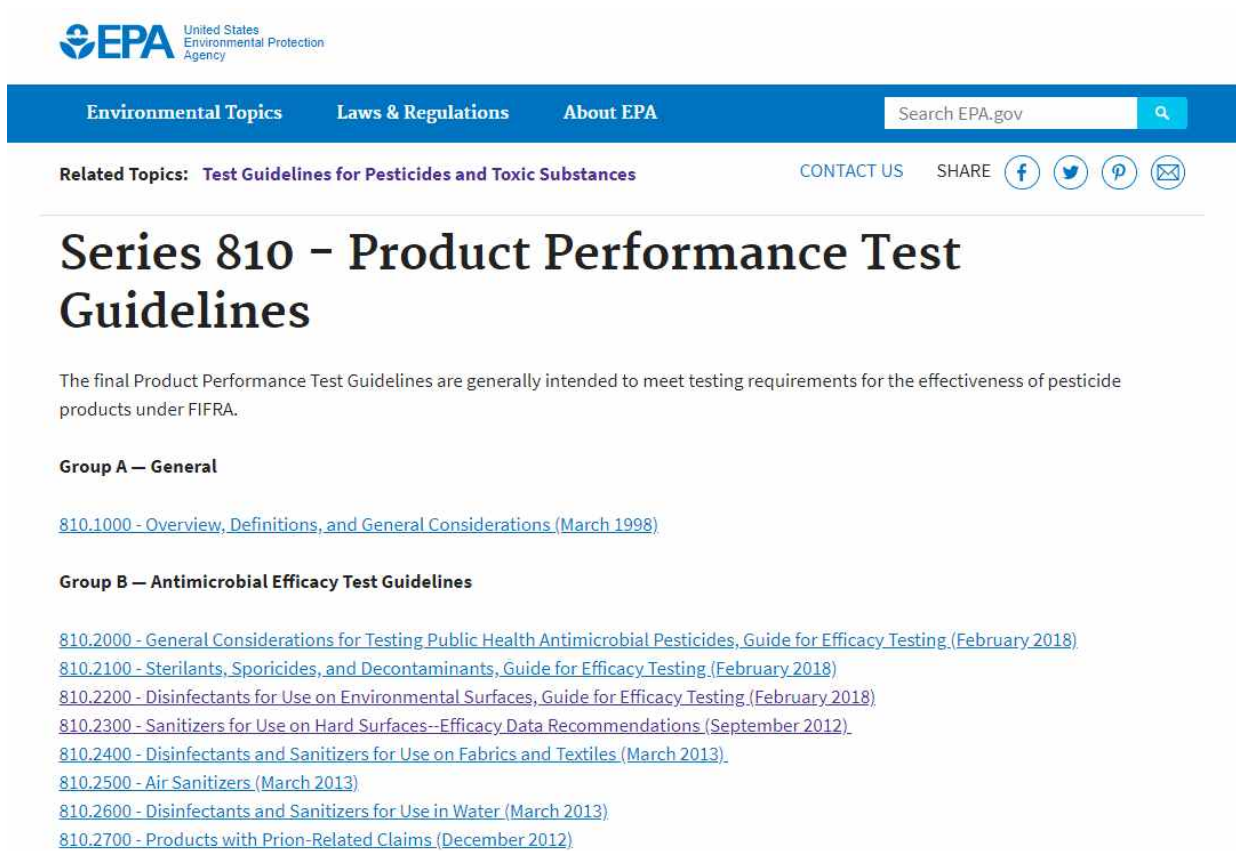
제 · 개정 이력

제목	고시번호	제개정	공포일자	첨부
소독제 효력시험 지침	제2018-16호	6차	2018-05-31	
소독제 효력시험 지침	제2017-29호	5차	2017-07-05	
소독제 효력시험 지침	제2016-91호	4차	2016-08-29	
소독제 효력시험 지침	제2016-29호	3차	2016-03-09	
소독제 효력시험 지침	제2013-34호	2차	2013-03-23	
소독제 효력시험 지침	제2012-156호	1차	2012-10-04	
소독제 효력시험 지침	제2011-26호	제정	2011-06-15	

<그림 32 농림축산 검역본부에서 고시한 소독제 효력 시험 지침>

- ㉠ 국내 질병발생 및 방역 여건을 고려해 소독제 시험을 다양화하고, 효력시험용 공시제품에 대한 관리를 구체적으로 명시하는 등 소독제 시험을 합리적으로 개선하기 위해 최근 여러 개정안을 공시함.
- ㉡ 농장에서 사용할 수 있는 소독제에 관한 내용만 공시하고 있음.

- ㉔ 미국의 경우 소독제의 효력시험 인증 및 평가 가이드라인을 미국환경보건국 (Environmental Protection Agency)에서 공시하고 있음.
- ㉕ 소독제 효력시험에 대한 가이드라인으로 환경 표면에 적용 가능한 실험법, 손에 쓸 수 있는 손소독제, 천이나 섬유에 쓰이는 소독제, 물에 쓰이는 소독제 등등 비교적 세분화 하여 제시하고 있음.



<그림 33 미국 환경 보건국(EPA)에서 제시하는 소독제 효능평가 가이드라인>

- ㉖ 각각의 항목마다 다른 프로토콜을 제시하고 있는데, 표면에서의 소독제 효력시험에 관한 프로토콜로 ASTM 2197-17을 제시하고 있으며, 이것은 스테인레스 스틸을 이용한 디스크 캐리어 테스트임.

- ㉔ 영국 및 유럽의 경우 소독제 효력시험 인증 및 평가 가이드라인을 영국 표준 협회에서 제공하고 있으며, 영국 뿐 아니라 유럽에서도 통용되는 가이드 라인임.
- ㉕ 이에 관한 실험 방법으로, 실험프로토콜 BS EN 14675:2015 가 있으며, 수의 분야에서 이용할 수 있는 소독제의 정량적 효력시험임. 이에 더불어 현재는 채택되지 않았지만, 캐리어를 이용한 소독제 효능 평가 방법도 개발 되었으며 피드백을 통해 개선이 진행 중임.

BS EN 14675:2015



BSI Standards Publication

Chemical disinfectants 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, step 1)

Document by: disinfectants_45m_CambridgeVersion.ac at 30 April 2015
 File to be distributed: disinfectants_45m - If you need multi user/network access visit: www.bsigroup.com/standards

<그림 34 영국 및 유럽의 소독제 유효성 평가방법_BS EN 14675:2015>

② 한국, 미국, 영국 및 유럽의 소독제 유효성 평가방법 분석

가 한국의 경우 농림축산검역본부 홈페이지를 통해 유효성 평가방법을 제시하고 있으며 다음은 구체적인 지침에 대한 설명임.(제2017-29호 소독제효력지침_농림축산검역본부)

소독제 효력시험지침

제1조(목적) 이 지침은 「약사법」 제31조, 제42조, 제85조제1항, 「동물용의약품등 취급규칙」 제7조제1항·제2항, “동물용의약품등 안전성·유효성 심사에 관한 규정” 제7조제1항제6호다목에 따라 제출되는 동물용의약외품인 소독약품의 효력시험에 관한 세부사항을 정함을 목적으로 한다.

제2조(용어의 정의) 이 지침에서 사용하는 용어의 정의는 다음과 같다. ① “소독제”라 함은 동물질병 방역의 목적으로 축사, 양어장 등 소독대상에 적용하여 병원미생물을 사멸 또는 증식억제 작용하는 제제를 말한다.

② “소독대상”이라 함은 병원체에 오염되었거나 오염되었을 우려가 있는 축체(사체 포함), 축사바닥, 축사공간, 차량 및 운반용구, 동물용 음수, 오물, 양어장, 어류, 기구 등을 말하며, “소독대상의 분류”는 소독 대상의 유기물 함량에 따라서 분류하되, 일반적으로 축사바닥, 오물, 사체, 농장차량 및 운반용구 등은 유기물이 많이 함유된 대상으로, 축사공간, 동물용 음수, 축체표면, 기구, 양어장, 어류, 일반차량 등은 유기물이 적게 함유된 대상으로 분류한다.

③ “유기물”이라 함은 소독의 효력에 영향을 주는 것으로 탄수화물, 지방 또는 단백질 등과 이를 함유한 동물의 분비물, 배설물, 장내용물, 혈액, 동물의 조직, 사료찌꺼기 등을 말한다.

④ “소독대상 병원체”라 함은 동물의 건강한 사육을 위하여 사멸 또는 증식억제의 대상이 되는 병력을 갖고 있는 병원체들을 의미하며, 다음 각 호와 같이 구분한다.

1. “특정 병원체”라 함은 허가항목의 소독대상 병원체에 특정 병원체명 (또는 특정 질병명)을 기재하는 경우를 의미하고,

2. “일반 병원체”라 함은 허가항목의 소독대상 병원체에 대표균주에 대한 시험의 결과에 따라 포괄적으로 사용되는 것으로 특정 병원체명이 아닌 ‘세균, 아포 또는 곰팡이’ 등의 용어로 기재하는 경우를 말한다.

⑤ “경수”라 함은 증류수 1 리터(liter)에 CaCl_2 0.305g과 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.139g(w/v)을 함유한 것을 의미한다.

⑥ “유기물희석액”이라 함은 소독제의 희석을 위해 사용되는 유기물을 함유한 경수를 의미하며, 세균용 및 곰팡이용의 유기물희석액은 5%(w/v) 효모추출물(yeast extract)을, 바이러스용의 유기물희석액은 5% 소태아혈청(fetal bovine serum)을 함유한 액체를 의미한다. 이 중 세균용 및 곰팡이용의 유기물희석액의 조제방법은 효모추출물 20%(w/v)가 함유되도록 경수에 용해한 다음 고압멸균(121℃ 15분)하여 4℃에 보관하면서, 사용 시에는 경수로 4배 희석하여 5% 함량의 유기물희석액으로 만들되, 1N 수산화나트륨액으로 pH7.0이 되도록 조정하는 것이다. 이때 소독제의 성분이 요오드포류(iodophors)인 경우는 6주 이상 보관 후 사용한다.

제3조(표준시험법) 표준시험법에 관한 구체적인 사항은 별표1의 「세균 등의 소독제 효력시

험」, 별표2의 「바이러스의 소독제 효력시험」, 별표3의 「곰팡이의 소독제 효력시험」, 별표4의 「훈증 등 가스제형 소독제 효력시험」 규정에 따른다. 다만, 아포세균, 결핵균, 곰팡이 및 특정 병원체에 관한 세부시험과 선택시험조건 등 기타 이 지침에서 규정하지 않은 세부사항은 농림축산검역본부장의 승인을 받아 시험을 실시하여야 하며, 내동형 소독제 등과 같이 표준시험법으로 효력을 확인할 수 없는 특수한 제품의 경우 선택시험조건을 따라야 한다.

- ① "표준시험조건"이라 함은 소독대상 병원체를 함유한 증류수희석액, 경수희석액 또는 유기물희석액을 각각 소독제를 함유한 증류수, 경수 및 유기물 희석액과 동량 혼합 후 4℃에서 30분간(결핵균 또는 아포는 60분) 처리하는 조건을 의미한다.
- ② "선택시험조건"이라 함은 표준시험조건 외에 제제 특성과 소독대상 등에 따라 반응시간(1분, 5분, 15분 등)과 반응온도(-10℃, -5℃, 10℃ 등)를 추가로 선택하여 처리하는 조건을 의미한다.
- ③ "소독제의 효력시험 설계시의 처리구"라 함은 다음 표의 내용과 같다(독성대조 처리구는 바이러스의 소독제 효력시험에 한한다) 이때 표시 +와 -는 각 처리구의 성분구성 여부를 의미하며, 유기물의 저·고는 결과활용시 소독대상의 유기물 함유정도를 의미한다.

처리구	경수	유기물	소독제	비고
1(유기물 저)	+	-	+	경수조건
2(유기물 고)	+	+	+	유기물/경수조건
3(병원체 대조)	+	-	-	처리구1, 2의 대조
4(독성 대조)	+	-	+	처리구 3의 대조

- ④ "유효희석배수"라 함은 유기물 저 또는 고 시험조건에서 효력이 인정되는 최소량의 소독제 유효성분에 대한 희석액의 배수를 말하며, "권장희석배수"라 함은 방역 현장에서 효과적으로 효력을 발휘하기 위한 소독제 희석배수를 의미한다.
 - ⑤ "유효희석배수의 판정"은 경수희석액, 유기물희석액의 2가지 조건에서 실시한 각각의 시험결과에 대한 것이며, 제3조제2항의 시험설계에 따른 처리구-1과-2는 처리구-3을 대조로 하여 다음과 같이 판정한다.
 - 1. 세균의 경우는 별표1과 같이 시험하여, 5개의 동일 소독제 희석배수의 영양배지에서 4개 이상 증식되지 않는 최종 소독희석 단계를 유효농도로 한다.
 - 2. 바이러스의 경우는 원칙적으로 표준시험조건에서 병원체 대조군과 비교하여 병원체가 ml 당 10⁴배(또는 TCID₅₀, EID₅₀, LD₅₀ 등, 이하 "PFU"라 한다)(상용대수로 환산한 값 4) 이상의 사멸 또는 불활화가 확인된 희석배수를 유효농도로 한다. 이 경우, 공시제품에 대한 유효희석배수의 결정은 3반복 시험결과, 상용대수로 환산한 값이 4 이상으로 산술평균의 20%(±10%) 오차범위 내에 있는 결과값의 중위수(median)로 한다.
 - ⑥ 제1항부터 제4항까지의 규정에도 불구하고 곰팡이용 소독제에 대한 시험조건, 처리구, 유효희석 배수의 판정 등은 별표 3. 곰팡이의 소독제 효력시험 기준에 따른다.
- 제4조(효력시험결과 활용) 효력시험의 결과를 권장희석배수로 정할 경우에는 유효희석배수의 80%값에 해당하는 희석배수를 기준으로 하여 제2조제2항의 소독대상 분류에 따라

병원체명(질병명)별로 희석배수를 구분하여 표기한다.

제4조의2(공시제품의 관리 등) ① 효력시험 실시 전 공시제품은 농림축산식품부장관이 지정한 검사기관(이하 “검사기관”이라 한다)에서 함량검사를 받아야 하며, 함량검사 결과는 유효성분 함량기준(95~105%)에 적합하여야 한다.

② 효력시험 의뢰자(이하 “의뢰자”라 한다)는 동일한 제조단위(롯트)의 공시제품 최소 3개 이상을 검사기관에 제공하여야 한다.

③ ①항에 따른 함량검사 결과가 적합할 경우 검사기관은 공시제품 2개 이상을 봉인하여 의뢰자에게 송부하여야 하며, 이 경우 의뢰자는 1개 이상은 효력시험기관에 제공하여야 하며, 1개는 유효기간에 1년을 더하여 보관하여야 한다.

④ 효력시험기관은 제공받은 공시제품의 봉인 상태 및 함량시험 결과를 확인하여 이상이 없는 경우 시험을 실시하여야 한다.

⑤ 기타 소독제 효력시험기관 및 의뢰자의 임무와 신뢰성 조사 등 관리사항은 농림축산검역본부장이 정한 “동물용의약품등 임상시험 관리지침”의 제12조, 제15조, 제18조 및 제19조를 준용한다.

제5조(효력시험결과제출) 효력시험결과 제출에 적용하는 시험방법 및 보고서 내용은 다음 각 항과 같다.

① 세균 등의 제2조제4항제2호의 일반병원체를 소독대상으로 할 경우에는 별표1의 대표균주에 대한 성적을 제출하여야 한다.

② 세균, 바이러스 또는 곰팡이의 특정 병원체를 소독대상으로 할 경우에는 별표1부터 별표4까지 제시된 해당 시험방법에 따라 실시한 성적을 제출한다. 다만, 소독제 효능·효과 및 용법·용량 등을 고려할 때 이 규정에 의한 표준시험법으로 소독제 효력시험의 목적을 달성할 수 없다고 판단되는 경우에는 해당 세균, 바이러스 및 곰팡이의 생물학적 특성에 따라 소독제 효능을 검사할 있는 과학적인 공인방법으로 제3조에 의거하여 시험방법을 변경할 수 있다.

③ 안전성 유효성 심사를 위해 실시하는 소독제의 효력시험결과 보고서는 다음 각 호의 사항을 포함하여야 한다.

1. 시험제목, 시험목적 및 시험성적요약
2. 시험의뢰자 성명 및 소속기관
3. 시험기관의 명칭, 소재지, 시험기관장 성명
4. 시험책임자 및 담당자의 성명, 소속 및 직책
5. 공시품의 제품명, 제조번호, 제조일자 및 원료약품분량
6. 시험기간, 시험방법, 시험성적 및 평가기준
7. 공시세균, 바이러스 및 곰팡이의 성상, 수 및 출처
8. 시험에 사용한 세포의 생물학적 특성, 중화배지 중화능력, 공시품의 세포독성(공시품의 세포독성은 바이러스의 소독제 효력시험에 한한다.)
9. 공시품의 동물, 취급자, 사물, 기구 및 환경 등에 미치는 영향 및 주의사항
10. 시험결과에 대한 시험책임자의 종합의견
11. 검사기관에서 실시한 공시제품 함량검사 결과(검사기관에서 발행한 결과서 첨부)

제6조(시험제한) 우폐역, 리프트계곡열, 림프스킨병, 아프리카돼지열병 등 국내에서 발생보

고가 없는 해외악성전염병의 소독제 시험은 국내시험을 제한하며, 가축전염병 병원체로써 전염성의 우려가 있거나 공중위생상 특별한 주의를 요하는 시험은 농림축산검역본부장의 사전허가를 받아야 한다.

제7조(보칙) 이 지침에서 규정하지 아니한 소독제의 효력에 관한 사항은 외국의 사례 및 과학적 근거 등을 제시하여 농림축산검역본부장의 승인을 받아 시험을 실시할 수 있다.

바이러스의 소독제 효력시험(제3조관련)

1.공시 바이러스

효력시험에 사용하는 공시 바이러스주는 정상 및 출처를 입증할 수 있어야 한다.

2.세포주 등

바이러스 종류의 생물학적 특성에 따라 적합한 세포, 발육란 또는 실험동물 등을 시험에 사용한다.

3.배지시약 등

①(희석액)선정된 세포증식에 적합한 배지와 관련시약을 사용하며, 경수희석액 및 유기물희석액은 세균의 시험법에 준한다. 단, 유기물 희석액에는 효모추출액 대신에 5% 소태아혈청을 사용한다.

②(중화배지)소독제의 약품성분 중화배지는 사용세포에 적합한 배지에 비동화된 10% 소태아혈청을 함유한 배지를 사용한다.

4.바이러스 소독제 효력시험

①(바이러스 배양) 계대배양 중의 활력있는 바이러스를 사용하되 바이러스의 증식이 최대인 시점에서 채득하여 사용직전까지 단시간 동안 얼음물에서 보관한다.

②(바이러스 시험균주 및 소독제 희석액) 제2조의 경수 및 유기물희석액을 이용하며 경수처리구는 경수로, 유기물처리구는 유기물희석액으로 실시함을 원칙하되, 제3조제1항의 단서규정에 따라야 한다.

③(소독제 시험용액 준비) 시험에 사용되는 소독제는 시험균액과의 반응 전의 희석농도를 희석배수로 소독제 희석액을 준비한다.

④(소독제의 희석법) 예상되는 소독제의 유효희석배수가 500배 이하일 경우는 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 등으로 희석하되, 그 이상의 예상 희석배수 농도 및 더 정밀한 희석배수 산정을 위해서는 희석배수 농도를 달리할 수 있다.

⑤(소독제 반응) 위의 ①항에서 증식된 4℃의 바이러스액 1.0 ml를 위의 ②항의 4℃희석액 19.0 ml에 각각 섞은 후에, 1분 간격으로 혼합액 2.5ml를 꺼내어 4℃에 있는 동량의 소독제 희석액이 들어 있는 시험관에 넣고 혼합한 다음, 4℃에서 정확히 30분간 반응을 시키며 도중에 10분마다 혼합하여 준다. 이 경우 대조구(처리구-3)를 반드시 포함시켜 처

리한다.

⑥(중화반응) 소독제와 병원체의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하기 위하여 즉시 1.0ml를 꺼내어 37℃의 동량의 중화배지에 넣고 혼합한 다음 적합한 양을 세포 또는 발육란에 접종하여 바이러스 함량을 측정한다.

⑦(바이러스 감염력 상실 정도 측정) 바이러스의 감염력이 상실된 정도는 일반적으로 microplate titration이나 plaque assay 방법을 사용한다. 발육란을 이용한 시험에서는 희석 배수당 5개 이상의 발육란을 사용하여 0.2ml를 요막강(allantoic cavity)에 접종하고 37℃ 배양기에서 5일간 배양하고 매일 검란하며 바이러스의 증식유무를 검사한다.

⑧(바이러스 함유량 계산) Kaerber method로 한다.

⑨(대조군의 검정 등) 병원체 대조군은 경수조건에서 소독제 없이 실험하고 위의[⑥(중화 반응)] 단계에서 병원체의 역가가 ml당 2×10^5 TCID₅₀ 이상이 확인되어야 하며, 독성대조군에서는 소독제에 의한 세포독성(종란을 사용하는 경우 종란독성)이 일어나지 않았음을 확인하여야 한다.

⑩(유효배수 평가) 유효배수의 평가는 제3조제5항제2호에 따른다.

⑪(세균 대표균주의 시험결과 동시제출) 바이러스의 소독제시험은 [별표1]에서 정의한 「세균의 대표균주」의 시험결과를 동시에 제출하여야 한다.

⑫(결과활용) 경수 또는 유기물처리구의 시험결과는 각각 바이러스와 세균의 소독제 시험 결과 희석배수와 비교하여 높은 소독제 농도를 최대 권장희석배수로 정한다.

㉠ 미국의 경우 소독제를 이용해 소독대상의 표면에서 바이러스의 소독 효과를 평가하는 방법으로 Disk Carrier test를 제시하고 있음. (ASTM E 2197-17)

㉡ 다음은 Disk Carrier Test에 대한 소개와 구체적인 실험 방법에 관한 내용임.

ASTM E2197-17

소독제의 Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobacteriicidal 효과를 평가하기 위한 정량적 디스크 캐리어 표준 실험법

소개

여기에서 소개하는 정량적인 실험 방법이란 1cm직경의 스테인레스 스틸 디스크를 캐리어로서 활용하는 방법임. 이 방법을 이용하면 식물성 세균이나 바이러스, 곰팡이, 마이코박테리아와 세균의 아포를 불활화 할 수 있는 소독제의 효능에 대해 평가할 수 있음. 표준 실험 물질로 이용되는 것, 경수, 유기물정도, 실험 미생물 등의 조건은 각 기관별로 다를 수 있음. 그리고 캐리어의 종류나 재료에 관해서는 비슷한 차원에서 적용이 가능함.

1. 목표

가. 이 실험 방법은 식물성 세균, 바이러스, 곰팡이, 마이코박테리아, 그리고 세균의 아포를 불활화 할 수 있는 물질의 효능을 평가하기 위해 고안된 방법으로 공기와 물이 스며들지 않는 환경 표면과 의료장비를 대표하는 스테인레스 스틸의 디스크 캐리어를 이용한 방법임. 이 실험법은 적어도 3개 이상의 대조 캐리어와 실험군의 남아있는 바

이러스를 비교함으로써 표준 기준안을 만족시켰음. 결과의 적절한 통계평가를 위해, 접종액에 들어있는 살아있는 미생물의 숫자는 결과에서 실험적 변수와 표준화된 실험 두 가지를 모두 고려하여 충분히 많은 숫자여야 함.

- 나. 이 실험법은 닭거나 문지르는 행위가 포함되지 않는 실험으로, 닭는 것에 대한 실험법으로 고안된 것이 아님.
- 다. 본 실험법은 미생물을 다룰수 있는 훈련된 사람이 이를 다룰 수 있는 시설에서 행해야 하며 전염성 인자를 다룰시 적절한 생물안전 등급을 받은 곳에서 실행해야 함.
- 라. 관리자는 Good Laboratory Regulations (GLP)수준의 실험기관에서 실험이 진행되었는지 확인할 의무가 있음.
- 마. 이 국제적인 표준방법은 Decision on Principals for the Developmnet of International Standard와 World Trade Organization Technical Barriers to Trade(TBT)에서 발간하는 Guides and Recommendations 에서 인정되는 기본원리와 표준방법에 따라 개발되었음.

2. 실험법 요약

- 가. 각각의 디스크(1cm 직경)에 10 μ l의 실험 미생물과 유기물 조건을 더해 접종함. 이 접종액을 건조한 후 적절한 용기에 넣고 50 μ l의 소독제를 희석하여 접촉시킴. 접촉시간과 온도는 다양하게 요구됨. 대조 캐리어들은 50 μ l의 실험 미생물에 영향을 주지 않는 액체를 접종하며, 이후에 실험군의 캐리어와 같은 처리를 함.
- 나. 식물성 세균, 곰팡이, 마이코박테리아, 그리고 세균의 아포에 대해 실험을 하는데 있어서, 소독제는 중화되어야 하고 접종액을 용출시켜야 함. 충분히 용출킨 후 용출액은 필터를 통해 걸러내야 함. 이를 배양하고 집락을 확인한 후, log10의 제거율로 표현함.
- 다. 바이러스로 실험하기 위해선 감수성이 있는 적절한 세포와 배양액을 이용해야 하며, 세포변성효과(CPE)나 용균반검사법(Plaque assay)을 통해 최적확수(MPN)를 구하고, log10의 제거율로 바이러스 감소량을 표현함.

3. 실험의 특징과 이용법

- 가. 본 실험의 설계는 씻어내는 것에 대한 바이러스의 손실을 없다는 사실을 전제로 하고 있기 때문에 적은 실험 캐리어로도 MPN기반의 추정값을 얻을 수 있음.
- 나. 본 실험은 유기물 조건을 더한 가혹조건이 포함되어 있음. 이는 다양한 소독제가 표면에 있는 미생물에 작용하는데 더 적은 표면에서 작용할 수 있도록 하는 조건임. 따라서 현장 상황을 잘 반영하기 위한 합당한 가혹조건과 미생물의 용출에 영향을 주지 않는 조건이 포함되어 있음. 기본 실험인 철을 이용한 디스크는 또한 다양한 조건변화를 이용하여도 허용이 가능함.
- 다. 캐리어는 실험 미생물 (10 μ l)과 대조 액체 혹은 실험 물질 (50 μ l)을 접종할 수 있도록 설계되었음.
- 라. 접종액은 각 디스크의 정 중앙에 접종해야 하며, 실험 물질은 디스크 전체 표면을 덮어 미생물이 실험물질에 전부 노출될 수 있도록 해야함.
- 마. 바이러스를 대상으로 소독제 실험을 진행할 경우, 1ml의 용출 용액을 이용하게 되면

20배 희석이 되지만 실제 실험을 진행하는데 있어서 $50\mu\text{l}$ 는 합리적으로 생각해도 적은 양이므로 역가를 측정하는데 무시하도록 함. 소독제가 접종전에 중화가 잘 되었는지 확인하기 위해서 잔여 소독제와 낮은 농도의 바이러스를 이용해 확인해야 함. 이 실험방법은 바이러스가 줄어드는 것을 평가하는 간접적인 방법으로 실제 실험을 진행하기 전에 소독제와 중화제를 섞어 세포독성이 없는지에 대해 확인해야함.

바. 본 실험에서 유기물 조건을 부여하는데 있어 실제 야외에서 발견될 수 있는 생체 분비물, 배설물 등의 소독제 저해 물질을 모사한 3가지 단백질(고분자 단백질, 저분자 단백질, 뮤신성분)을 설계하였음. 이 유기물 조건은 실험하는 모든 실험 미생물에 적용할 수 있음. 그리고 실제 동물의 혈청을 이용하는 것보다 저렴하고 편차가 적을 것으로 사료됨.

사. 소독제의 부표에 증류수나 특정 희석수를 지정하고 있지 않다면 대부분은 수돗물을 이용해 소독제를 희석할 것임. 그러나 실험하기 위해선 실험수의 경도를 제어해야 하므로 별다른 조건이 없다면 탄산칼슘 300ppm이상의 경수를 이용해야 함.

아. 부칙에는 소독제의 효능평가에 자주 쓰이는 미생물이 나열되어 있으며 배양조건도 포함되어있음. 만약 이외의 다른 미생물에 대해 소독 효과 평가를 위해서는 이에 대해 미생물의 배양조건과 배지 등의 정보에 대해 보고서에서 자세하게 서술해야 함.

4. 실험 용액과 시약

가. 시약의 순도 : 모든 실험에서 시약등급의 화학물질이 이용되어야 함.

나. 다른 등급의 화학물질이 이용될 수 있으나, 판단의 정확성을 낮추지 않을 정도로 높은 순도를 지녀야함.

다. 알코올 : 막 여과기를 잡는데 쓸 금속 포셉의 화염멸균을 위해 100ml 비커에 소분해서 이용.

라. 바이러스 작업을 위한 세포 배양용 실험물품 : 각 세포주에 맞는 배지를 이용해야 하는데 EMEM에 5~10% FBS를 사용하는 것이 일반 세포를 자라게 하는데 자주 쓰임.

마. 실험 소독제 : 적절한 희석배수로 희석하여 실험에 필요한 실험 온도로 맞춰줌. 나라별 기관에서 요구하는 반감기 등을 확인하기 위해선 1개 혹은 그 이상의 연도가 지난 소독제를 평가해야 함.

바. 성장, 재분리 배지와 배지 첨가물 : 요구되는 실험물품들은 실험 자제를 전문적으로 공급하는 업체에서 구매 가능함.

사. 소독제 희석용 희석제 : 소독제를 원하는 농도로 만들기 위해선 특정한 경도를 가지는 표준화된 물이 필요함.

아. 증류수 : 배지나 시약 용액을 만드는데 이용됨.

자. Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) : pH7.2~7.4로 바이러스 역가측정하는데 이용됨.

차. Tryptone, 소 혈청 알부민(BSA)과 소 뮤신 : 3개의 단백질 물질은 유기물 조건을 만족시키기 위해 이용됨. Tryptone 대신 효모 추출물도 동량 사용가능함.

카. 용출 용액 : PBS에 0.1% Tween-80을 이용하는데, 소독제 중화를 위해서 추가 중화 물질이 필요할 수 있음.

5. 캐리어

- 가. 스테인레스 스틸 디스크(1cm직경과 약 0.7mm두께) - 약간 거친면의 재질을 가지고 있는 스테인레스 스틸을 이용함. 캐리어를 제작한 후, 약산의 소독용액(7%구연산)에 20분 이상 침지하여 남아있는 찌꺼기들을 잘 제거함. 잘려진 부분이 지지분하다면 세척제와 자기질 칩을 이용해 정리해줌.
- 나. 새 디스크는 세척제에 적어도 1시간 동안 두어야 하며 잘 씻은 후 가압멸균기를 이용해 소독을 진행함. 이 디스크는 한번 쓰고 버릴 수도 있고, 잘 소독하면 재활용도 가능함. 지나치게 물에 오래두거나 강한 화학물질에 닿아 철이 부식되는 것을 피해야함.
- 다. 만약 디스크를 다시 사용하고자 한다면, 흠이나 부식되지 않았는지 확인해야 하며, 20배 이상의 배율을 가지고 있는 현미경을 이용해 문제가 없는지 확인해야함. 만약 문제가 있다면 사용 하지 말고 버려야됨.
- 라. 캐리어의 준비 - 유리 페트리 플레이트 안에 필터 종이를 깔고 20개의 깨끗한 디스크를 올림. 그리고 가압멸균을 함.

6. 유기물 조건

- 가. 유기물 조건은 아래에 설명된 단백질을 PBS와 혼합하여 제작함.
- 나. 10ml PBS에 Tryptone이나 효모 추출물을 0.5g섞음
- 다. 10ml PBS에 0.5g BSA를 섞음
- 라. 10ml PBS에 0.04g 소 뮤신을 섞음.
- 마. 각각의 용액을 만들고 0.22 μ m 직경의 필터를 이용해 걸러 소분하고 4 \pm 2 $^{\circ}$ C나 -20 \pm 2 $^{\circ}$ C의 조건에서 보관함.
- 바. 만약 500 μ l의 바이러스 접종액을 만들하고자 한다면 25 μ l BSA, 100 μ l 뮤신, 35 μ l Tryptone 혹은 효모추출물 용액과 340 μ l의 바이러스 배양액을 혼합하여 만들.
유의점 : 동물의 혈청은 유기물 조건으로서 많이 사용되나 이는 구성성분에 있어서 일관적이지 못하고 항생 성분이 들어있을 수 있음. 본 실험에서 제시하는 유기물 조건은 약 5%정도의 혈청과 비슷한 역할을 함.

7. 접종액의 준비

- 가. 본 실험은 대부분의 식물성, 아포 생성 세균, 바이러스, 곰팡이와 마이코박테리아를 이용할 수 있음.
- 나. 말린 접종액의 바이러스의 농도는 실험 기준을 맞추기 위해 충분히 높아야 함.

8. 디스크 캐리어 실험

- 가. 소독실험에 이용할 바이러스 용액을 잘 흔들어서 그 중 10 μ l를 털어서 멸균된 디스크 캐리어의 중앙에 접종함. (일관성을 위해 다른 캐리어 제작에 팁을 바꾸지 않고 여러 번 사용 가능함) 페트리 플레이트의 뚜껑을 덮음.
- 나. 접종한 디스크의 건조 - 흡습기 안에 페트리 플레이트를 놓고 뚜껑을 제거함.
흡습기가 제대로 밀봉되었는지 확인하고 진공기를 설치하여 수은압 20~25in. 의

진공상태를 만듦. 이 상태로 2시간동안 상온에서 건조시킴.

Inoculate each disk carrier with 10 μ L of the test organism, dry the inoculum and place one carrier each on the inside bottom surface of a 30 mL-capacity plastic vial with the inoculated side up

Place 50 μ L of the test substance on the surface of the required number of test carriers; place an equivalent volume of phosphate buffered saline (PBS) on each of at least three control carriers

Hold the carriers for the desired contact time at the required temperature

When testing for bactericidal, fungicidal, mycobactericidal and sporicidal activity, add 10 mL of eluent with a neutralizer to each vial with the disk carrier

When testing for virucidal activity, add 1 mL of eluent with a neutralizer to each vial with the disk carrier

Vortex contents of the vial for 30 seconds

Vortex contents of the vial for 30 seconds

Make 10-fold dilutions of the eluate as necessary and pass each dilution to be tested through a separate membrane filter*

Transfer eluate to a 2-mL vial and make 10-fold dilutions as necessary

Remove and place filter on the agar surface of a suitable recovery medium and incubate for colony formation

Inoculate the dilutions to be tested onto monolayers of host cells and incubate for cytopathology or foci of infection to develop

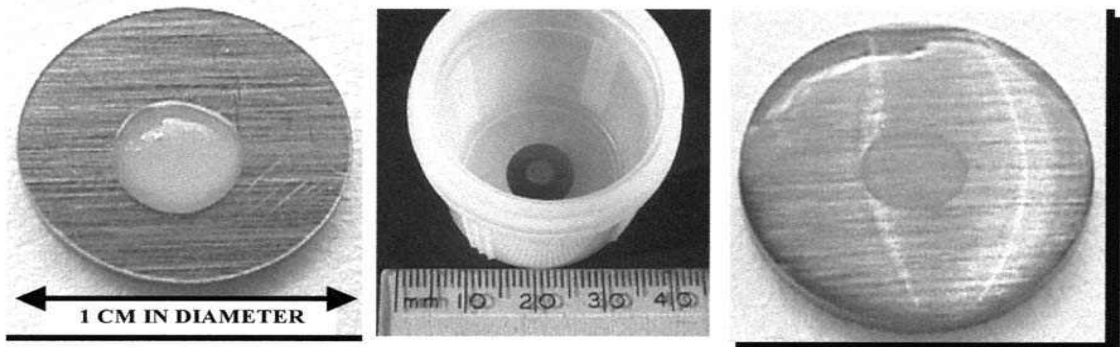
Examine the plates or cell cultures and determine the \log_{10} reduction in the viability of the test organism in relation to that on the control carriers

Determine if the test substance meets the performance criterion

<그림 4 디스크 캐리어 실험의 흐름도_ASTM-E2197-17>

다. 건조가 끝난 후, 흡습기에서 페트리 플레이트를 꺼내고 접종액이 잘 건조되었는지 확인함.

라. 조심스럽게 각 디스크를 들어서 Nalgene vial에 접종액이 위를 볼 수 있도록 놓음. 이 단계까지 오면 실험준비가 완료됨.



<그림 5 스테인레스 스틸 디스크를 이용한 접종액의 접종과 소독제의 적용법_ASTM-E2197-17> (좌: 스테인레스 디스크에 10 μ L 접종액을 접종/중간: 접종액을 말린 후, 튜브에 디스크를 넣음/우: 50 μ L의 소독제를 적용)

마. 실험시 적어도 3개의 캐리어를 대조로 하고 5개의 캐리어를 실험군으로 설정함.

바. 소독제의 적용 - 말려진 접종액 위에 소독제 50 μ L를 적용함. 온도 조건과 접촉 시간

은 요구되는 수준에서 정해짐. 반응시간이 끝나자마자 세균은 10ml, 바이러스는 1ml의 용출 용액을 이용해 회수를 진행함.

사. 30초간 Vortexing함.

아. 각각의 디스크에서 접종액이 다 회수되었는지 잘 확인 후 남아있다면 Vortexing을 더 진행함.

자. 2ml 플라스틱 실험관에 회수 용액을 옮겨 담고 EBSS를 이용해 10진 희석을 진행함. 감수성이 있는 세포주에 이를 접종하여 역가를 측정함.

9. 살바이러스 실험시의 추가 대조 조건

가. 실험 소독제나 중화제 등이 세포 배양에 있어 영향을 줄 수 있기 때문에, 추가 실험이 필요함. 소독제나 중화제가 세포, 바이러스 등에 영향을 주지 않는지 적어도 한번 이상 본 실험 전에 실험을 진행해야함. 자세한 사항은 참고 자료에 자세하게 기술되어 있음.

참고1. 소독제의 살바이러스 효과 검증을 위한 추가 대조 실험

10. 세포독성 대조실험

가. 목적 : 이 대조 실험의 목적은 소독제의 중화제가 세포독성을 줄이거나 늘리지 않는다는 것을 검증하기 위한 실험임.

나. 실험 과정

- 1) 먼저 소독제를 20배 희석한 후 소독제의 권장되는 희석배수보다 10더 많이 희석하여 중화제를 섞고 중화제를 넣지 않은 대조군도 설정함.
- 2) 세포주를 단일층으로 배양한 후 배지액을 제거하고, 그 위로 바이러스 역가 측정시 접종에 쓰이는 것과 동일량의 소독제 희석액을 접종함.
- 3) 37도 배양기에서 30~60분간 반응시키고 현미경을 통해 세포독성을 관찰함.
- 4) 만약 세포독성이 관찰된다면 겔 필터등의 다른 방법이 필요로함.
- 5) 만약 세포독성이 발견되지 않으면 간섭시험을 진행해야함

11. 소독제의 살바이러스 효과 검증시 이용되는 소독제 중화제 검증실험

가. 목적 : 소독제의 중화가 끝나는 시점에 소독제의 중화제가 소독제를 충분히 불활화 하는지에 대한 검증실험

나. 실험 과정

- 1) 바이러스를 500~1000 감염 역가/ml의 농도로 희석함.
- 2) 소독제의 권장 희석배수에 맞게 희석을 진행함.
- 3) 소독제를 중화제가 포함된 희석용액에 20배, 200배 희석함.
- 4) 바이러스 100 μ l와 중화제가 포함된 희석액 900 μ l를 혼합함.
- 5) 대조로서 같은양의 바이러스와 900 μ l의 EBSS를 혼합함.
- 6) 5분간 실온에서 반응시킴.
- 7) 반응 시간이 끝난 후 실험군과 대조군 시료를 세포에 접종함,
- 8) 접종 후 반응시간이 끝나면, 배지나 반 고체성 유지배지를 덮고 CPE나 Plaque가 형

성되는지 확인함.

- 9) 성공적으로 중화되었다면 대조군에 비해 바이러스 역가가 떨어지지 않지만, 중화제가 제대로 작용하지 않았다면 바이러스 역가가 $80 \pm 5\%$ 정도로 관찰될 것임.

12. 소독제의 간섭효과로 인한 바이러스의 감염성 검증실험

가. 목적

- 1) 소독제의 아세포 독성으로 인한 바이러스의 감염역가가 상승하거나 감소하는 효과에 대해 검증하기 위함임.
- 2) 명백히 세포독성이 없어 보이는 소독제의 희석배수에서도 바이러스가 감수성 있는 세포에 감염할 때 영향을 미칠 수 있어 바이러스의 역가가 다르게 계산될 수 있음. 이러한 가능성을 배제하기 위해 본 실험은 꼭 필요함.
- 3) 바이러스의 감염능을 파악하기 위해 가장 적합한 방법은 Plaque assay이므로 본 실험방법은 Plaque assay법을 기반으로 설계됨.

나. 실험 과정

- 1) 바이러스를 500~1000 감염역가/ml의 농도로 희석함.
- 2) 소독제의 권장 희석배수에 맞게 희석을 진행함.
- 3) 소독제를 중화제가 포함된 희석용액에 20배, 200배 희석함.
- 4) 12well 단층 세포 배양 플레이트에 20, 200배의 희석 용액을 $100\mu\text{l}$ 를 3개씩 분주함.
- 5) 남은 6개의 well중 3개에는 $100\mu\text{l}$ 의 중화제, 나머지 3개에는 EBSS $100\mu\text{l}$ 를 접종함.
- 6) 30분간 반응시킴.
- 7) 반응시간 후 현미경을 통해 세포독성을 확인함. 세포독성이 확인되면 겔 필터 방법을 이용해 세포 독성을 없애야 함.
- 8) 만약 세포독성이 관찰되지 않았다면, plaque 형성에 있어서 간섭현상이 있는지에 대해 평가해야함.
- 9) 세포를 EBSS로 세척하고 9개의 well에 바이러스를 접종함. 그 중 6개는 실험군이고 나머지 3개는 중화제를 넣은 well임. 마지막 3개중 2개는 바이러스를 접종하고 나머지 1개에는 아무 처리도 하지 않음.
- 10) 겔 배지를 세포위에 덮음.
- 11) 적절한 온도에서 배양하여 plaque이 생기는 것을 관찰함.
- 12) 세포에 간섭현상을 일으켰다면 plaque가 생기는 양이 대조군에 비해 많거나 적을 것임. 간섭이 없었다면 대조군과 동일한 plaque가 형성됨.

㉠ 유럽 및 영국의 경우 소독제 유효성 평가 방법으로 정량적 현탁액 실험법을 채택함.

(BSI Standards Publication_BS EN 14675:2015)

㉡ 다음은 정량적 현탁액 실험법에 대한 소개와 구체적인 실험 방법에 대한 내용임.

화학 소독제와 항균물질 - 수의 분야에서 이용되는 화학제제의 소독제와 항균물질의 살 바이러스 효능을 정량평가 가능한 현탁액 실험 (2상, 1단계)

1. 목적

본 유럽 표준 기준은 실험방법과 살 바이러스에 이용될 화학적 소독제가 경수에 희석되어 균일하고 물리적으로 안정화된 상태를 만족시키기 위한 최소 요구사항에 대해 명시하고 있음. 소독제는 간접 물질을 바이러스와 혼합함으로써 권장 사용 농도보다 80% 혹은 그보다 낮은 농도에서의 소독효과에 대해 평가되게 됨.

본 유럽 표준 기준은 수의학 분야에서 이용되는 소독제에 적용가능하며, 식품 단계에 들어가는 가공산업에 사용해서는 안 됨.

2. 소독제 효능 검증 기준

소독제를 경수에 희석하여 저 유기물(0.3g/l 소 알부민 용액), 고 유기물(3g/l 소 알부민 용액 + 3ml 양 혈구) 조건에 따라 실험을 진행했을 경우 적어도 4승 이상의 log 감소를 효능이 있다고 인정함.

3. 의무 실험 조건과 추가 실험 조건

	의무 조건	추가 조건
공시 바이러스	Bovine enterovirus Type 1 (ECBO)	
온도 ^a	10 °C	4 °C, 20 °C or 40 °C
반응 시간 ^b	30 분	1 min, 5 min and 60 min
간접물질-저유기물 ^c	3.0 g/l bovine albumin	
간접물질-고유기물 ^c	10 g/l bovine albumin plus 10 g/l yeast extract	

^a 허용 편차± 1 °C.

^b 반응시간 허용 편차± 10 s, 단 ≤1 min 는 ± 5 s 로 함

^c 상황에 따라 선택 가능함

4. 실험 방법

4.1 실험 원리

제품 그대로의 소독제/혹은 경수에 희석된 소독제 (혹은 물을 더한 ready-to-use 제품)는 바이러스와 간접물질이 포함 되어있는 시험 용액을 혼합함. 혼합물을 10 °C ± 1 °C 에 30 min ± 10 s 동안 유지함 (의무 시험 조건).

반응 시간이 끝난 후, 0.5 ml의 바이러스/소독제 혼합물을 채취함. 채취 후 곧바로 차가운 희석액으로 희석하여 살 바이러스 활동을 억제함. 희석은 10진 희석하여 얼음물에 10분 동안 보관한 차가운 배지로 희석한다. 각 희석 배수 중간에 피펫을 교체하여 바이러스의 오염이 없게 함.

희석액은 96 well에 접종하며 한 희석배수 당 8개의 well에 접종함. 바이러스 역가는 CPE 나 Plaque을 확인하여 TCID50 혹은 PFU으로 표현하며, Spearman and Karber 공식을 따라 값을 계산함.

소독제의 효능은 바이러스의 역가 감소량을 통해 계산할 수 있음.

4.2 재료 및 시약

4.2.1 실험 바이러스

살바이러스 효과는 아래의 바이러스 주로 평가함.

- Bovine enterovirus Type 1 (ATCC VR-248)

부연설명1. Bovine enterovirus Type 1은 Picornavirus 중 중 하나로 화학물질, 산성, 많은 소독제와 4급 암모늄 성분에 저항성이 강하며, 수의 분야에 매우 중요한 바이러스임.

부연설명2. 바이러스마다 다양한 환경 저항성을 가지고 있으므로 각각의 모든 바이러스에 대해 실험을 하는 것은 경제적으로 불가능함. 따라서 본 유럽 표준 실험법에서는 제시하는 모델 바이러스로 실험하는 것만으로 제한하며, 만약 추가 바이러스에 대한 논의는 2상 2단계에서 논의될 수 있음.

4.2.2 물

물은 탈 미네랄 하지 않은 깨끗한 증류수를 이용하며 고압증기멸균법을 이용해 멸균함.

4.2.3 소독제를 희석하기 위한 경수

1L 의 경수를 준비하기 위해서, 다음과 같이 준비함:

- 용액 A 준비: 19.84g 염화 마그네슘 ($MgCl_2$)과 46.24g 염화 칼슘 ($CaCl_2$)을 물에 녹이고 총 1000ml가 되도록 희석함. Membrane filtration 혹은 고압 증기 멸균함.

- 용액 B 준비: 35.02g 탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)을 물에 녹여 총 1000ml이 되도록 희석함. Membrane filtration 혹은 고압 증기 멸균함. 용액을 냉장 보관하나 그 기간은 일 주일을 넘지 않게 함.

- 1000ml volumetric flask에 600ml 에서 700ml의 물을 넣은 후, 용액 A 6ml 와 용액 B 8ml 를 섞고 1000ml가 되도록 희석함.. pH는 7.0 ± 0.2 가 되게 NaOH와 HCl을 이용함.

경수는 무균상태에서 제조하며 12 시간 이내에 사용 되어야 함.

4.2.4 유기물 조건

4.2.4.1 일반 사항

간접 물질은 소독제의 용도에 따라 선택됨.

간접 물질은 실험에 사용될 농도의 10배로 제조해서 이용함.

이온 조성과 화학적 조성을 명시함.

4.2.4.2 저 유기물 (Bovine albumin solution)

플라스크에 3g의 Bovine albumin을 90ml의 물에 섞은 다음 100ml선까지 물을 채워 넣음.

Membrane filtration으로 멸균 후, 한 달까지 냉장보관이 가능함.
실험단계에 쓸 Bovine albumin의 최종 농도는 3g/l임.

4.2.4.3 고 유기물 (Bovine albumin solution + 효모 추출물)

플라스크에 50g의 효모 추출물 분말과 150ml의 물을 넣고 섞은 다음 거품이 없어질 때 까지 기다린 후 250ml까지 물을 채워 넣음. 새로운 병으로 옮겨서 고압 증기 멸균 하고 20°C ± 1 °C 까지 식힘.

위 용액의 25ml을 50ml 플라스크에 옮긴 후, 물 10ml을 더함. Bovine albumin을 추가로 5g 넣고 흔들어서 녹임. 거품이 없어질 때 까지 기다린 후, 50ml까지 물을 채워 넣 음.

Membrane filtration으로 멸균 후 사용하며, 한 달까지 냉장보관이 가능함.

이 용액의 최종 농도는 효모 추출물10g/l 과 bovine albumin 10g/l임.

4.3 소독제의 준비

소독제의 농도는 권장 농도보다 1.25배 높게 설정되어야 하는데, 그 이유는 소독제 효능평가를 진행하면서 80%정도로 희석되기 때문임.

소독제는 경수 조건에서 적어도 3개의 다른 농도로 준비되어야 하며, 그 중 한 농도는 유효 농도여야 하고 한 농도는 비 유효 농도여야 함. 만약 권장 소독 농도로 나온 소독제의 경우에는 가장 높은 소독제의 농도가 80%로 계산됨.

바로 이용할 수 있는 소독제의 경우 경수가 아닌 일반 물로 희석함.

소독제는 준비된 후 2시간 이내에 실험이 진행 될 수 있도록 준비되어야 함. 만약 소독제 실험중 소독제가 균일하게 섞여있지 않아 보이면 결과 보고서에 이를 기록함.

4.4 소독제의 살바이러스 효능 평가 실험 절차

4.4.1 실험 조건 (필수조건 과 선택조건)

필수 온도, 반응 시간, 간접 물질과 실험 미생물에 더불어 추가적인 실험 조건과 실험 미생물은 소독제의 실용적인 추가조건에 따라 더해질 수 있음.

4.4.1.1 온도 (°C)

3에서 제시하는 온도 조건을 따름

각각의 온도에서 허용되는 편차는 ± 1 °C임

4.4.1.2 반응 시간 (분)

3에서 제시하는 필수 반응시간과 추가 조건을 따름.

각각 반응시간에 허용되는 편차는 ± 10 초이며, 1분간 반응 시는 ± 5 초임.

4.4.1.3 유기물 조건

유기물 조건 실험은 3.0g/l의 bovine albumin을 이용한 저 유기물과 10g/l bovine albumin + 10g/l 효모 추출물을 더한 고 유기물 조건을 이용함.

4.4.2 실험 바이러스의 준비

보관용 바이러스를 계대를 넘겨 시험용 바이러스를 준비함. 바이러스는 바이러스 역가를 높이 나타낼 수 있는 MDBK 세포주를 이용함. 세포 침전물은 원심 분리하는데 400g에 15분 원심분리기를 돌림.

바이러스는 희석하지 않고 사용함.

바이러스의 역가는 정량평가 실험이나 plaque 실험을 통해 알 수 있으며, 최소 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 함. 어떤 경우에서든 로그 4 이상의 역가 감소를 표현 할 수 있어야 하기 때문에, 높은 역가의 바이러스가 필요함.

보관용 바이러스는 -70°C 이하에서 보관되어야 함.

4.5 살 바이러스 실험 - 준비

4.5.1 일반

본 실험에 들어가기 앞서 바이러스를 제외한 모든 시약, 예를 들어 유기물질, 경수, 세포 배양 배지, 소독제의 희석액은 항온수조를 이용해 10 ± 1 °C로 맞춰져 있는지 확인해야 함. 바이러스는 녹인 후 얼음에 보관함.

실험관에 차갑게 준비된 MEM+2%FBS 배지는 바이러스의 역가 측정에 이용될 것으로 항온수조에 4°C로 보관하거나 얼음에 차갑게 보관함.

4.5.2 실험 방법

1ml의 유기물을 시험관에 넣고 바이러스 용액 1ml을 더함.

초시계로 시간을 재기 시작하여 용액을 섞어 10 ± 1 °C로 설정된 항온 수조에 2분±10초 간 반응시킴. 반응시간이 끝나면 8ml의 소독제를 더함. 다시 초시계를 시작하여 10 ± 1 °C에 30분±10초 동안 반응시킴.

반응시간이 끝나기 직전, vortexer를 이용해 섞어주고 반응이 끝나고 0.5ml의 실험 혼합물을 4.5ml 차가운 MEM+2%FBS에 섞고 얼음위에 보관함. 이 용액을 10^{-8} 까지 희석하여 접종전까지 차갑게 유지함.

희석액은 96 well plate에 접종하여 바이러스의 역가를 검정함. CPE를 확인하여 양성률이 100%와 0% 사이의 지점을 확인하고 Spearman and Karber 방법을 이용해 $TCID_{50}$ 를 계산함.

혹은 Plaque assay 방법을 이용하는 것도 가능함.

4.5.3 차가운 배지에서의 희석

실험 혼합물을 준비한 직후 0.5ml의 실험 혼합물과 4.5ml의 차가운 MEM+FBS에 섞고 시간을 재기 시작하며 30분 ± 10초 동안 얼음위에 보관함. 그 후 실험 혼합물 희석액을 10^{-6} 까지 희석하여 역가를 측정함. 이 대조는 실험군을 실험 할 때 동시에 진행함.

대조군의 역가가 로그값 0.5보다 작아야 함.

5. 결과의 표현과 해석

5.1 CPE결과 정리

세포 배양 결과 CPE가 나지 않았다면 0, 25%정도 났다면 1, 완전히 CPE가 생겼다면 4로 기록하거나 Plaque assay 의 경우 plaque 개수를 기록함.(PFU)

5.3 감염 역가 계산 $TCID_{50}$

바이러스 역가의 계산은 Spearman-Karber 방법에 따라 계산함.

소독제의 살바이러스 효능 계산

소독제 각각의 노출 시간에 따른 바이러스의 불활화 정도를 계산함. 소독제의 소독효과 기준을 통과하기 위해선 로그 4이상의 감소를 보여야 함.

6. 결론

소독제가 EN14675 표준 실험법에 따라 효능이 있다고 입증되기 위해선 Bovine enterovirus Type 1 바이러스를 로그 4이상의 살 바이러스 능력을 보여야 하며, 이는 30분 이내와 10°C 이하의 온도와 유기물 조건 하에서 평가 되어야 함.

3에서 공시한 추가 실험 조건도 마찬가지로 로그 4 이상의 역가 감소를 보여야 살 바이러스 능이 인정됨.

- ㉞ 영국, 유럽에서는 기존의 현탁액 실험방법을 개선한 소독제 유효성 평가 방법인 정량적 Carrier 실험을 도입하기 위해 현재 실험법을 제시하고 그 타당성에 대해 평가중에 있음 (BSI Standards Publication_BS EN 17111)
- ㉟ 다음은 정량적 Carrier 실험에 대한 소개와 구체적인 실험 방법에 대한 내용임.

BS EN 17111

화학 소독제와 항균물질 - 의학 분야에서 이용되는 항균물질의 살 바이러스 효능의 정량 평가를 위한 캐리어 실험 (2상, 2단계)

주의: 본 실험법은 영국의 표준 실험법으로 2017년 5월 기준으로만 배포됨. 추후에 표준 실험 방법으로 채택되기 전에 관심이 있는 여러 관계자들에게 조언을 얻기 위해 제작되었음.

1. 목표

본 유럽 표준 실험법은 소독제를 경수에 풀어서 사용했을 시에 살바이러스 효능을 평가하는 최소한의 필수 조건에 대해 규정함.

본 유럽 표준 방법은 의료 분야에 사용될 수 있는 소독제에 적용 가능함.

2. 검증 기준

경수에 희석된 소독제는 저유기물(0.3g/l bovine albumin 용액)이나 고유기물 조건(3g/l bovine albumin 용액 + 3ml 양 적혈구) 조건하에 적어도 로그 4이상의 살바이러스 효과를 보여야 효능이 있다고 간주함.

실험조건	청소전	저온 소독(≤ 40℃)	고온 소독(≥ 40℃)
의무 실험 균주	Modified Vacciniavirus Ankara 또는 Vaccinia virus strain Elstree	Adenovirus And Norovirus	Parvovirus
추가 실험 균주	모든 관련 바이러스		
실험 온도	20℃	20℃ 그리고 40℃	>40℃ 그리고 70℃
반응 시간	최대 60 분	최대 60분	최대 60분
간접 물질			
저유기물	0.3g/l bovine albumin solution	0.3g/l bovine albumin solution	0.3g/l bovine albumin solution
고유기물	3.0g/l bovine albumin solution Plus 3.0ml/l 적혈구	3.0g/l bovine albumin solution Plus 3.0ml/l 적혈구	3.0g/l bovine albumin solution Plus 3.0ml/l 적혈구
추가 조건	모든 관련 물질	모든 관련 물질	모든 관련 물질

< 표 1 의무 실험조건과 추가 실험조건 >

3. 실험 방법

3.1 원리

3.1.1 실험 바이러스와 간접 물질을 섞은 용액을 유리 캐리어에 도포함. 캐리어를 말린 후, 경수에 희석된 소독제에 캐리어를 침지함. 동시에 2번째 캐리어는 소독제가 들어있지 않은 경수에 침지하여 대조군으로 이용함. 캐리어는 적정온도, 일정시간동안 유지됨. 반응 시간이 끝난 후, 캐리어를 중화제가 들어있는 glass bead로 옮김. 잘 흔들어서 바이러스를 표면에서 회수함. 생존해 있는 바이러스의 양과 감소 역가는 실험군과 대조군을 비교하여 계산함.

3.1.2 실험은 청소 전 단계의 경우 Modified Vacciniavirus Ankara 나 Vaccinia virus Elstree를 이용하며, 바이러스 최소범위 실험시 Adenovirus type5와 Murine Norovirus, 40℃나 그이상의 온도 조건에서는 Murine Parvovirus 가 이용됨.

3.1.3 추가 접촉 시간과 온도 및 추가 간접물질도 적용 가능함.

3.2 재료 및 시약

3.2.1 실험 바이러스

살 바이러스 효능 실험은 다음 바이러스 주를 이용해 실험함

3.2.1.1 Enveloped DNA virus

Vaccinia virus, strain Modified Vaccinia Virus Ankara(MVA), ATCC VR-1508 or strain Elstree, ATCC VR-1549

3.2.1.2 Non-enveloped RNA virus

Murine Norovirus, strain S99 Berlin

3.2.1.3 Non-enveloped DNA virus

- 1) Adenovirus type 5, strain Adenoid 75, ATCC VR-5
- 2) Murine Parvovirus, minute virus of mice, strain Crawford, ATCC VR-1346

3.2.2 경수

1L 의 경수를 준비하기 위해서, 다음과 같이 준비함:

- 용액 A 준비: 19.84g 염화 마그네슘 (MgCl₂)과 46.24g 염화 칼슘 (CaCl₂)을 물에 녹이고 총 1000ml가 되도록 희석함. Membrane filtration 혹은 고압 증기 멸균함.
- 용액 B 준비: 35.02g 탄산수소나트륨 (NaHCO₃)을 물에 녹여 총 1000ml이 되도록 희석함. Membrane filtration 혹은 고압 증기 멸균함. 용액을 냉장 보관하나 그 기간은 일 주일을 넘지 않게 함.
- 1000ml volumetric flask에 600ml 에서 700ml의 물을 넣은 후, 용액 A 6ml 와 용액 B 8ml 를 섞고 1000ml가 되도록 희석함.. pH는 7.0 ± 0.2가 되게 NaOH와 HCl을 이용함.

경수는 무균상태에서 제조하며 12 시간 이내에 사용 되어야 함.

3.2.3 유기물 조건

3.2.3.1 저 유기물 조건(Bovine albumin solution-저농도)

0.30g의 Bovine albumin fraction V를 100ml의 희석액에 녹임.
membrane filtraion을 하여 멸균하고 냉장보관하며 1개월간 사용 가능함.
실험에 쓰일 최종 bovine albumin 농도는 0.3g/l임.

3.2.3.2 고 유기물 조건(Bovine albumin 혼합물- 고농도 + 양 적혈구)

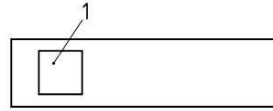
3g의 Bovine albumin fraction V을 97ml의 희석액에 녹임.
membrane filtraion을 하여 멸균함.

8.0ml의 피브리인이 제거된 신선한 양 피를 준비하고 800g_N에 10분간 원심분리기를 돌림. 상층액을 제거하고 PBS로 혈구를 wash함. 이 과정을 3번 정도 반복하여 상층액이 투명해지도록 함.

3ml의 준비된 혈구를 97ml의 멸균된 bovine albumin 용액에 섞어줌. 오염방지를 위해 준비된 용액을 하루 사용치 씩 소분하여 최대 7일동안 냉장보관함.
실험에 쓰일 bovine albumin과 sheep erythrocyte의 최종 농도는 3g/l과 3ml/l 임.

3.2.3.3 불투명한 유리 캐리어

15mm x 60mm x 1mm 크기의 한쪽면이 sandblasted된 유리 캐리어를 10분간 적절한 세제를 넣고 끓이고, 최소 3면 물로 세척한 후, 70% 알코올로 잘 닦아 준비함.
sandblasted된 면에 끝부분에서 2mm 씩 띄어 가로 세로 10mm 의 정사각형을 새김.
건열로 멸균을 하고 나면 “접종 사각형”이 명확하게 보임.



Key
1 inoculation square

Figure 1 — Frosted glass carrier with markings

<그림 6 불투명한 유리 캐리어 예시>

3.3 소독제의 살 바이러스 능을 평가하기 위한 실험 과정

3.3.1 온도 설정

실험 전, 모든 시약 (소독제 용액, 실험 현탁액, 희석액, 간섭물질, 경수 등등)을 항온수조를 이용해 실험 조건에 맞게 온도를 맞춰줌
중화제와 물은 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 가 되게 설정함.

3.3.2 캐리어를 다룰 시 유의할 점

대조용액이나 바이러스를 접종 할 면에 다른 것이 닿지 않도록 주의함.

3.3.3 캐리어에 바이러스를 접종

a) 캐리어를 무균적으로 Petri dish에 올려놓음. 튜브에 유기물 조건을 위한 간섭물질 1ml을 넣고 바이러스 용액 9ml을 넣음. 잘 흔들고 나서 0.05ml을 덜어 “접종 사각형” 안에 접종 한 후, 피펫 팁을 이용해 사각형 안에 고루 퍼줌. Petri dish 뚜껑을 완전히 닫지 않은 상태로 $18^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 사이의 온도 조건하에 Bio-security cabinet에서 최대 1시간 건조시켜줌. 건조 후 바로 캐리어를 실험에 이용함.

3.3.4 실험 방법

a) 10ml 의 소독제 용액을 뚜껑이 있는 실험관에 소분하고 실험 온도에 맞게 항온 수조에 넣어놓음. 막 건조가 끝난 캐리어를 “접종 사각형”이 모두 잠길 수 있도록 소독제에 침지함. 초시계로 반응시간에 맞춰 반응시킴

b) 반응 시간이 끝난 후, 5ml의 배지가 들어있는 다른 튜브로 캐리어를 옮기고, 약 1ml의 유리 bead를 넣어주고 60초 동안 잘 흔들어주어 바이러스를 회수함. 회수가 끝나자마자 차가운 유지배지(EMEM + 2% FCS)를 이용해 10진 희석을 진행하여 희석액을 준비함. 10진 희석시 carry-over를 막기 위해 피펫 팁을 매번 바꿔줌.

c) 대조군으로 소독제 용액 대신 경수 10ml을 이용해 똑같이 처리함.

4. 바이러스 역가 계산 및 결과 해석

바이러스 역가 계산 결과 대조군 대비 로그 4 이상의 감소량을 보이면 소독제가 효과가 있다고 판정함. 이를 위해 적어도 $10^8 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 이상의 역가를 가지는 바이러스를 사용할 것을 권장함. 바이러스 역가 계산은 BS EN 14675 와 같으므로 생략함.

③ 국내와 해외의 소독제 유효성 평가방법 비교분석

- ㉔ 앞서 설명했던 한국, 미국, 유럽의 유효성 평가방법을 분석해보면 비슷한 점도 있지만 상이한 부분도 많이 있음을 확인할 수 있음.
- ㉕ 나라별 평가 방법에서 두드러지는 항목으로 기본 실험 방식, 반응시간조건, 간섭물질조건, 온도조건, 소독효과 검증 기준으로 요약할 수 있음.

	한국	미국	영국 및 유럽(Phase1)	영국 및 유럽(Phase 2)
기본 실험 방식	현탁액 실험	Carrier 실험	현탁액 실험	Carrier 실험
반응시간	30분	10분 이내	30분	최대 60분
간섭물질	5% 소태아 혈청	Tryptone, BSA, 소 뮤신 혼합물(약 5%정도 소태아 혈청 효과)	저유기물: 3 g/l Bovine albumin 고유기물: 10 g/l bovine albumin+10 g/l 효모 추출물	저유기물: 0.3 g/l Bovine albumin 고유기물: 3 g/l bovine albumin+3 ml/1 양 적혈구
온도	4℃	실온 혹은 요구되는 온도	10℃	20℃
소독효과 검증	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml 또는 EID ₅₀ /ml의 역가감소	10 ³ TCID ₅₀ /ml 또는 EID ₅₀ /ml의 역가감소	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml 또는 EID ₅₀ /ml의 역가감소	10 ⁴ TCID ₅₀ /ml 또는 EID ₅₀ /ml의 역가감소

<표 2 국내 및 해외의 소독제 유효성 평가 방법 비교분석>

- ㉕ 각기 나라별로 상이한 평가 방법을 보여주고 있지만 차단방역 현장에서 소독제가 반응하는 시간, 온도, 간섭물질 등을 잘 반영한 실험방법은 미국의 Disk carrier 실험으로 판단되며 이 실험과 한국의 소독제 효력시험을 바탕으로 하여 새로운 표준 실험법을 정립하고자 함.
- ㉖ 다음은 Disk carrier 실험 기반의 소독제 효력 시험방법 제안안임.

<p>소독제 효력시험지침(안)</p> <ul style="list-style-type: none"> ● "경수"라 함은 증류수 1 리터(liter)에 CaCl₂ 0.305g과 MgCl₂· 6H₂O 0.139g(w/v)을 함유한 것을 의미한다. ● "유기물접종액"이라 함은 유기물을 함유한 경수와 바이러스를 섞은 것을 의미하며, 유기물 조건은 아래에 설명된 단백질을 PBS와 혼합하여 제작함. <ol style="list-style-type: none"> 1) 10ml PBS에 Tryptone이나 효모 추출물을 0.5g섞음 2) 10ml PBS에 0.5g BSA를 섞음 3) 10ml PBS에 0.04g 소 뮤신을 섞음.
--

4) 각각의 용액을 만들고 0.22 μ m 직경의 필터를 이용해 걸러 소분하고 4 \pm 2 $^{\circ}$ C나 -20 \pm 2 $^{\circ}$ C의 조건에서 보관함.

5) 만약 500 μ l의 유기물 접종액을 만들고자 한다면 25 μ l BSA, 100 μ l 뮤신, 35 μ l Tryptone 혹은 효모추출물 용액과 340 μ l의 바이러스 배양액을 혼합하여 만듦.

유의점 : 동물의 혈청은 유기물 조건으로서 많이 사용되나 이는 구성성분에 있어서 일관적이지 못하고 항생 성분이 들어있을 수 있음. 본 실험에서 제시하는 유기물 조건은 약 5% 정도의 혈청과 비슷한 역할을 함.

- "표준시험조건"이라 함은 소독대상 병원체를 함유한 유기물희석액을 Disk 위에 건조시킨 후 소독제를 함유한 경수 희석액을 점적하여 10분간 처리하는 조건을 의미한다.
- "선택시험조건"이라 함은 표준시험조건 외에 제제 특성과 소독대상 등에 따라 반응시간(1분, 5분 등)과 반응온도(-10 $^{\circ}$ C, -5 $^{\circ}$ C, 10 $^{\circ}$ C 등)를 추가로 선택하여 처리하는 조건을 의미한다.
- "유효희석배수의 판정"은 바이러스의 경우 원칙적으로 표준시험조건에서 병원체 대조군과 비교하여 병원체가 ml당 10⁴배(또는 TCID₅₀, EID₅₀, LD₅₀ 등, 이하 "PFU"라 한다)(상용대수로 환산한 값 3) 이상의 사멸 또는 불활화가 확인된 희석배수를 유효농도로 한다.

Disk를 이용한 바이러스의 소독제 효력시험

1.공시 바이러스

효력시험에 사용하는 공시 바이러스주는 성상 및 출처를 입증할 수 있어야 한다.

2. Disk의 준비

스테인레스 스틸 디스크(1cm직경과 약 0.7mm두께) - 약간 거친면의 재질을 가지고 있는 스테인레스 스틸을 이용한다. 디스크를 제작한 후, 약산의 소독용액(7%구연산)에 20분 이상 침지하여 남아있는 찌꺼기들을 잘 제거한다. 잘려진 부분이 지지분하다면 세척제와 사포를 이용해 정리해주고 새 디스크는 세척제에 적어도 1시간 동안 두어야 하며 잘 씻은 후 가압멸균기를 이용해 소독을 진행한다. 이 디스크는 한번 쓰고 버릴 수도 있고, 잘 소독하면 재활용도 가능하다. 지나치게 물에 오래두거나 강한 화학물질에 닿아 철이 부식되는 것을 피해야한다.

3.세포주 등

바이러스 종류의 생물학적 특성에 따라 적합한 세포, 발육란 또는 실험동물 등을 시험에 사용한다.

4.배지시약 등

①(희석액)선정된 세포증식에 적합한 배지와 관련시약을 사용하며, 경수 및 유기물희석액은 상기 제시된 경수조건에 맞게 제작하여 사용한다.

②(중화배지)소독제의 약품성분 중화배지는 사용 세포에 적합한 배지에 비동화된 10% 소태아혈청을 함유한 배지를 사용한다.

5.바이러스 소독제 효력시험

①(바이러스 배양) 계대배양 중의 활력있는 바이러스를 사용하되 바이러스의 증식이 최대인 시점에서 채득하여 사용직전까지 단시간 동안 얼음물에서 보관한다.

②(바이러스 시험균주 및 소독제 희석액) 소독제의 희석액은 상기 명시한 경수를 이용해 희석하며, 바이러스의 희석 용액은 Cell grade PBS를 이용함.

③(소독제 시험용액 준비) 시험에 사용되는 소독제는 시험균액과의 반응 전의 희석농도를 희석배수로 소독제 희석액을 준비한다.

④(소독제의 희석법) 예상되는 소독제의 유효희석배수가 500배 이하일 경우는 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 등으로 희석하되, 그 이상의 예상 희석배수 농도 및 더 정밀한 희석배수 산정을 위해서는 희석배수 농도를 달리할 수 있다.

⑤(소독제 반응) 500 μ l의 유기물 접종액을 만들고자 한다면 25 μ l BSA, 100 μ l 뮤신, 35 μ l Tryptone 혹은 효모추출물 용액과 340 μ l의 바이러스 배양액을 혼합하여 만든다. 한 개의 멸균된 Disk에 10 μ l의 바이러스 접종액을 Biosafety cabinet에서 충분히 건조시켜준다.(약 1시간) 건조된 Disk위에 소독제 희석액을 50 μ l를 접종하여 10분간 반응시킨다.

⑥(중화반응) 소독제와 병원체의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하기 위하여 즉시 Disk를 회수하여 4 $^{\circ}$ C의 2.0ml 중화배지에 넣고 혼합한 다음 적합한 양을 세포 또는 발육란에 접종하여 바이러스 함량을 측정한다.

⑦(바이러스 감염력 상실 정도 측정) 바이러스의 감염력이 상실된 정도는 일반적으로 microplate titration이나 plaque assay 방법을 사용한다. 발육란을 이용한 시험에서는 희석배수 당 5개 이상의 발육란을 사용하여 0.2ml를 요막강(allantoic cavity)에 접종하고 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 5일간 배양하고 매일 검란하며 바이러스의 증식유무를 검사한다.

⑧(바이러스 함유량 계산) Kaerber method로 한다.

⑨(대조군의 검정 등) 병원체 대조군은 경수조건에서 소독제 없이 실험하고 위의[⑥(중화반응)] 단계에서 병원체의 역가가 ml당 2×10^5 TCID₅₀ 이상이 확인되어야 하며, 독성대조군에서는 소독제에 의한 세포독성(종란을 사용하는 경우 종란독성)이 일어나지 않았음을 확인하여야 한다.

⑩(유효배수 평가) 병원체 대조군과 비교하여 병원체가 ml당 10^4 배(또는 TCID₅₀, EID₅₀, LD₅₀ 등, 이하 "PFU"라 한다)(상용대수로 환산한 값 4) 이상의 사멸 또는 불활화가 확인된 희석배수를 유효농도로 한다.

⑪(결과활용) 경수 또는 유기물처리구의 시험결과는 각각 바이러스와 세균의 소독제 시험 결과 희석배수와 비교하여 높은 소독제 농도를 최대 권장희석배수로 정한다.

④ 조류인플루엔자 방역에 활용 가능한 소독제 효능평가기준 개선을 위한 선행실험 진행

㉠ 미국 EPA 기준인 Disk carrier test를 모델로 한 소독제 효능 평가 선행실험

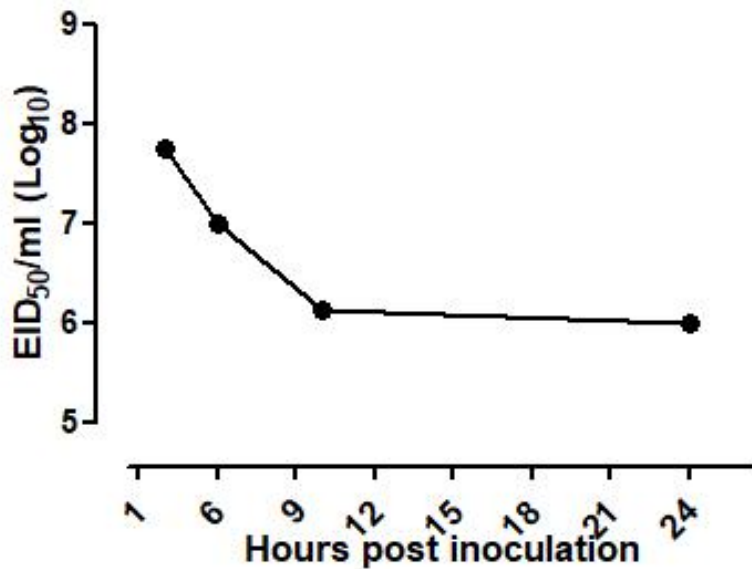
● Stainless disk를 이용한 조류 인플루엔자 바이러스 회수 실험

- 새로 정립한 Disk carrier test 실험을 진행하기 위한 선행실험으로 disk 에 바이러스를 건조 시킨 후, 충분한 양의 바이러스가 재분리 되는지에 대해 평가함. (재분리 양 2×10^5 EID₅₀ 이상)
- 본 실험을 위해 Stainless steel을 절단하여 Disk를 제작하였으며, 바이러스와 뮤신 (Mucin from bovine submaxillary gland, Sigma aldrich), BSA, Tryptone을 혼합하여 만든 접종액 50 μ l을 Disk 위에 접종하여 Biosafety cabinet에서 자연건조시킴.



<그림 7 Disk 도면(좌), Disk 실물(중간), Disk 위의 건조된 접종액(우)>

- 접종 후 2시간, 6시간, 10시간, 24시간 후에 Disk를 회수하여 바이러스의 역가를 10일령 발육란을 이용해 계산함.



<그림 8 Disk 회수 시간별 바이러스 재분리 양>

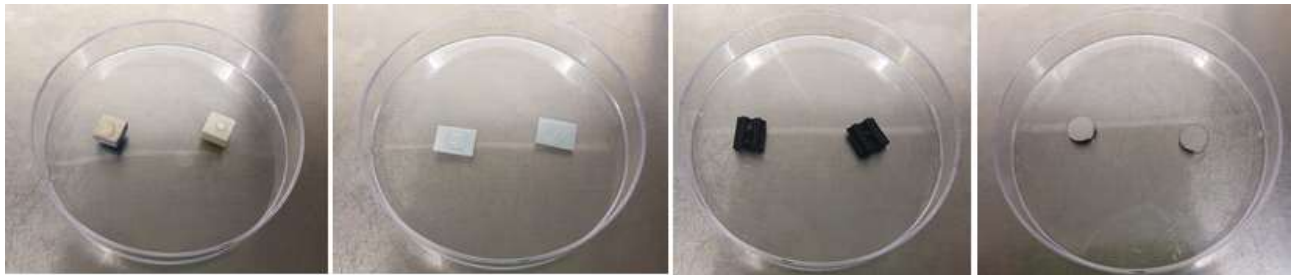
- 실험 결과 Disk에 접종액을 접종한 후, 완전건조까지 걸리는 시간은 약 2시간정도 소요 됐으며, 바이러스 재분리 실험 결과, 재분리 양은 시간이 지나면서 점점 감소하는 것을 확인할 수 있었음.
- 본 실험에서는 접종액을 50 μ l 접종하였지만 이보다 더 적은 양(10 μ l)를 접종해도 충분

한 양의 바이러스가 재분리 될 것으로 생각되며 이에 대한 추가 실험을 진행할 예정임.

㉔ 소독제의 적용 재질별 소독효능 검증을 위한 선행실험

● Disk carrier 실험의 응용을 위한 다양한 소재의 발굴

- 실제 방역 현장에 소독제가 적용되는 대상은 다양한데, 중요한 점은 바이러스가 다양한 환경 속에서 소독제와 반응했을 시, 재질에 따라 소독 효과가 현저히 다를 수 있음.
- 현장에서 소독제가 주로 사용되는 대상인 인체, 차량, 축사, 철새도래지를 모사할 수 있는 재질을 수집해 실험실적 실험으로 소독제의 효능을 평가하고자 함.
- 비흡습성 소재인 고무, 금속, 유리, 플라스틱, 타일을 확보하여 실험에 이용할 예정임.










<그림 9 타일, 플라스틱, 고무, 금속을 이용한 Disk 의 제작 예시>

- 흡습성 소재인 나무, 흙, 천은 재질별로 흡습하는 성질이 상이하기 때문에 많은 고찰이 필요해 보임.

(2) 2차년도 연구수행 내용 및 결과

(가) 소독제 선정

- ① 소독제로 사용되고 있는 대표적인 제형은 삼중염, 과초산+과산화수소, 알데히드, 4급암모늄, 복합 4급 암모늄, 차아염소산 등이 있음.
- ② 시중에서 판매되는 소독제 중 제형별로 많이 판매되는 소독제를 선정함.
- ③ 해외에서 가장 많이 팔리고 있는 소독제인 제품 G를 대조 소독제로 선정함.
- ④ 소독제는 아니지만 축사를 소독하는데 널리 사용되는 생석회는 수분과 반응하여 200℃이상의 열을 내어 소독효과를 내는 특성을 가지고 있음. 이는 Disk carrier 실험법으로 평가하기 어려워 본 연구에서는 제외함.

	제품 E	제품 C	제품 A	제품 D	제품 B	제품 F	제품 G
제형	삼중염	과초산+ 과산화수 소	산성제 알데히드	4급 암모늄	복합 4급 암모늄	차아염소 산	4급 암모늄계 열
실물							

<표 3 실험에 이용한 제형별 소독제 리스트>

(나) Disk 재질별 소독제 유효성 평가 실험

- ① Disk carrier 실험법을 바탕으로 한 Disk 재질별 소독제 유효성 평가 실험 진행
 - ㉠ 새로 정립한 Disk carrier test 실험법을 적용하여 시중에 판매되고 있는 소독제 유효성 평가 실험을 진행함.
 - ㉡ 농가에서 흔히 이용되고 있는 재질인 천, 유리, 금속, 고무, 나무, 돌, 플라스틱 총 7개의 재질의 Disk를 제작하여 실험에 이용함.



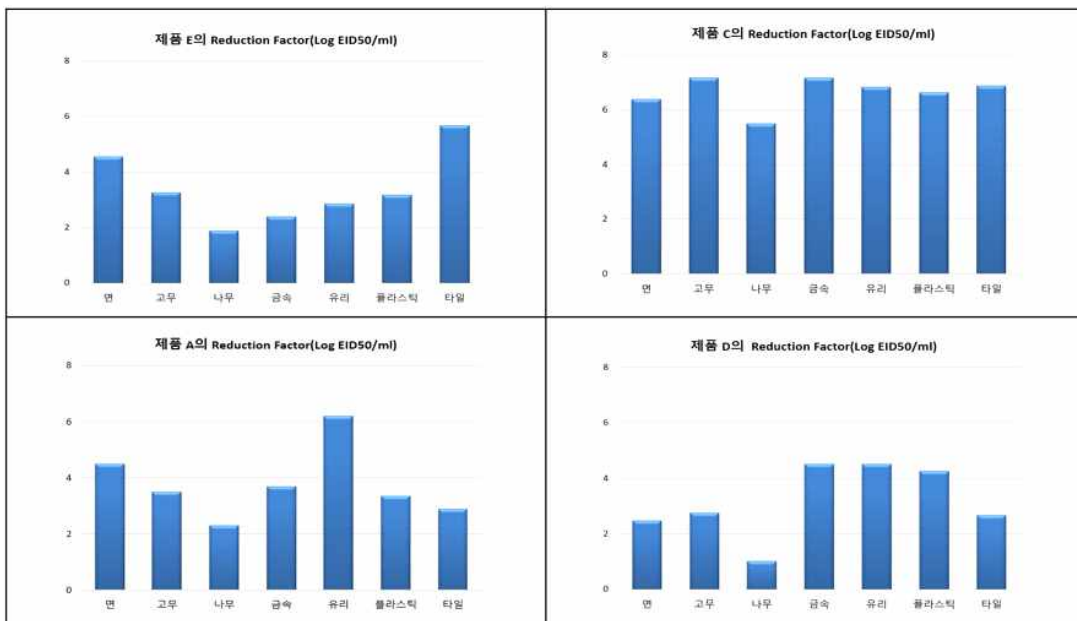
<그림 9 천, 유리, 금속, 고무, 나무, 돌, 플라스틱 Disk의 제작>

- ㉢ 깨끗이 세척한 7종의 Disk를 멸균한 후, 유기물을 함유한 바이러스 접종액을 10 μ l 집

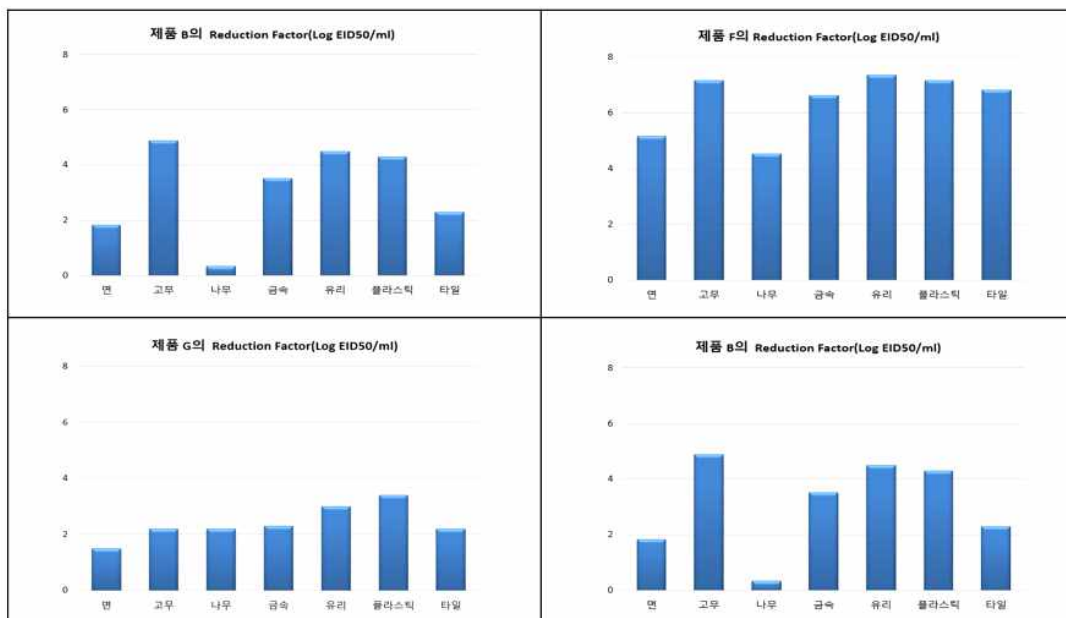
종한 후, BSC안에서 1시간 건조시킴.

- ㉠ 선정된 7종 소독제의 부표상에서 제시하는 소독제의 희석배율에 맞춰 경수를 이용해 소독제를 희석한 후, 바이러스가 건조된 Disk 위에 50 μ l 접종함.
- ㉡ 접종 후 10분후에 FBS가 들어있는 중화 배지에 Disk를 넣고 Vortexing하여 바이러스를 회수함.
- ㉢ 회수한 바이러스는 10진 희석하여 종란에 접종하고 대조군 대비 소독제가 바이러스를 얼마나 죽이는 지에 대해 평가함.

② Disk carrier 실험법을 바탕으로 한 Disk 재질별 소독제 유효성 평가 실험 결과



<그림 10 제품 E, 제품 C, 제품 A, 제품 D의 대조군 대비 살 바이러스능 평가>



<그림 11 제품 B, 제품 F, 제품 G의 대조군 대비 살 바이러스능 평가>

- ㉠ 실험 결과 제품 C(과초산+과산화수소수)와 제품 F(차아염소산) 소독제의 경우 면, 고무, 나무, 금속, 유리 플라스틱, 돌 Disk위의 바이러스를 충분히 사멸시키는 것으로 확인되었음.(상용대수로 환산한 값 4 이상)
- ㉡ 제품 E(삼중염)의 경우 면과 타일에서는 바이러스를 충분히 사멸시키고, 플라스틱에서 어느 정도 효과가 인정되나 나머지 재질에 있어서는 효과가 떨어짐.
- ㉢ 제품 A(알데히드)의 경우 면과 유리에서는 바이러스를 충분히 사멸시키고, 고무, 플라스틱에서는 어느 정도 효과가 인정되나 나머지 재질에 있어서는 효과가 떨어짐.
- ㉣ 제품 D(4급 암모늄)의 경우 금속, 유리, 플라스틱에서는 바이러스를 충분히 사멸시키지만 나머지 재질에 있어서는 효과가 떨어짐.
- ㉤ 제품 B(복합 4급 암모늄)의 경우 고무, 유리, 플라스틱에서는 바이러스를 충분히 사멸시키고, 금속에서는 어느 정도 효과가 인정되나 나머지 재질에 있어서는 효과가 떨어짐.
- ㉥ 대조 소독제로 이용했던 제품 G(4급 암모늄)의 경우 전 재질에서 효과가 떨어지는 것으로 확인 되었으며, 대조 소독제로서 이용에 부적합으로 판정함.

	제품 E	제품 C	제품 A	제품 D	제품 B	제품 F	제품 G
면	○	○	○	-	-	○	-
고무	-	○	*	-	○	○	-
나무	-	○	-	-	-	○	-
금속	-	○	*	○	*	○	-
유리	-	○	○	○	○	○	-
플라스틱	*	○	*	○	○	○	-
타일	○	○	-	-	-	○	-

<표 4 Disk 재질별 소독제 유효성 평가 결과(O : Reduction Factor ≥ 4
* : 4 > Reduction Factor ≥ 3 - : 3 > Reduction Factor)>

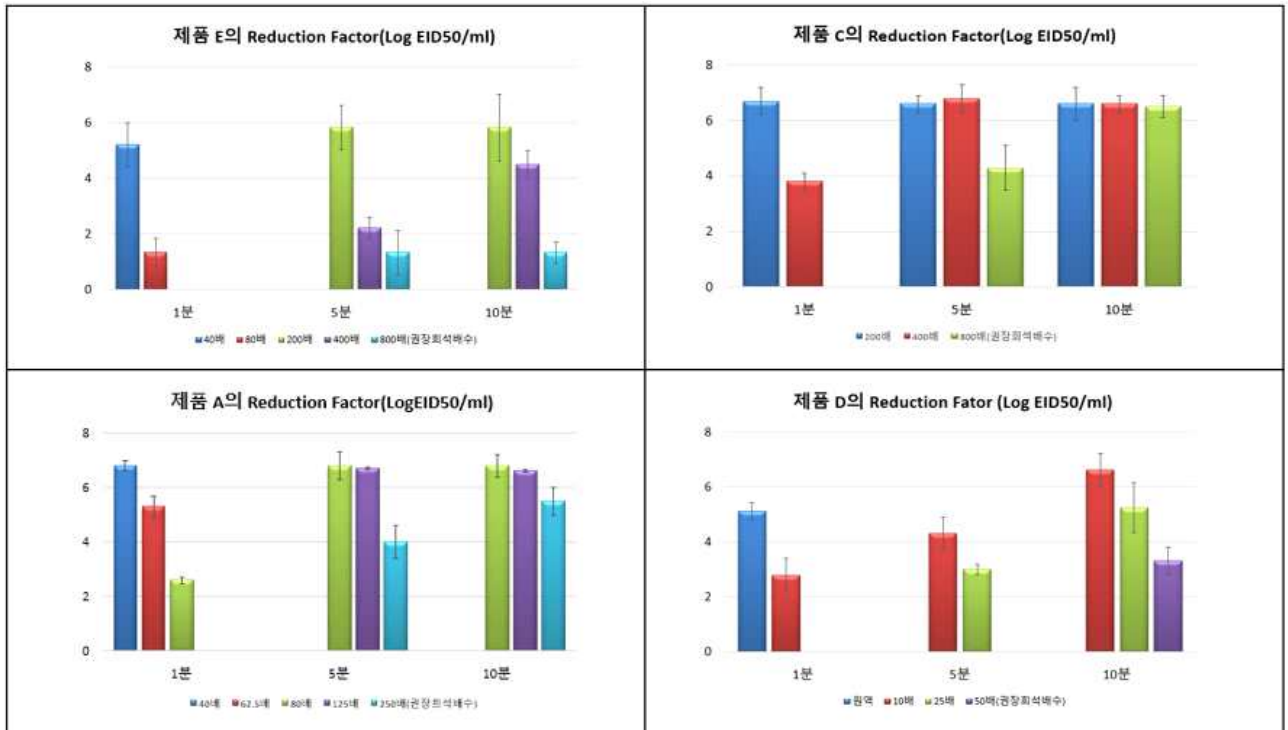
③ Disk를 이용한 단시간 내 소독제 효능 평가 실험

- ㉠ Disk carrier 실험법을 바탕으로 한 단시간 내 (1분, 5분, 10분) 소독제 유효성 평가 실험 진행
 - 새로 정립한 Disk carrier test 실험법을 적용하여 시중에 판매되고 있는 소독제 유효성 평가 실험을 진행함.
 - Disk carrier 실험법의 기본 조건인 10분 반응 시간을 변경하여 1분, 5분 조건을 추가하여 disk carrier 실험을 진행함.
 - 깨끗이 세척한 Stainless Disk를 멸균한 후, 유기물을 함유한 바이러스 접종액을 10 μ l 접종한 후, BSC안에서 1시간 건조시킴.
 - 선정된 7종 소독제의 부표상에서 제시하는 소독제의 희석배율에 맞춰 경수를 이용해 소독제를 희석한 후 50 μ l의 소독제를 적용하여 1분, 5분간 반응시킴.
 - 접종 후 1, 5분후에 FBS가 들어있는 중화 배지에 Disk를 넣고 Vortexing하여 바이러스를

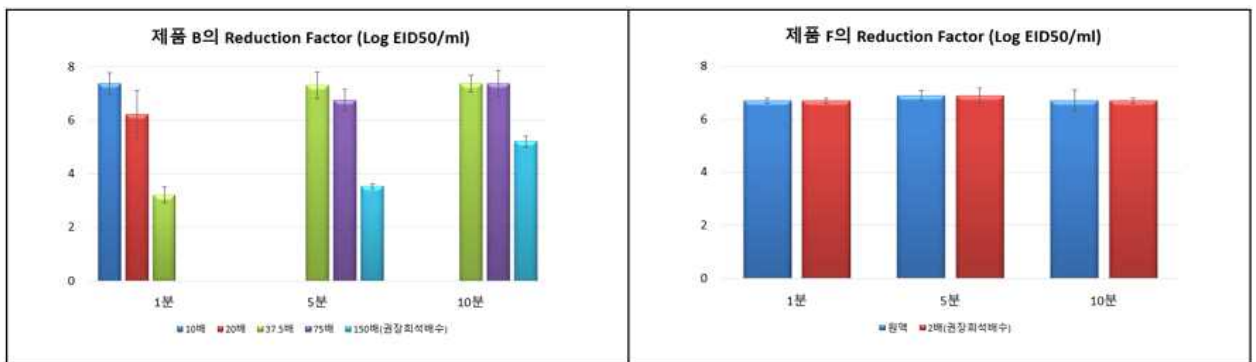
회수함.

- 회수한 바이러스는 10진 희석하여 종란에 접종하고 대조군 대비 소독제가 바이러스를 얼마나 죽이는 지에 대해 평가함.

㉔ Disk carrier 실험법을 바탕으로 한 단시간 내 (1분, 5분, 10분) 소독제 유효성 평가 실험 결과



<그림 12 제품 E, 제품 C, 제품 A, 제품 D의 단시간 내 대조군 대비 살 바이러스능 평가>



<그림 13 제품 B, 제품 F의 단시간 내 대조군 대비 살 바이러스능 평가>

- 실험 결과 제품 C, 제품 A, 제품 B, 제품 F 소독제는 권장 희석배수에서 표준 실험 조건인 Stainless steel Disk 위에서 10분간 반응시 상용대수로 환산한 값 4승 이상 바이러스 역가 감소를 보였음.
- 제품 E, 제품 D의 경우 기존의 검역원 실험법인 현탁액 실험에서는 효과가 있는 희석배수였지만, Disk carrier 실험법을 적용하여 실험을 진행했을 시 효과가 떨어지는 것으로 확인되었음. 이는 실제 현장에 소독제를 적용하였을 때, 실험실적 실험과 예상 결과가 상

이하에 나타날 수 있는 부분일 것으로 생각됨.

- 제품 E(삼중염)의 경우 부표상 권장희석배수는 800배 이지만 Disk carrier방법으로 유효 희석배수를 측정하였을 때, 400배로 확인 되었으며, 5분, 1분 안에 소독제 유효희석배수는 각각 200배, 40배로 확인되었음.
- 제품 C(과초산+과산화수소수)의 경우 부표상 권장 희석배수는 800배로 Disk carrier방법으로 유효 희석배수를 확인 하였을 때, 5분과 10분에서 동일하게 800배로 확인 되었으며 1 분 내 충분한 소독 효과를 확인하기 위해서는 4배정도 진한 200배로 확인되었음.
- 제품 A(알데히드)의 경우 부표상 권장 희석배수는 250배로 Disk carrier 방법으로 유효 희 석배수를 확인하였을 때, 5분과 10분에서 동일하게 250배로 확인 되었으며, 1분내에 충분 한 소독 효과를 확인하기 위해서는 4배정도 진한 62.5배로 확인되었음.
- 제품 D(4급 암모늄)의 경우 부표상 권장희석배수는 50배 이지만 Disk carrier방법으로 유효 희석배수를 측정하였을 때, 25배로 확인 되었으며, 5분, 1분 안에 소독제 유효희석배수 는 각각 75배, 20배로 확인되었음.
- 제품 B(복합 4급 암모늄)의 경우 부표상 권장 희석배수는 150배로 Disk carrier 방법으로 유효 희석배수를 확인 하였을 때, 10분에서 동일하게 150배로 확인 되었으며 5분 1분내 충분한 소독 효과를 확인하기 위해서는 2배, 약 8배정도 진한 75배, 20배로 확인되었음.
- 제품 F(차아염소산)의 경우 부표상 권장희석배수는 2배로 5분, 1분 조건에서도 충분히 소 독효과를 보이는 것으로 확인되었음.

	제품 E	제품 C	제품 A	제품 D	제품 B	제품 F
권장 희석배수 (부표)	800	800	250	50	150	2
유효 희석배수 (10분)	400	800	250	25	150	2
유효 희석배수 (5분)	200	800	250	10	75	2
유효 희석배수 (1분)	40	200	62.5	원액	20	2

- 실제 소독제가 반응하는 시간은 약 1~5분정도이므로 차량이 지나가는 분무 소독시설 등 빠르게 효과를 봐야 하는 시설에서는 소독제의 희석 배수를 약 2~8배정도 진하게 사용해 야 함을 확인하였고, 이는 제형별로 정도의 차이가 있음.

④ Disk를 이용한 저온조건 소독제 효능 평가 실험

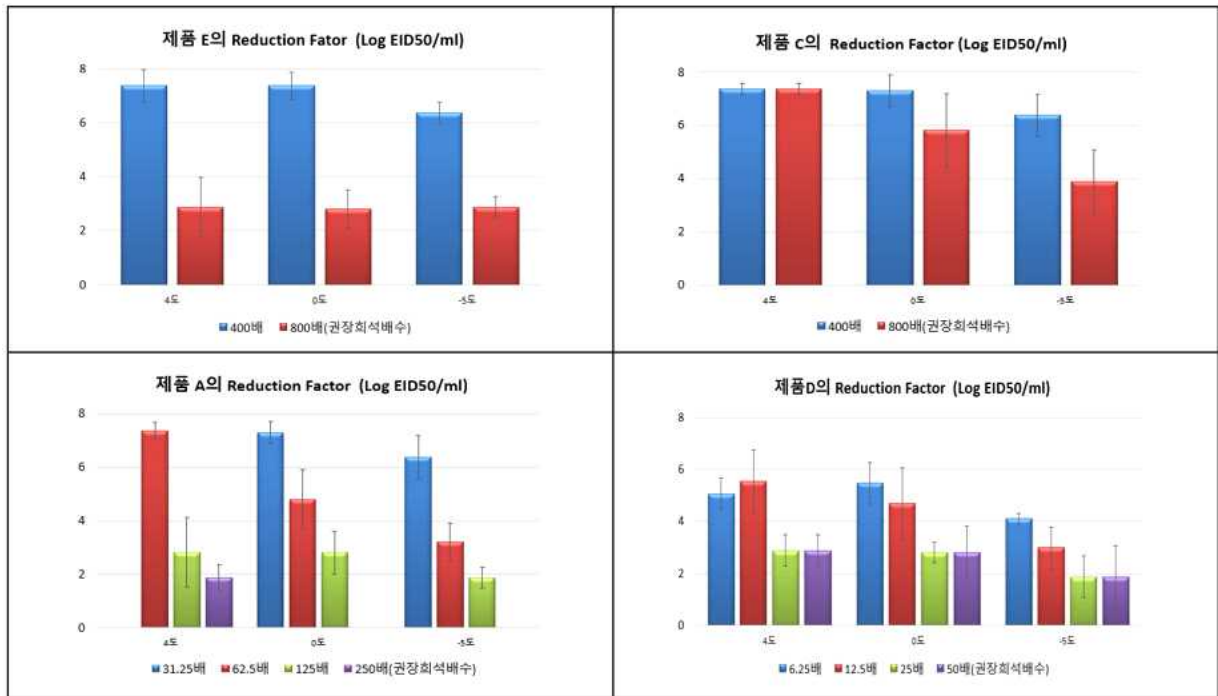
- ㉠ Disk carrier 실험법을 바탕으로 한 저온조건 소독제 유효성 평가 실험 진행
- 새로 정립한 Disk carrier test 실험법을 적용하여 시중에 판매되고 있는 소독제 유효성 평가 실험을 진행함.
- Disk carrier 실험법의 기본 조건인 상온 조건을 변경하여 4℃, 0℃, -5℃ 조건을 접하여 disk carrier 실험을 진행함.
- 깨끗이 세척한 Stainless Disk를 멸균한 후, 유기물을 함유한 바이러스 접종액을 10 μ l 접종한 후, BSC안에서 1시간 건조시킴.
- 선정된 7종 소독제의 부표상에서 제시하는 소독제의 희석배율에 맞춰 경수를 이용해 소독제를 희석한 후 온도 조절이 가능한 Bench안에 미리 30분정도 넣어두고 소독제의 온도가 떨어지는지 확인함.



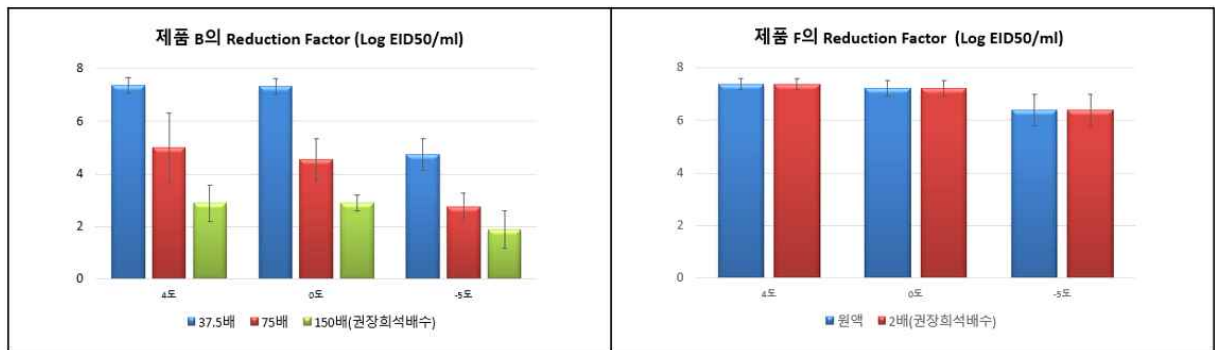
<그림 14 저온 Bench Disk carrier 실험 좌.0℃ 실험, 우.-5℃ 실험>

- BSC안에서 건조시킨 Disk를 저온 Bench로 옮겨서 30분정도 넣어둔 후 50 μ l의 소독제를 적용하여 10분간 반응시킴.
- 접종 후 10분후에 FBS가 들어있는 중화 배지에 Disk를 넣고 Vortexing하여 바이러스를 회수함.
- 회수한 바이러스는 10진 희석하여 종란에 접종하고 대조군 대비 소독제가 바이러스를 얼마나 죽이는 지에 대해 평가함.

㉔ Disk carrier 실험법을 바탕으로 한 저온조건 소독제 유효성 평가 실험 결과



<그림 15 제품 E, 제품 C, 제품 A, 제품 D의 저온조건 대조군 대비 살 바이러스능 평가>



<그림 16 제품 B, 제품 F의 저온조건 대조군 대비 살 바이러스능 평가>

- 예상했던바와 같이 실험 결과 온도가 낮아질수록 유효 희석배수가 낮아지는 경향을 보였음.
- 제품 E(삼중염)의 경우 부표상 권장희석배수는 800배였고 4°C, 0°C, -5°C에서 유효희석배수가 각각 400배로 확인되었음. Disk carrier 실험 표준 조건에서 유효희석배수가 400배로 확인되었던 사실을 바탕으로 하였을 때, 저온에서도 소독효과가 떨어지지 않는 것으로 생각됨.
- 제품 C(과초산+과산화수소수)의 경우 부표상 권장 희석배수는 800배로 4°C, 0°C에서도 800배의 유효 희석배수를 보였으며, -5°C에서 400배로 확인되었음. 실험 결과 비교적 다른 소독제에 비해서 저온에서도 소독 효과가 크게 떨어지지 않는 것으로 판단됨.
- 제품 A(알데히드)의 경우 부표상 권장 희석배수는 250배로 4°C, 0°C에서 유효 희석배수가 62.5배로 평가됨. 이는 다른 소독제에 비해 큰 폭으로 소독효능이 떨어지는 것으로 확인되었고, -5°C에서 31.25배로 4°C, 0°C에 비하여 2배정도 더 높은 농도로 사용해야함.
- 제품 D(4급 암모늄)의 경우 부표상 권장희석배수는 50배로 4°C, 0°C에서 유효 희석배수

가 12.5배로 평가됨. 이는 다른 소독제에 비해 큰 폭으로 소독효능이 떨어지는 것으로 확인 되었고, -5℃에서 6.25배로 4℃, 0℃에 비하여 2배정도 더 높은 농도로 사용해야함.

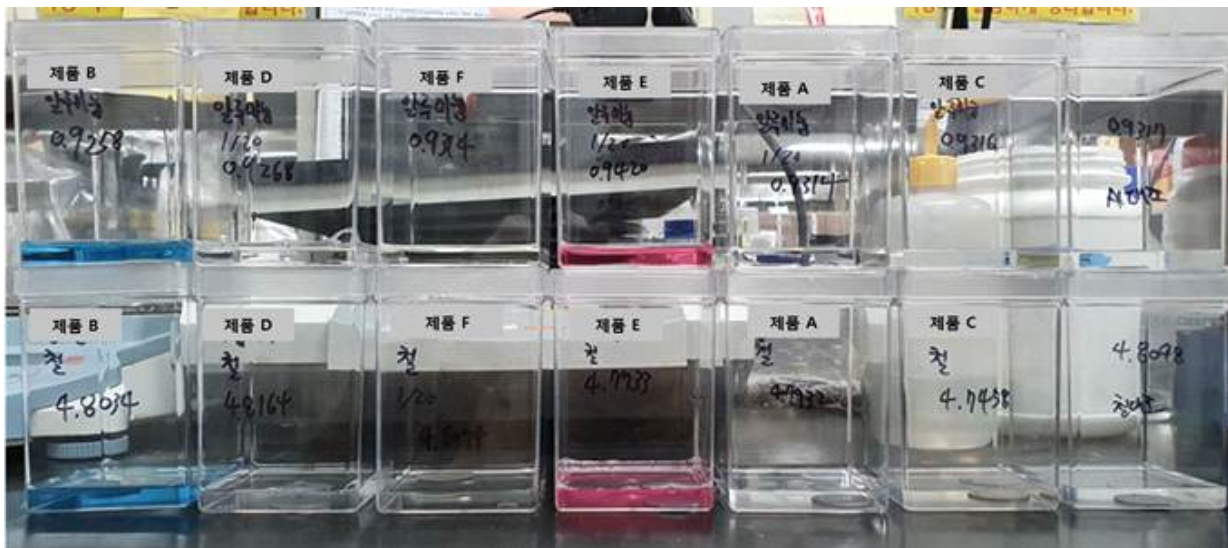
- 제품 B(복합 4급 암모늄)의 경우 부표산 권장 희석배수는 150배로 4℃, 0℃에서 유효 희석 배수가 75배로 평가됨. 이는 다른 소독제에 비해 중간정도로 소독효능이 떨어지는 것으로 확인 되었고, -5℃에서 37.5배로 4℃, 0℃에 비하여 2배정도 더 높은 농도로 사용해야함.
- 제품 F(차아염소산)의 경우 부표상 권장희석배수는 2배로 저온조건에서도 충분히 소독효과를 보이는 것으로 확인되었음.

	제품 E	제품 C	제품 A	제품 D	제품 B	제품 F
권장 희석배수 (부표)	800	800	250	50	150	2
유효 희석배수 (4℃)	400	800	62.5	12.5	75	2
유효 희석배수 (0℃)	400	800	62.5	12.5	75	2
유효 희석배수 (-5℃)	400	400	31.25	6.25	37.5	2

⑤ 소독제의 금속 부식성 실험

㉔ 철, 알루미늄 Disk를 이용한 금속 부식성 실험

- 겨울철 차단 방역시에 차량에 소독제를 많이 사용하고 있는데, 차량에 이용시 효능도 중요 하지만 권장 희석배수에서 소독제를 적용할 시 차량에 대한 부식성을 확인해야할 필요가 있음.
- 대부분의 차체는 철과 알루미늄으로 이루어져있으며 차량의 도색이 벗겨졌을 때 빗물에도 쉽게 녹이 스는 것을 볼 수 있음.
- 실험적으로 소독제의 부식성을 확인하기 위해 ASTM G1-03 Standard for Corrosion Test를 바탕으로 실험을 기획하였으며, 소독제와 반응한 7일 후 녹을 제거하고 철, 알루미늄의 무게 변화를 관찰함.



<그림 15 권장희석배수로 희석한 소독제의 금속의 부식성 정도 실험>

- 코팅되지 않은 직경 2cm 정도의 철과 알루미늄 Disk를 준비하고 세제를 이용하여 잘 세척한 후, 건조기에 넣어 완전히 건조시킴.
- 소독제를 수돗물을 이용하여 권장 희석배수대로 희석한 후 Incu tissue에 50ml 씩 소분하

고, 건조된 철과 알루미늄 Disk를 무게를 측정하여 소독제에 담금.

- 매일 Disk 가 산화하는 것을 관찰하고, 7일후 수세미를 이용하여 부식된 부분을 제거하고 소독제 적용 전후의 무게 변화를 기록함.

㉠ 철, 알루미늄 Disk를 이용한 금속 부식성 실험 결과



<그림 16 소독제 적용 7일 후 육안 관찰 결과>

소독제 적용 전 무게								
	제품 E	제품 C	제품 A	제품 D	제품 B	제품 F	제품 F FMD	대조
철 (g)	4.7933	4.7458	4.7932	4.8164	4.8034	4.8094	4.7444	4.8048
알루미늄 (g)	0.942	0.9316	0.9314	0.9268	0.9258	0.9314	0.9281	0.9317

소독제 적용 후 무게 (7d)								
	제품 E	제품 C	제품 A	제품 D	제품 B	제품 F	제품 F FMD	대조
철 (g)	4.7807	4.7245	4.7869	4.8105	4.7843	4.5638	4.7249	4.7973
알루미늄 (g)	0.9407	0.9315	0.9321	0.9275	0.9247	0.9275	0.9275	0.9305

소독제 전 후 무게 차이								
	제품 E	제품 C	제품 A	제품 D	제품 B	제품 F	제품 F FMD	대조
철 (g)	0.0126	0.0213	0.0063	0.0059	0.0191	0.2456	0.0195	0.0075
알루미늄 (g)	0.0013	0	-0.0007	-0.0007	0.0011	0.0039	0.0006	0.0012

<표 6 소독제 적용 전, 후 무게 변화>

- 가장 두드러지게 부식성이 드러난 소독제는 제품 F(조류인플루엔자 기준)로 적용한지 1시간 이내에 철에서 녹이 생기는 것을 관찰 할 수 있었으며, 소독제 적용 7일 후에도 육안적으로 다른 소독제들에 비해서 녹이 많이 생성된 것으로 확인되었음.

- 제품 F의 구제역 적용 기준(권장 희석배수 50배)에서는 조류 인플루엔자 적용 기준(2배) 보다는 녹 생성이 비교적 적게 관찰되었지만 그래도 소독제의 여러 제형 중에는 녹을 많이 생성하는 것을 볼 수 있었음.
- 제품 F의 구제역 적용 기준과 비슷한 정도로 제품 C 소독제가 녹을 많이 생성하였고, 비교적 다른 소독제보다 빠르게 녹을 생성하였음.
- 제품 E의 경우에는 약간의 금속 부식성을 보였으며, 제품 A과 제품 D의 경우 일반 수돗물만 넣은 대조와 거의 유사한 정도로 부식시키는 것으로 보아 거의 부식력이 없는 것으로 판단됨.

(다) 연구결과를 토대로 한 소독제 사용 권장 사항

- ① 기존의 알려진 연구 결과와 본 과제를 진행하면서 얻게 된 자료를 바탕으로 하여 소독제 특성 및 권장 사항을 작성함.
- ② 기존의 겨울철 소독제 권장 희석 배수를 유효 성분의 %로 표시되어있어서 실질적으로 얼마나 희석을 해야 하는지에 대해 모호함. 이를 해결하기 위해 기존의 권장 희석배수에서 얼마나 더 진하게 사용해야 지를 표시하면 사용자가 이해하기 쉬울 것으로 사료됨.
- ③ 기존의 소독제 추천 시스템에서는 소독제의 접촉시간이 10~30분등으로 다양하게 표기 되어있는데, 실제 소독제가 적용되는 시간은 5분 내외 이므로 이와 관련한 규정이 필요하고 규정된 시간 이내에 효과를 보일 수 있는 소독제의 희석배수를 제안해야 함.
- ④ 수생 독성 조건을 추가하여 생태로 흘러갈 수 있는 소독제의 환경독성 우려에 대한 기준 점을 마련하였고, 소독제 선정 시 큰 도움이 될 것으로 생각됨.

주성분	겨울철 권장 희석배수	추천 적용 대상	소독제 접촉 시간	금속 부식성	비고
복합 4급 암모늄(구연산)	권장 희석배수의 4배	단단한 표면	10분 이내	+	온도의 영향 큼
4급 암모늄	권장 희석배수의 8배	단단한 표면	10분 이내	-	단시간내 소독효과 떨어짐
차아염소산	-	범용 사용 가능	10분 이내	++	철 부식성 유의
삼중염	권장 희석배수의 2배	의복, 콘크리트 등 다공성 물질	10분 이내	+	온도의 영향 적음
과산화수소+과초산	권장 희석배수의 2배	범용 사용 가능	10분 이내	++	철 부식성 유의
글루타르알데히드	권장 희석배수의 8배	단단한 표면	10분 이내	-	흡입독성 유의 온도의 영향 큼

<표 7 소독제 사용시 필요한 기준안 재정립>

(라) 스프레이 코팅 소독제의 유효성 평가 기준안 마련

① 코팅 소독제 효능 지속성 평가법 문헌 조사

㉠ 한국의 코팅 소독제 효능 지속성 평가법 및 평가 사례

- 한국은 코팅형 소독제 또는 지속성 소독제의 유효성 평가 기준이 없음. 농림축산검역본부에 유선으로 확인한 결과 현재 평가 규정 재정립을 위한 작업이 진행 중에 있다고 함.

㉡ 미국의 코팅 소독제 평가법 및 평가 사례

- 미국의 공인 코팅형 소독제 평가법으로 미국 환경보호국 (US EPA)에서 발표한 Standard Operating Procedure for OECD Quantitative Method for Evaluating Bactericidal and Mycobactericidal Activity of Microbicides Used on Hard, Non-Porous Surfaces (SOP Number: MB-25-04, Date Revised: 2017.12.04)와 Standard Operating Procedure for Quantitative Disk Carrier Test Method (QCT-2) Modified for Testing Antimicrobial Products Against Spores of Clostridium difficile (ATCC 43598) on Inanimate, Hard, Non-porous Surfaces (SOP Number: MB-31-03, Date Revised: 2014.06.12)가 있음.
- 위 기준들은 움직이지 않고 천공이 없는 단단한 표면에 적용된 코팅형 소독제의 효능을 각각 일반세균과 아포를 가지는 세균을 이용하여 평가하는 방법임 [표1, 표2]. 미국 정부에서 공식적으로 인정하는 바이러스를 이용한 코팅형 소독제 평가법은 찾을 수 없었음.
- 시험 미생물을 표면에 올려서 건조시킨 뒤 시험하려는 소독제를 추가로 올리는 방법으로, 미생물과 소독제 사이의 반응 시간을 조절할 수 있어서 표면 적용 소독제의 속효성을 시험하는데 유리한 방법임.

MB-25-04	
시험시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> - 소독제의 부적절한 중화는 결과에 영향을 줄 수 있으므로 효능 평가 전에 중화제의 효능을 먼저 확인해 두어야 함. - 시험 중, 디스크에서 물질이 흘러내릴 경우 해당 디스크는 폐기하고 시험을 처음부터 다시 진행하여야 함. - 시험 물질과 대조 물질을 올릴 때 피펫 팁으로 디스크의 표면을 건드리지 않도록 다룰 때 주의해야 함.
시험 미생물	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC #15442), <i>Salmonella enterica</i> (ATCC #10708), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC #6538), <i>Mycobacterium terrae</i> (ATCC #15755).</p>
시험 재료	<ul style="list-style-type: none"> - 세균 배양 배지 : Tryptic soy Broth(TSB), 부피비율로 글리세롤을 15% 첨가한 TBS, Tryptic soy agar (TSA), 5% 양 혈액을 첨가한 TSA, Middlebrook 7H9 broth with 10% (v/v) ADC enrichment and 15% (v/v) glycerol (MADC), Middlebrook 7H11 agar - 시약 : 1X Phosphate buffered saline (PBS), 부피비율로 Tween-80을 0.1% 첨가한 PBS (PBS-T), 부피비율로 sodium thiosulfate을 0.1% 첨가한 PBS-T(염소계 소독제 평가시 중화제로 사용함), soli load(BSA, 효모 추출물, mucin 혼합물), 소독제 희석액 A(3차 증류수에 19.84 g anhydrous magnesium chloride (or 42.36 g MgCl·6H2O)과 46.24 g anhydrous calcium chloride (CaCl2)를 희석하여 준비), 소독제 희석액 B(35.02 g NaHCO3), 경수(소독제 희석액 A 6ml과 소독제 희석액 B 8ml, 나머지 증류수로 총 1L), Laboratory grade sodium hypochlorite (NaOCl) with total chlorine ≥4%. Liquinox (1% solution)나 그에 상응하는 사용 후 디스크 소독액, 그람 염색액, 항산염색액 - carrier : 직경 1cm, 두께 0.8mm, 거친 표면을 가지는 스테인레스강으로 만든 디스크로 1회 사용 후 폐기함, 사용 전 육안 관찰로 녹이 슬거나 깊은 홈이 있는 디스크는 사용하지 않음, 고온 멸균 후 반드시 건조시켜서 사용함. - 0.2 μm PES membrane filters
시험 방법	<ul style="list-style-type: none"> - 시험 미생물 340ul를 soli load(BSA 25ul, 효모 추출물 35ul, 뮤신 100ul)와 혼합함. 준비한 최종 시험 미생물 혼합물은 제조 이후 30분 이내에 사용해야 함. - 시험 미생물을 한 디스크에 10ul 올리고 미생물이 바짝 건조될 때까지 기다림. SOP에서는 진공을 유발할 수 있는 건조기기를 이용하여 22±2℃에서 30-50분에 걸쳐서 건조시킴. - 시험 미생물 접종 후 온도와 건조 시간을 제어하여 건조시킨 디스크 중 시험하려는 소독제 1가지당 최소 3개의 디스크에 시험 물질을 50ul씩 투여함. 만약 시험하려는 소독제가 거품이 생기지 않는 에어로졸이거나 스프레이로만 사용할 수 있는 제품이라면 정확한 양을 사용할 수 있도록 소독제를 다른 멸균 튜브에 옮겨 담은 뒤 피펫을 이용하여 사용함. 소독제와 시험 미생물이 반응하도록 약간의 시간을 둔. - 대조 디스크(소독제를 적용하지 않는 디스크)에는 PBS를 50ul 투여하고 소독제 투여 디스크와 같은 시간동안 반응시킴. - 반응이 끝난 디스크는 상온의 10ml 중화제에 담아서 가볍게 볼텍싱함. 이 용액을 10⁰희석액으로 삼음. - 10⁰희석액을 필요한만큼 10진 순차희석함. 이후 순차희석한 희석액을 필터함. 서로 다른 튜브에 담긴 희석액은 각각 서로 다른 필터를 사용해야 함. - 필터를 세균 배지에 올려서 얼마나 자라는지 확인함. 시험 미생물 종류에 따라서 1일에서 14일까지 소요됨. - 각 배지당 세균 집락이 200개가 넘을 때는 Too Numerous to Count(TNTC)로 기록하고, 각 희석배수별 세균 집락의 개수를 log reduction으로 평가함.

<표 8 미국 EPA에서 발표한 일반세균을 이용한 코팅형 소독제 평가법 요약>

MB-31-03	
시험시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> - 소독제의 부적절한 중화는 결과에 영향을 줄 수 있으므로 효능 평가 전에 중화제의 효능을 먼저 확인해 두어야 함. - 시험 중, 디스크에서 물질이 흘러내릴 경우 해당 디스크는 폐기하고 시험을 처음부터 다시 진행하여야 함. - 산소는 시험 미생물의 활성과 성장에 심각하게 영향을 주기 때문에 시험 미생물은 엄격하게 관리된 혐기성 환경에서 배양하여야 함.
시험 미생물	<i>Clostridium difficile</i> (ATCC #43598).
시험 재료	<ul style="list-style-type: none"> - 세균 배양 배지 : Brain-heart infusion agar with yeast extract, horse blood and sodium taurocholate (BHIIY-HT). 살아있는 아포의 수를 세기 위한 Pre-reduced recovery medium (Anaerobe Systems, Morgan Hill, CA) - 시약 : 1X Phosphate buffered saline (PBS), Tween-80을 0.1% 첨가한 PBS(중화제, 소독제에 맞추어 다른 물질로도 준비 가능), soli load(BSA, 효모 추출물, mucin 혼합물), 소독제 희석액 A(3차 증류수에 19.84 g anhydrous magnesium chloride (or 42.36 g MgCl·6H₂O)과 46.24 g anhydrous calcium chloride (CaCl₂)를 희석하여 준비), 소독제 희석액 B(35.02 g NaHCO₃), 경수(소독제 희석액 A 6ml과 소독제 희석액 B 8ml, 나머지 증류수로 총 1L), Liquinox, 아포 염색액(0.5% malachite green과 0.5% safranin) - carrier : 직경 1cm, 두께 0.7mm, 거친 표면을 가지는 스테인레스강으로 만든 디스크로 1회 사용 후 폐기함, 사용 전 육안 관찰로 녹이 슬거나 깊은 홈이 있는 디스크는 사용하지 않음, 고온 멸균 후 반드시 건조시켜서 사용함. - 0.2 μm PES membrane filters
시험 방법	<ul style="list-style-type: none"> - 아포 340ul를 soli load(BSA 25ul, 효모 추출물 35ul, 뮤신 100ul)와 혼합함. - 최종 아포 혼합물을 한 디스크에 10ul 올리고 BSC에서 건조될 때까지 30분 내외로 기다림. 피펫 팁이 캐리어에 닿지 않도록 주의하며, 1회 실험용으로 만드는 디스크는 모두 같은 팁으로 혼합물을 올림. 아포 혼합물이 가쪽으로 흐른 디스크는 폐기함. - 다 마른 디스크는 진공관이 연결된 건조장치로 옮기고 페트리 디쉬의 뚜껑을 연 뒤 상온, 진공 상태에서 2시간 동안 추가로 건조함. 2시간 뒤 진공을 끄고 디스크의 상태를 살펴서 아포 혼합물이 표면에서 흘러내린 디스크는 폐기하고, 남은 디스크를 밤새 진공을 켜지 않은 건조장치에 보관함. 시험은 다음날 진행함. - 시험하려는 소독제 1가지당 최소 10개의 디스크에 시험 물질을 50ul씩 투여함. 디스크마다 새 팁을 사용함. 소독제와 시험 미생물이 반응하도록 약간의 시간을 둠. SOP는 5분 ± 3초를 제시함. - 대조 디스크(소독제를 적용하지 않는 디스크)에는 PBS-T를 50ul 투여하고 소독제 투여 디스크와 같은 시간동안 반응시킴. - 반응이 끝난 디스크는 상온의 10ml 중화제에 담아서 가볍게 볼텍싱함. 이 용액을 10⁰희석액으로 삼음. - 10⁰희석액을 필요한만큼 10진 순차희석함. 이후 순차희석한 희석액을 필터함. 서로 다른 튜브에 담긴 희석액은 각각 서로 다른 필터를 사용해야 함. - 필터를 Pre-reduced BHIIY-HT에 올림. 필터와 배지 표면 사이에 공기가 들어가지 않도록 주의함. 배지 포장을 뜯은지 50±10분 안에 혐기 상태로 옮겨야 함. 36℃, 혐기환경에서 48시간 정도 배양한 뒤 CFU를 측정함. - 각 배지당 세균 집락이 200개가 넘을 때는 Too Numerous to Count(TNTC)로 기록하고, 각 희석배수별 세균 집락의 개수를 log reduction으로 평가함.

<표 9 미국 EPA에서 발표한 아포를 가지는 세균을 이용한 코팅형 소독제 평가법 요약>

(마) OECD 공인 코팅 소독제 평가법

- OECD에서는 화학 물질을 평가하는 여러 가지 공식 평가법을 제시하였는데 표면에 천공이 있는지 없는지로 나누어 각각의 경우에 대한 표면 소독제 평가법을 제시함. 천공이 없는 단단한 표면에 적용된 소독제 평가법은 GUIDANCE DOCUMENT ON QUANTITATIVE METHODS FOR EVALUATING THE ACTIVITY OF MICROBICIDES USED ON HARD NON-POROUS SURFACES (ENV/JM/MONO(2013)11)이고, 천공이 있는 물질의 평가법은 GUIDANCE DOCUMENT FOR QUANTITATIVE METHOD FOR EVALUATING ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF POROUS AND NON-POROUS ANTIBACTERIAL TREATED MATERIALS(ENV/JM/MONO(2014)18)임.
- 이 평가법은 주로 세균에 대한 소독 효능만 판단할 수 있는 다른 평가법과 달리, 기본적인 실험 방식은 같지만 미생물에 따라 구체적인 내용에서 변형을 두는 형태로, 세균, 마이코박테리아, 곰팡이, 바이러스에 대한 평가법을 제시하는 특징이 있음.

① 새로운 평가법 정립

㉔ 임시 기준 시험법

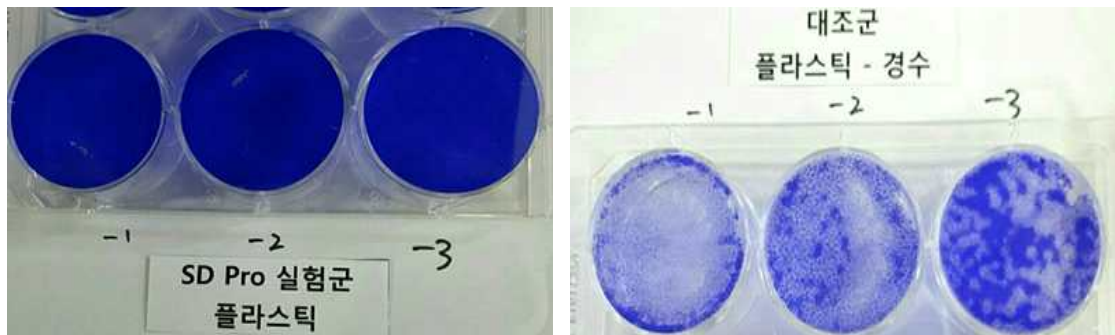
- 임시 기준 시험 방법은 농림축산검역본부의 [소독제 효력시험지침]와 EPA disk carrier test를 중심으로 코팅형 소독제의 특성을 감안하면서 정함. 임시 기준으로 실험실 내 평가를 진행하고, 결과에 따라 방법을 조금씩 개선하여 가장 적절한 방법을 선정하기로 함.
- 평가 시험에 사용되는 시험단위는 직경 1cm 스테인리스와 7x5cm 플라스틱으로 정함. 축산 시설과 기기에서 주로 사용하는 재질을 기준으로 삼아 시험 재질을 선정함.
- 소독제를 도포하려는 스테인리스와 플라스틱은 121℃에서 고압멸균 후 완전히 건조함.
- 시험은 멸균만 한 물품, 경수로 코팅한 물품, 유기물희석액으로 코팅한 물품에서 각각 진행함. 경수와 유기물희석액은 농림축산검역본부의 [소독제 효력시험지침]에 따라 준비함.
- 지속성을 평가할 때는 무처리, 경수 및 유기물이 도포된 플라스틱 및 유리 표면에 코팅형 소독제 분사 및 건조 후 바이러스를 처리함. 속효성을 평가할 때는 미국 방식대로 바이러스를 먼저 코팅하고 소독제를 분사함.
- 바이러스 코팅은 107 TCID₅₀/ml의 농도의 인플루엔자 바이러스를 스프레이로 분사함. 소독제가 시험하려는 표면 전체에 닿아 있기 때문에 바이러스도 표면 전체에 닿을 수 있도록 분사를 선택함.
- 대조군은 멸균 후 아무 처리도 하지 않은 스테인레스와 플라스틱으로, 같은 농도 인플루엔자 바이러스를 스프레이로 분사함.
- 농림축산검역본부의 [소독제 효력시험지침]에 나온 기준대로 4℃에서 30분 동안 반응시킴. 일반적으로 소독제는 상온에서 가장 효능이 좋고 온도가 낮아질수록 그 소독 효능이 감소함. 그래서 저온에서 효과가 좋으면 상온에서도 효과가 있을 것이라 생각하고 저온 반응만 평가하기로 함.
- MEM 세포배양용 배지가 담긴 코니컬 튜브에 시험 물체를 담아서 볼텍싱하는 방식으로 인플루엔자 바이러스를 회수하고, 같은 종류의 배지로 순차희석한 뒤 MDCK에 접종함.
- 바이러스 접종 후 37℃ 인큐베이터에서 2일 배양 후 plaque assay를 진행함.
- 임시 기준 시험법으로 3반복하여 시험한 결과, 코팅형 소독제를 적용한 표면에서 바이러스

스가 확연히 적게 회수되는 것을 확인함

구분	시험물질	인플루엔자 바이러스 회수량 (PFU/ml) ^A		
		처리조건		
		무처리	경수	유기물
SD Pro	유리	<50	<50	<50
	플라스틱	<50	<50	<50
대조군	유리	3.7x10 ⁵	4.1x10 ⁵	8.6x10 ⁴
	플라스틱	3.9x10 ⁵	3.3x10 ⁵	7.9x10 ⁴

<표 10 SD Pro 스프레이의 저병원성 인플루엔자 바이러스에 대한 plaque assay 결과>

- A PFU/ml: Plaque counting을 보다 용이하게 하기 위하여 crystal violet으로 세포단층을 염색. 건강한 세포는 dye를 흡수하여 염색이 되고, 감염된 세포는 염색되지 않고 무색으로 확인되어 plaque 수를 세어 plaque forming units per ml(PFU/ml)로 나타냄.
- B 저병원성 인플루엔자 바이러스(107/ml)를 시험물질 처리조건 별 유리, 플라스틱등 동일면적(7x2.5cm)의 시험물질에 점적시켜 잔존 바이러스를 회수하여 역가를 측정하였으며, 시험물질의 특성에 따라 잔존 바이러스의 회수 정도가 차이가 있음을 확인함.



<그림 17 SD Pro 스프레이의 저병원성 인플루엔자 바이러스에 대한 plaque assay 결과>

② 내동형 친환경 소독제의 개발

㉑ 문헌 연구를 통한 동결방지제 성분 및 특성

- 기존에 주로 사용되는 동결방지제 성분으로는 Ethylene glycol, Propylene glycol, Alcohols(특히 methanol), Glycerol, Calcium chloride 등이 있음. 이러한 물질들은 대량생산이 용이하고 보관시 안정적이라는 장점이 있어서 부동제로 널리 사용됨. 그러나 원료의 특성상 주로 액상제제로 개발하기 때문에 제품의 회석배율이 한정적이고, 부동성을 가지는 농도도 상대적으로 높은 편임. 특히 환경독성을 보이는 원료가 많고 생산단가가 높아 방역용소독제에 혼합하여 사용하기에는 무리가 있음.
- 기존 사용 성분들의 단점을 보완하기 위하여 새로 개발하려는 동결방지제의 구성성분은 합리적인 생산 단가를 가질 수 있도록 원료의 가격이 저렴해야 하고, 방역 목적으로 축산용 소독제와 혼합하여 야외에서 대용량으로 사용할 수 있도록 환경독성이 낮아야 함. 또한 이동 및 보관이 편리하고 다목적 사용에 용이하도록 가루형으로 개발할 수 있어야 함.

성분명	수용성	생분해성	부식성			환경영향			
			금속	콘크리트블록	콘크리트구조물	수질/수생동물	대기	토양	식물
Potassium Acetate	높음	높음	낮음	낮음	낮음	보통	낮음	낮음	낮음
Calcium Magnesium Acetate	양호	높음	낮음/보통	보통/높음	낮음	높음	낮음	낮음	낮음
Magnesium Chloride	양호	높음	높음	낮음/보통	높음	보통	낮음	낮음/보통	높음
Sodium Chloride	높음	높음	높음	낮음/보통	높음	보통	낮음	보통/높음	높음
Calcium Chloride	양호	높음	높음	낮음/보통	높음	보통	낮음	낮음/보통	높음
Potassium Succinate (Trihydrate)	양호	높음	낮음	낮음	낮음	보통	낮음	낮음	낮음
Malic Acid	높음	높음	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

<표 11 선발 성분의 화학적/ 생물학적 특징>

㉔ 동결방지 주성분과 보조성분을 혼합하여 만든 동결방지 후보제의 물리 화학적 특성 연구

- 용해도 및 발열 정도 조사를 위해 동결방지 후보제를 경수희석액 또는 5%유기물희석액으로 5배 희석함. 각각 희석액은 농림축산검역본부의 소독제 효력 확인 고시의 「바이러스의 소독제 유효 희석배수 결정시험」 소독제 효력지침의 별표 2의 규정대로 제조함. 희석 후 용해도는 덩어리가 생기면서 가라앉거나 층이 분리되는 등의 현상이 발생하는지, 따로 흔들거나 vortexing 장비를 사용하지 않아도 가루가 완전히 사라지는지 등을 육안으로 관찰함. 발열 정도는 동결방지 방지제에 온도 센서를 연결하여 시간이 지남에 따라 발열 정도를 확인함.



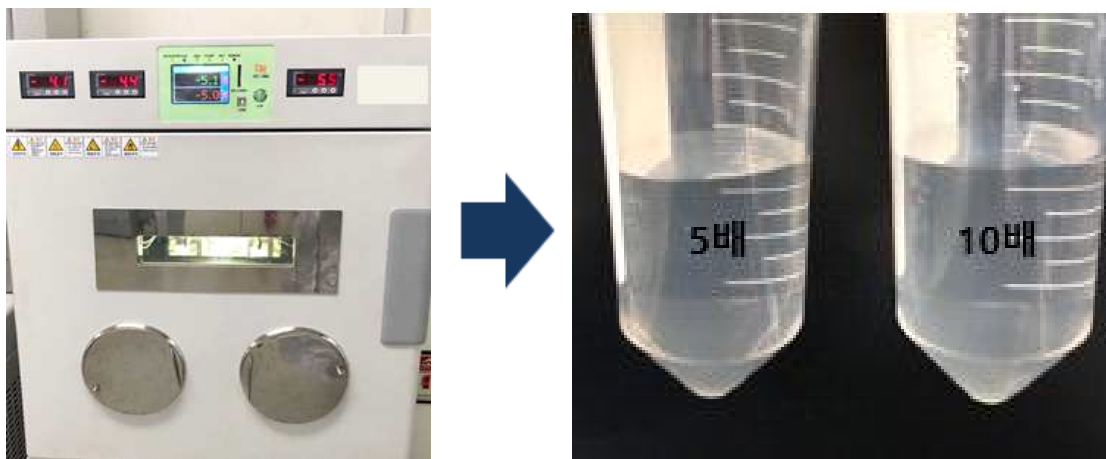
<그림 18 동결방지 후보제의 용해도 확인시 온도 변화 관찰>

- 동결방지 후보제 용해도 확인 시험결과 3가지 조성 모두 경수희석액과 유기물희석액에 잘 녹는 것을 관찰함. 발열 정도는 조성에 따라 매우 큰 차이를 보이는 것을 관찰함. 안정적인 사용을 위하여 지나친 발열을 제어하는 방향으로 개발을 진행하기로 하고 Lot3을 주요 후보 물질로 정함. 관찰 결과는 표 12으로 정리함.

후보제	pH	희석액	용해도	결과
Lot1	4.3	경수	매우 우수	55℃~60℃도 정도의 발열반응
		5% 유기물	매우 우수	
Lot2	5.2	경수	매우 우수	36℃~37℃도 정도의 발열반응
		5% 유기물	매우 우수	
Lot3	5.0	경수	매우 우수	30℃~33℃도 정도의 발열반응
		5% 유기물	매우 우수	

<표 12 동결방지 후보제 용해 후 물리화학적 특성>

- 동결방지 후보제 Lot 3의 내동성을 확인하기 위하여 후보제를 경수희석액으로 5배, 10 배 희석한 뒤 그림 2와 같이 -5℃로 설정된 밀폐형 저온실험기기에 24시간 두고 관찰 함. 희석 배수가 커지면 농도가 줄어들어 더 쉽게 얼어붙을 수 있지만, Lot3은 5배, 10 배 희석액 모두 24시간 관찰하는 동안 얼어붙지 않는 것을 확인함. 같은 희석액으로 -10℃에서도 내동성 확인 결과 만나절 이상 상당시간동안 얼지 않는 것을 관찰할 수 있었음. 당초 이번년도 연구개발계획은 -20℃에서 24시간동안 얼어붙지 않는 동결방지 후보물질의 개발이었는데, 개발한 동결방지 후보제는 10배 희석액이 -20℃에서는 24시간 내내 내동성을 보이지는 않는 것을 관찰함. 소독제와 혼합하면 좀 더 오래 버티지만 24시간까지 내동성이 유지되지 않았음. 국내 겨울철 방역 목적 거점 소독 시설을 운영 할 경우, 시설 설치 위치에 따라 일교차가 큰 지역에서는 -20℃ 부근으로 기온이 낮아 지는 곳이 있음. 차후년도 연구에서는 원료 성분의 배합 비율 조정 및 신규 성분 사용 으로 -20℃까지 얼지 않는 동결방지제 후보조합을 선정하려 함.



<그림 19 Lot3 -5℃ 24시간 관찰>

㉔ 개발 중인 동결방지제와 소독제 혼합 후 용해도 및 내동성 조사

- Lot3을 현재 연구 중인 방역용 소독제 중 산성 계열 소독제(유효성분 과산화수소, 과산화초산, 초산, 정제수)와 혼합하여 용해도 및 내동성을 조사함. 조사 결과 해당 소독제와

안정적으로 잘 용해되어 과발열도 일어나지 않는 것을 확인함.

	혼합비율	용해도	발열반응
동결방지 후보제 + 산성계열 소독제	5%	높음	30℃~33℃
	10%	높음	30℃~33℃

<표 13 산성계열 소독제 혼합 시험 결과>

- 내동성 확인 시험도 두 가지 비율의 혼합액을 만들어 시험함. 전체 희석액은 경수희석액을 이용하였고, Lot3과 소독제를 5%, 10%로 혼합함. 동결방지 후보제 내동성 시험과 같은 방식으로 두 가지 희석액을 -5℃와 -10℃에서 24시간 관찰한 결과 두 혼합액 모두 얼지 않는 것을 확인함.

	산성계열 소독제 첨가비율	희석배수	동결유무(24hr)
-5℃	5%	5배	무
		10배	무
-10℃	10%	5배	무
		10배	무

<표 14 동결방지 후보제와 소독제 혼합 내동성 시험 결과>

다. 구제역 소독제의 유효성 및 효능 평가 (협동연구기관 : 농림축산검역본부)

(1) 연구수행 내용 및 결과

(가) 저온조건에서 소독제 실험을 할 수 있는 장치 개발

- ① 현재 저온에서의 소독제 효력 평가 실험은 일반 냉동고에서 이루어지기 때문에 소독제와 바이러스액이 해당 온도에 도달했는지 확인이 어렵고 또한 소독제와 바이러스액의 반응을 위해서는 외부로 검체를 꺼내야 하기 때문에 실험조건이 온도가 지속적으로 유지되기 어려움
- ② 다양한 환경 조건 반영을 위하여 영하 30도까지 온도 설정이 가능하고 장치 안에서 실험자가 직접 조작이 가능한 “저온 소독제 효력시험장치” 개발



- ③ “저온 소독제 효력시험장치” 개발 후 사용과정에서 다음과 같은 단점이 확인됨
 - ㉠ 소독장치 내에서 실험하기 위해 넓은 시야 확보가 필요함
 - ㉡ 실험장갑이 크고 두꺼워 미세한 조작이 어려움
- ④ 단점을 보완하기 위해 기존 저온 소독제 효력시험장치에서 시야창을 넓게 변경하고 장갑을 교체 완료함

(나) Disk를 이용한 소독제 효력 평가를 위한 고역가의 바이러스 균주 확보하였는가?

- ① 소독제의 효력을 평가하는 Standard 방법은 용액 상태에서 실시하는 Suspension 실험법이며 현재 농림축산검역본부 소독제 효력시험지침도 suspension실험법을 따르고 있음
- ② 실제 현장에서 바이러스는 다양한 종류의 유기물과 섞여 차량 외부와 같은 표면에 존재하므로 담체에 바이러스액을 코팅하여 실험하는 Disk Carrier 방법을 이용한 소독제 효력 평가 방법을 적용하는 것이 필요함

③ Disk에 바이러스액의 코팅을 위한 조건 설정

: 바이러스 코팅 후 건조하는 과정에서 바이러스 역가가 급격히 감소하므로 이를 최소화 하기 위하여 고역가의 바이러스 확보 필요

: 구제역 바이러스는 LFBK 세포주에 감수성이 있으므로 세포주에 바이러스를 접종하여 CPE를 확인하고 수확한 후 역가를 확인하는 실험을 반복 수행함(구제역 바이러스를 이용한 실험은 Biosafety Level 3(BL3)실험실에서 실시함)

④ 바이러스 확보 완료: LFBK접종 후 바이러스 확보 (평균 역가 $10^{7.63}$ TCID₅₀/ml 이상)

(다) 구제역 바이러스 방역에 활용가능한 소독제 효능평가 실험

① 구제역 바이러스를 이용한 조건 별 소독제 효능평가실험

1. 실험 목표

① 본 실험은 구제역에 적용 가능한 소독제의 시간별, 온도별, 적용 재질별 소독 효과를 평가하기 위함이다

2. 재료 및 방법

① 소독제: 제품 A (알데하이드), 제품 B (4급 암모늄+구연산), 제품 C (과초산+과산화수소), 제품 D (4급 암모늄), 제품 E (삼중염), 제품 F (염소), 제품 G

② 병원체: FMD Virus (O Jincheon Kor2014, 농림축산검역본부)

③ 세포주 : LFBK cell line

④ 재질: 1 cm 직경과 0.77mm 두께
금속, 유리, 플라스틱, 타일, 고무, 천, 나무

⑤ 경수: 증류수 1리터(liter)에 CaCl₂ 0.305g 과 MgCl₂ 6H₂O 0.139g (w/v)을 녹인 뒤 고압멸균하여 보관

⑥ 유기물 희석액: 10ml PBS에 Tryptone이나 효모 추출물을 0.5g섞음

10ml PBS에 0.5g BSA를 섞음

10ml PBS에 0.04g 소 뮤신을 섞음

각각의 용액을 만들고 0.22um 직경의 필터를 이용해 걸러 소분하고 -20°C±2°C의 조건에서 보관함

⑦ 중화배지 : 소독제의 약품성분 중화배지는 사용세포에 적합한 배지에 비동화된 10% 소태아혈청을 함유한 배지를 사용한다.

⑧ 바이러스 배양: 바이러스 역가가 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 이상임이 확인된 바이러스액을 시험에 사용하기 전 최소 30분 전에 4°C에서 보관한다.

3. 시험조건 및 방법

시험방법은 미국재료시험학회(ASTM)에서 제시하는 표준 실험 방법인 ASTM-2097을 바탕으로 시험을 실시. 대조 소독제에 대해 온도조건(RT, 0°C, -10°C)과 시간조건(10분

20분)을 적용하여 Disk carrier test를 진행함

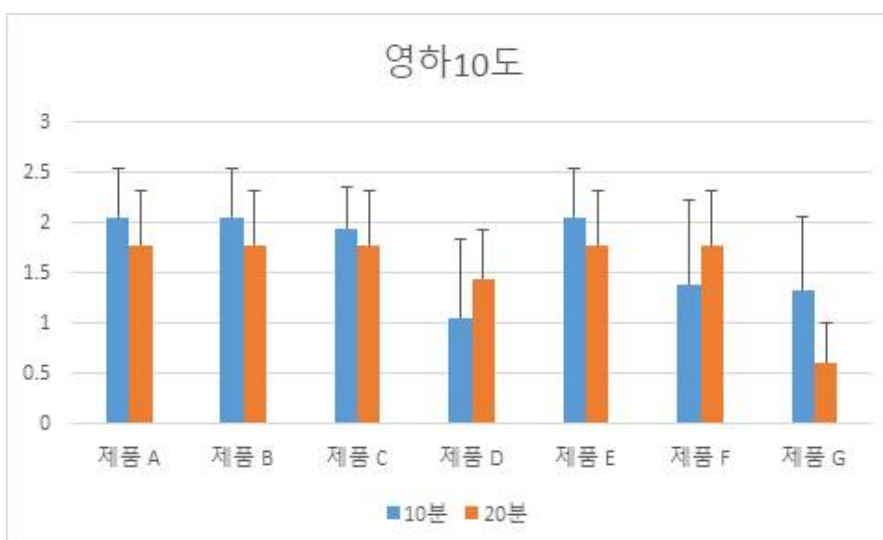
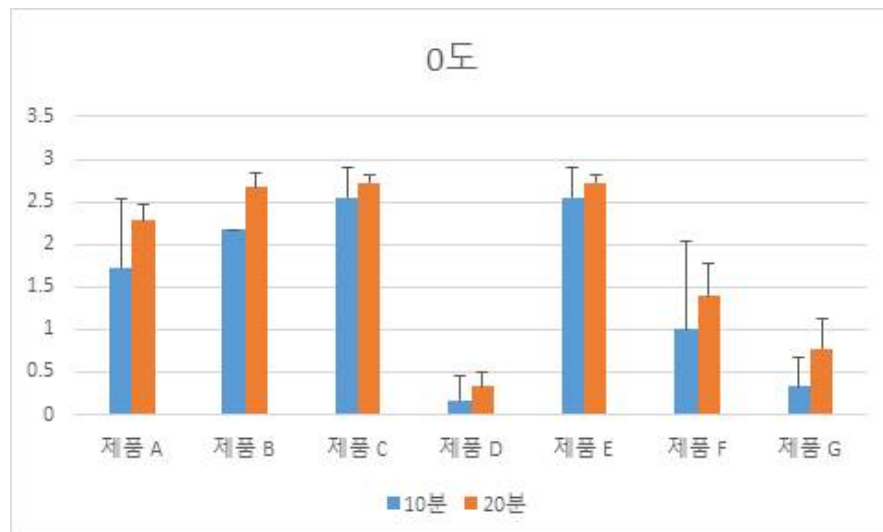
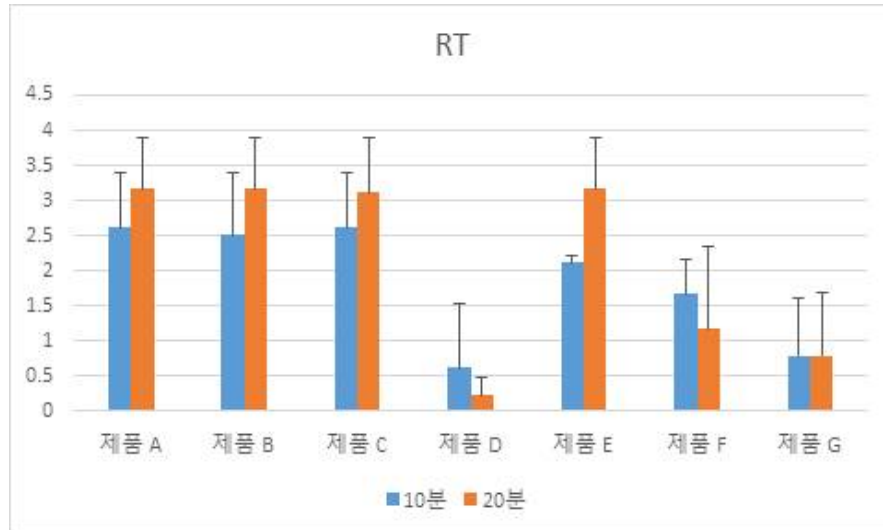
4. 시험방법

- ① 소독제의 희석: 시험에 사용되는 소독제는 희석농도를 희석배수로 소독제 희석액을 준비
- ② 소독제 반응: 500ul의 유기물 접종액을 만들고자 한다면 25ul BSA, 100ul 뮤신, 35ul Tryptone 혹은 효모추출물 용액과 340ul의 바이러스 배양액을 혼합하여 한 개의 멸균된 Disk에 10ul의 바이러스 접종액을 Biosafety cabinet에서 충분히 건조 시켜준다 (약1시간) 건조된 Disk위에 소독제 희석액을 50ul를 접종하여 10분간 반응시킴
- ③ 중화반응 및 증식: 소독제와 병원체의 반응이 끝나면 소독제의 효능을 중화하기 위하여 중화배지(비동화된 10% 소태아혈청을 함유한 배지)에 넣고, 혼합한 다음 LFBK 세포주에 접종
- ④ 세포 변성 확인: 배지에 10진 희석한 바이러스를 세포단층이 형성된 96well plate에 농도별로 접종한다. 37℃의 CO2 배양기에서 72시간동안 배양 후 세포 변성을 검사한다.
- ⑤ 바이러스 함유량 계산 : Kaerber method로 한다.
- ⑥ 대조군의 검정 등 : 병원체 대조군은 경수조건에서 소독제 없이 실험하고 위의 [③(중화반응)] 단계에서 병원체의 역가가 $\text{ml당 } 2 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$ 이상인지 확인하고, 독성대조군에서는 소독제에 의한 세포독성이 일어나지 않았음을 확인한다.

5. 실험결과

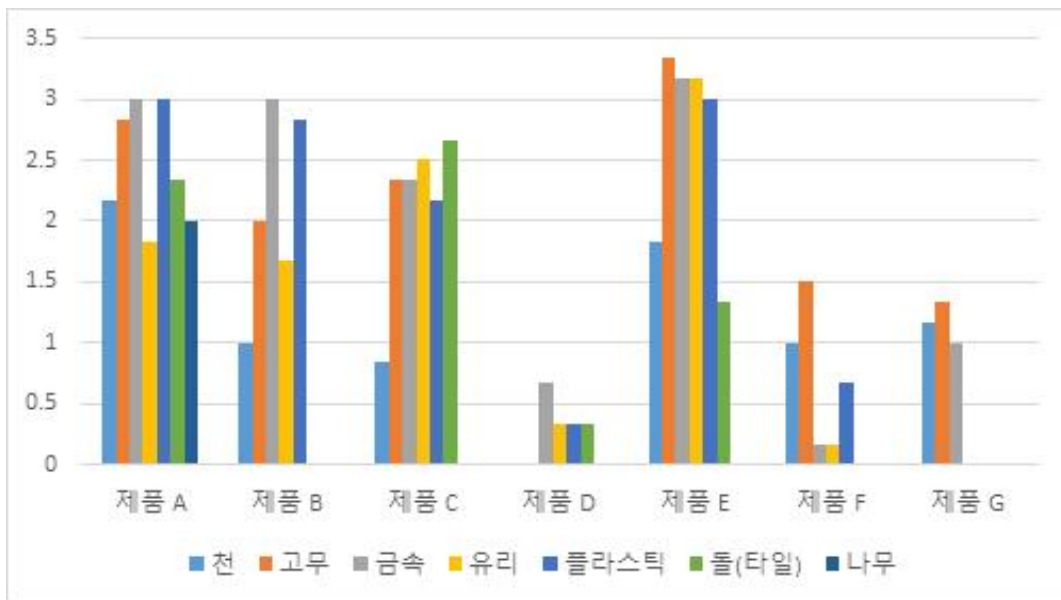
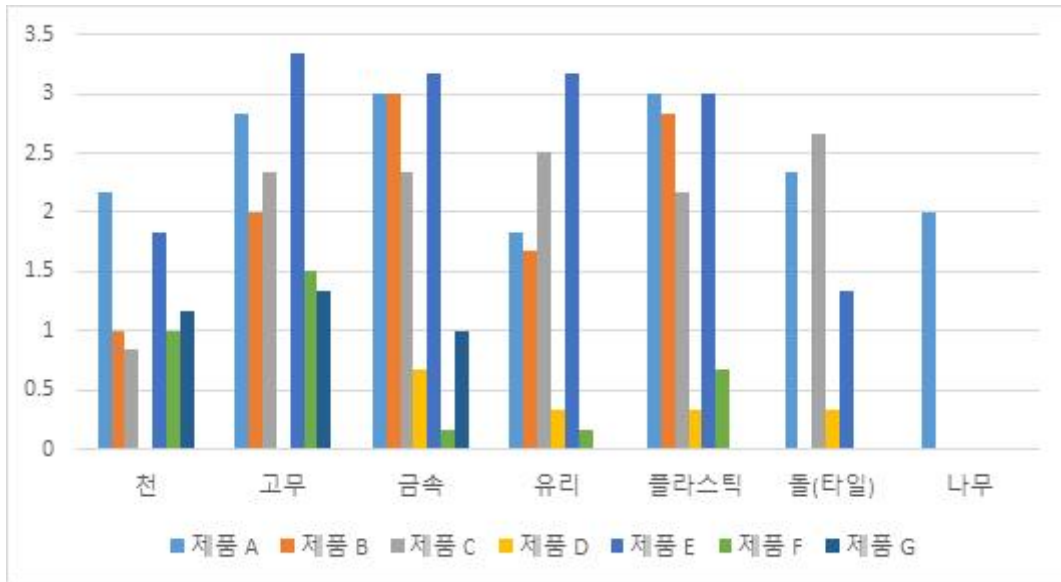
① 시간·온도 조건 별 소독제 유효성 평가 결과

- 온도에 따른 실험결과 0℃, 영하 10℃에 비해 실온에서의 소독제 효력이 가장 높게 관찰되었음
- 영하10℃의 경우 실험군에서 바이러스 사멸 효과가 나타났지만 전체적으로 대조군과 실험군 모두 역가가 낮게 측정되고 실험의 오차가 커서 효력시험을 확인하기 적합하지 않음.
- 7개의 소독제 효력의 차이는 온도에 크게 영향을 받지 않는 것으로 보임
- 7개 중 4개의 소독제(제품 A, B, C, E)가 효력이 전체적으로 높게 확인되었음



② 재질별 소독제 유효성 평가 결과

- 재질에 따른 소독 효과는 고무, 금속, 유리, 플라스틱과 같이 소독제를 흡수하지 않는 재질에서 효력이 높게 확인되었음
- 금속에서 효력이 높게 확인된 소독제가 고무, 유리, 플라스틱에서도 동일하게 높은 효력을 보임



③ 실험 결과 해석

- 현재 국내 소독제 효력지침에 의한 시험법과 비교해 disk carrier의 적용되는 바이러스가 다량의 중화제에 의해 희석되어 전체적으로 역가의 수치가 낮게 측정되어 역가 감소 수치를 4 이상을 효력 판단 기준으로 적용하기에는 어려움이 있다고 생각됨

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

가. 목표

(1) 1차년도

구분	성과목표	성과지표	가중치	달성도
주관 ((주)크로엔)	AI, 구제역 바이러스 차단방역에 활용 가능한 소독제의 환경독성 평가방법에 대한 문헌 분석	국내외 소독제의 환경독성 평가 기준 비교 분석	30%	100%
		문헌 분석을 통한 문제점 분석 및 개선안 확립	30%	100%
		소독제의 대표적 제형을 중심으로 한 소독제 환경독성 평가 실행실험	40%	100%
위탁 (카브)	국내외 소독제의 유효성 평가기준 비교 분석	미국, 영국, 유럽의 소독제 유효성 평가방법 수집	25%	100%
		한국의 소독제 유효성 평가 방법 분석	25%	100%
		해외와 국내의 소독제 유효성 평가방법 비교 분석	25%	100%
		Disk carrier test의 전실험	25%	100%
협동 (농림축산검역본부)	AI, 구제역 바이러스 차단방역에 활용 가능한 소독제의 유효성 평가방법에 대한 문헌 분석	국내외 소독제의 유효성 평가 기준 비교 분석	30%	100%
		문헌 분석을 통한 문제점 분석 및 개선안 확립	30%	100%
		새로운 기준안을 통한 소독제 유효성 평가 도입의 실행실험	40%	100%

(2) 2차년도

구분	성과목표	성과지표	가중치	달성도
주관 ((주)크로엔)	AI 및 구제역에 이용되는 소독제의 환경독성평가 진행	수생 무척추동물 (물벼룩)에 대한 환경독성평가	40%	100%
		담수녹조류에 대한 환경독성평가	40%	100%
		정책제안 및 학술대회 발표	20%	100%
위탁 (카브)	AI바이러스 차단방역에 활용 가능한 소독제 평가 및 선정 기준 제시	AI 바이러스를 이용한 소독제의 Disk 재질별 효능평가 실험	20%	100%
		AI 바이러스를 이용한 소독제의 단시간 내 효능평가 실험	20%	100%
		AI 바이러스를 이용한 소독제의 저온 효능평가 실험	20%	100%
		금속 부식성 실험	20%	100%
		소독제 매뉴얼 개발	20%	100%

협동 (농림축 산검역 본부)	구제역 바이러스 차 단 방역에 활용 가능 한 소독제 평가 및 선정 기준 제시	저온조건에서 소독제 실험을 할 수 있는 장 치 개발	30%	100%
		구제역 소독제의 Disk 재질별 효능평가 실험	30%	100%
		구제역 바이러스 방역에 활용 가능한 소독제 표능평가 실험	30%	100%

나. 목표 달성여부

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10			10	20	10	10							10	10	20				
최종목표	2			1	10	1	230					1		1	1	2				
1차연도	목표	1																		
	실적	1																		
2차연도	목표	1		1		1								1	1	2				
	실적	1		1		1	30							1		2				
소계	목표	2		1		1	30					1		1	1	2				
	실적	2		1		1								1		2				
종료 1차연도							100													
종료 2차연도							100													
소계							200													
합계	2			1	10	1								1		2				

다. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성)

(1) 사업화 실적 미달성

- (가) 본 연구진은 연구 기간 동안 발포형 소독제에 대한 특허를 출원하였으며, 현재 등록을 위한 추가 실험등을 진행하고 있음.
- (나) 발포형 소독 기술의 특허사항을 주식회사 이안바이오로 기술이전 하였으며 시제품 제작등 연구를 계속하고 있었으나 본 연구 기간 내에 완료하지 못함. 소독제를 판매하고 실적을 얻기 위해서는 농림축산검역본부의 허가가 필요한데, 이 절차 과정이 비교적 오래 걸리게 되었음.
- (다) 특허 진행의 완료와 농림축산 검역본부의 허가가 이루어지는 시점에서 매출액이 발생할 것으로 기대하고 있음.

(2) 인력 양성 성과 미달성

- (가) 본 연구 과제를 진행함에 있어서 인력 양성을 진행하였으나, 간접 고용창출과 직접 고용창출의 차이점을 구분하지 못한 실수로 성과를 미달하게 됨.
- (나) 본 연구 과제를 통해 회사 측에서 간접적으로 고용을 창출하였으며, 연구진행에 있어서 큰 도움이 되었음.

(3) 논문 성과 미달성

- (가) 본 과제는 총 비 SCI 1건의 논문 성과가 잡혀 있었으나, 주요 연구 개발 성과가 2년 차 말에 발생 되면서 과제 종료일까지 논문 성과의 달성에 실패하였음.
- (나) 하지만 연구진의 연구 결과 방대한 양의 자료를 정제하여 SCI급 논문을 작성 할 수 있을 것으로 판단되어 현재 논문을 작성 중이며, 종료 1차년 이내에 논문 성과를 달성할 수 있도록 할 것임.

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 기대성과 및 기대 효과

(1) 기술적인 측면

- (가) 국내 소독제의 유효성, 위해성, 독성평가 기준 정립을 통한 개선된 평가 기술 획득하였음.
- (나) 기존의 현탁액 실험에서 벗어나 현실 조건에 맞는 Disk carrier 실험을 도입함으로써, 저온 및 단시간 내의 소독제 효능 평가를 진행 할 수 있게됨.
- (다) 정책 제안을 통해 기존의 유효성, 환경독성 평가 기준안을 제안하였고 농림축산식품부의 검토 후 정책에 제안 될 것으로 기대됨.
- (라) 구제역 및 조류인플루엔자에 적용 가능한 소독제제의 효능, 독성 평가를 통한 학술자료를 확보하였으며, 논문 작성을 통해 저온 조건에서의 소독제 사용 요건 등의 실무적인 정보를 공유하게 될 것으로 생각됨.

(2) 경제·산업적 측면

- (가) 현장에서 효율적으로 이용할 수 있는 소독제에 대한 방향 제시로 기존의 소독제 유효성 평가 회사들의 새로운 평가 시장을 창출할 수 있을 것으로 기대함.
- (나) 저온 및 단시간 내의 효능평가를 마친 소독제에 한하여 인증 마크를 부여하면 기존의 소독제 효능, 환경독성 인증 사업을 진행할 수 있으며, 중국 및 동남아 시장에서 효능을 보증하는 소독제 인증 사업을 시작 할 수 있을 것으로 기대됨.
- (다) 본 연구를 통해 만들어진 소독제 추천 체계를 이용해 구제역, 조류인플루엔자 뿐만 아니라 새롭게 발생하고 있는 ASF 등의 재난형 질병을 효과적으로 방제 하는데 도움을 줄 것임.
- (라) 효율적인 차단방역을 통해 재난형 질병으로 인한 국가적 자원 소모가 절감되고 항상 문제가 되었던 환경 독성에 대한 대중의 인식도 개선 할 수 있을 것으로 사료됨.

나. 개발 결과의 활용방안

(1) 기술 이전

- (가) 국내 기업(주식회사 이안바이오)에 본 과제를 통하여 개발된 발포형 소독제를 기술 이전하였음.
- (나) 향후 이안바이오에서 생산 및 판매되는 소독제가 농림축산 검역본부의 승인을 받게 되면 이로인해 많은 매출이 발생할 것으로 기대됨.

(2) 제품화

- (가) 국내 기업(주식회사 이안바이오)에 본 과제를 통하여 개발된 발포형 소독제를 기술 이전하였음
- (나) 향후 이안바이오에서 생산 및 판매되는 소독제가 농림축산 검역본부의 승인을 받게 되면 이로인해 큰 매출이 발생할 것으로 기대됨.

(다) 친환경 내동형 소독제의 특허 등록을 진행하고, 국내 기업(주식회사 이안바이오)와 협업하여 소독제 생산을 할 수 있을 것임.

(3) 후속연구

(가) 인플루엔자, 구제역뿐만 아니라 다른 바이러스에 대해서도 소독제의 소독 효과가 어떻게 나타는지에 대해 연구하고, 최근 문제가 되고 있는 Corona virus에 효과가 있는 소독제 개발을 진행할 예정임.

(나) 발포형 소독제의 산업화를 위해 특허 등록을 진행하고, 시제품 제작 및 야외 실험을 통해 피드백을 받아 판매를 진행 할 계획임.

(다) 코팅형 소독제의 효능 평가법에 대해 농림축산검역본부의 피드백을 받아서 코팅형 소독제의 제품 등록을 진행할 예정임.

(라) 친환경 내동결성 소독제의 환경독성 평가를 진행하고, 실제 야외에서도 얼지 않고 원하는 소독 효과를 보일 수 있는지에 대해 평가할 것임.

붙임. 참고 문헌

1. ASTM E2274-16 Standard Test Method for Evaluation of Laundry Sanitizers and Disinfectants.
2. Chemical disinfectants 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, step 1)
3. E 1053-97 Standard Test Method for Efficacy of Virucidal Agents Intended for Inanimate Environmental Surfaces.
4. ASTM International. "Standard Quantitative Disk Carrier Test Method for Determining the Bactericidal, Virucidal, Fungicidal, Mycobactericidal and Sporicidal Activities of Liquid Chemical Germicides." (2002).
5. Product Performance Test Guidelines OCSPP 810.2400: Disinfectants and
6. Sanitizers for Use on Fabrics and Textiles - Efficacy Data Recommendations
7. Rabenau, Holger F., et al. "Evaluation of a virucidal quantitative carrier test for surface disinfectants." PloS one 9.1 (2014).
8. Standard Operating Procedure for Quantitative Three Step Method for Measuring the Efficacy of Liquid Sporicides against Spores of Bacillus subtilis on Hard Non-porous and Porous Surfaces. SOP Number: MB-21-03
9. Tim Sandle. The European approach to disinfectant qualification
10. 이민정, et al. "국내 유통 중인 주요 살균소독제의 유효성 평가." 한국식품과학회지 37 (2005): 671-677.
11. ASTM G1-03 Standard Practice for Preparing, Cleaning, and Evaluating Corrosion Test Specimens.
12. 한탑기술사사무소_금속의 부식과 방식
13. Ciulli, Sara, Enrico Volpe, and Marco Grodzki. "EVALUATION OF IN VITRO VIRUCIDAL ACTIVITY OF VIRKON® S AGAINST BETANODAVIRUS."
14. Sattar, Syed A., et al. "A disc-based quantitative carrier test method to assess the virucidal activity of chemical germicides." Journal of virological methods 112.1-2 (2003): 3-12.
15. Malik, Y. S., et al. "Disinfection of fabrics and carpets artificially contaminated with calicivirus: relevance in institutional and healthcare centres." Journal of Hospital Infection 63.2 (2006): 205-210.
16. 국립환경과학원 환경건강연구부 위해성평가연구과 "매물지 방역소독제 사용실태조사 및 독성평가" (2011)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 가축질병대응기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.