연 구 보 고 서

연구과제명 :

은이온수의 *Salmonella* Typhimurium과
PRRS 바이러스에 대한 항균, 항바이러스 효과 시험

2015. 12. 07

연구책임자

성　　명 : 김원일 (인)
소　　속 : 전북대학교 수의과대학
직　　급 : 교 수

연구책임기관장　전북대학교 산학협력단장 (인)

(주) 씨엔엘　　귀　중

1. 연구의 필요성

- *Salmonella*는 넓은 숙주 범위를 가지며, 인수공통질병을 일으키기 때문에 오래전부터 산업적으로 매우 중요시 되어온 병원성 세균임
- PRRS 바이러스는 RNA 바이러스 중에서도 가장 변이가 빠른 것으로 알려져 있으며 다양한 유전형으로 존재하여 효과적인 백신을 개발하는 것이 매우 어려움
- 최근에 국내에 유입되는 다양한 질병을 예방할 수 있는 효과적인 소독 및 예방체계의 구축이 필요함

2. 연구목표

- 은이온수의 *Salmonella* Typhimurium과 PRRS 바이러스에 대한 항균, 항바이러스 효과를 평가

3. 세부 연구내용 및 방법

가. 시험물질

업체명: (주)씨엔엘
제품명: 은이온수
이온수의 권장희석배수 : 5, 10, 20, 40 ppm

나. 공시세균 및 바이러스주

살모넬라 표준주인 *Salmonella* Typhimurium (ATCC14028)과 Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome virus (PRRSV) 표준주이며 병원성 및 특성이 선행연구들에 의해 잘 규명된 VR2332주를 자체 배양하여 시험에 사용한다.

다. 평가방법 요약

- 은이온수의 세균 및 바이러스에 대한 항균, 항바이러스 효력을 평가하기 위해 농림축산검역본부고시 제2015-10호의 동물용의약품 등 안전성·유효성 심사에 관한 규정에 준하여 시험을 실시함.
- 세균에 대한 희석배수는 처리구에서 1개 이상의 증식이 인정되지 않는 최종 희석단계 중 3회 반복시험을 실시하여, 그 중위수로 유효 희석배수로

설정한다. 바이러스는 대조군과 비교하여 병원체가 10^4 reduction이 확인된 희석배수를 역시 3회 반복시험을 실시하여, 그 중위수를 유효 희석배수 설정함

- 병원체와 표1에서 보여진 것과 같이 증류수 및 경수, 유기물 희석제로 단계 희석한 은이온수를 혼합한 후, 4℃에서 30분 또는 24시간 처리하여 항균 및 항바이러스 효능을 평가

표 1. 항균 및 항바이러스능 시험 평가시의 처리구

처리구	증류수	경수	유기물	은이온수	비 고
처리구1 (유기물 무)	+	−	−	+	증류수조건
처리구2 (유기물 저)	−	+	−	+	경수*조건
처리구3 (유기물 고)	−	+	+	+	유기물**/경수조건
처리구4 (병원체 대조)	−	+	−	−	처리구 2, 3의 대조
처리구5 (증류수 대조)	+	−	−	−	처리구 1의 대조

* 경수(Hard water) : 0.0305% $CaCl_2$ + 0.0139% $MgCl_2$ + 증류수(Distilled water)

** 유기물 : 5% FBS + 경수

4. *Salmonella* Typhimurium 에 대한 은이온수의 항균 효력 시험

가. 세부평가방법

1) 세균 배양

: 공시균주는 고압 멸균된 영양배지 (nutrient broth)에 심어 37℃에서 22~26시간 동안 계대 배양한 후 시험에 공시한다. McFaland등의 방법에 따라 탁도를 측정하여 균수를 측정하며, 세균의 농도가 10^8 CFU/mL이상인 것을 시험에 공시한다.

2) 은이온수의 준비

: 은이온수의 희석은 증류수를 이용하여 희석한다.

3) 은이온수 처리

: 37℃에서 배양한 세균 0.1 ml를 각각의 은이온수 희석액 10 ml에 섞은 후 4℃에서 정확히 30분간 반응시키며, 이 때 각 시험관 처리는 차례대로 1

분 간격으로 실시하며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 준다. 대조군은 은이온수 대신에 증류수를 사용한다.

4) 중화반응 및 증식

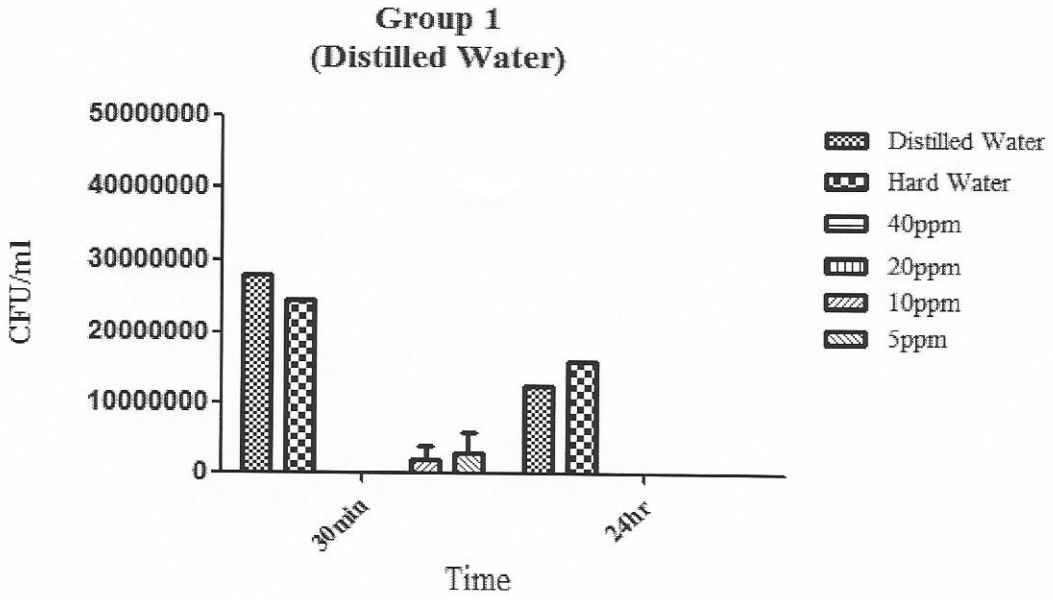
: 정확히 30분간 또는 24시간의 반응이 끝나면 희석별로 0.2 ml씩 영양배지에 도말하고 37℃ 배양기에서 24시간 배양한다.

5) 세균 증식여부 판정

: 영양배지에서 1개 이하의 세균이 증식 된 최종 희석배수로 한다.

6) 시험결과

: 시험 결과 유기물이 없는 처리군1에서는 30분 또는 24시간 동안 모든 ppm에서 100%의 항균 효과를 관찰할 수 있었다. 또한 은이온수가 40 ppm 일 때 30분 또는 24시간 경과 후와 24시간 ≤10 ppm 은이온수 처리군은 *Salmonella* Typhimurium의 성장을 90-100% 억제하였다. (그림1)



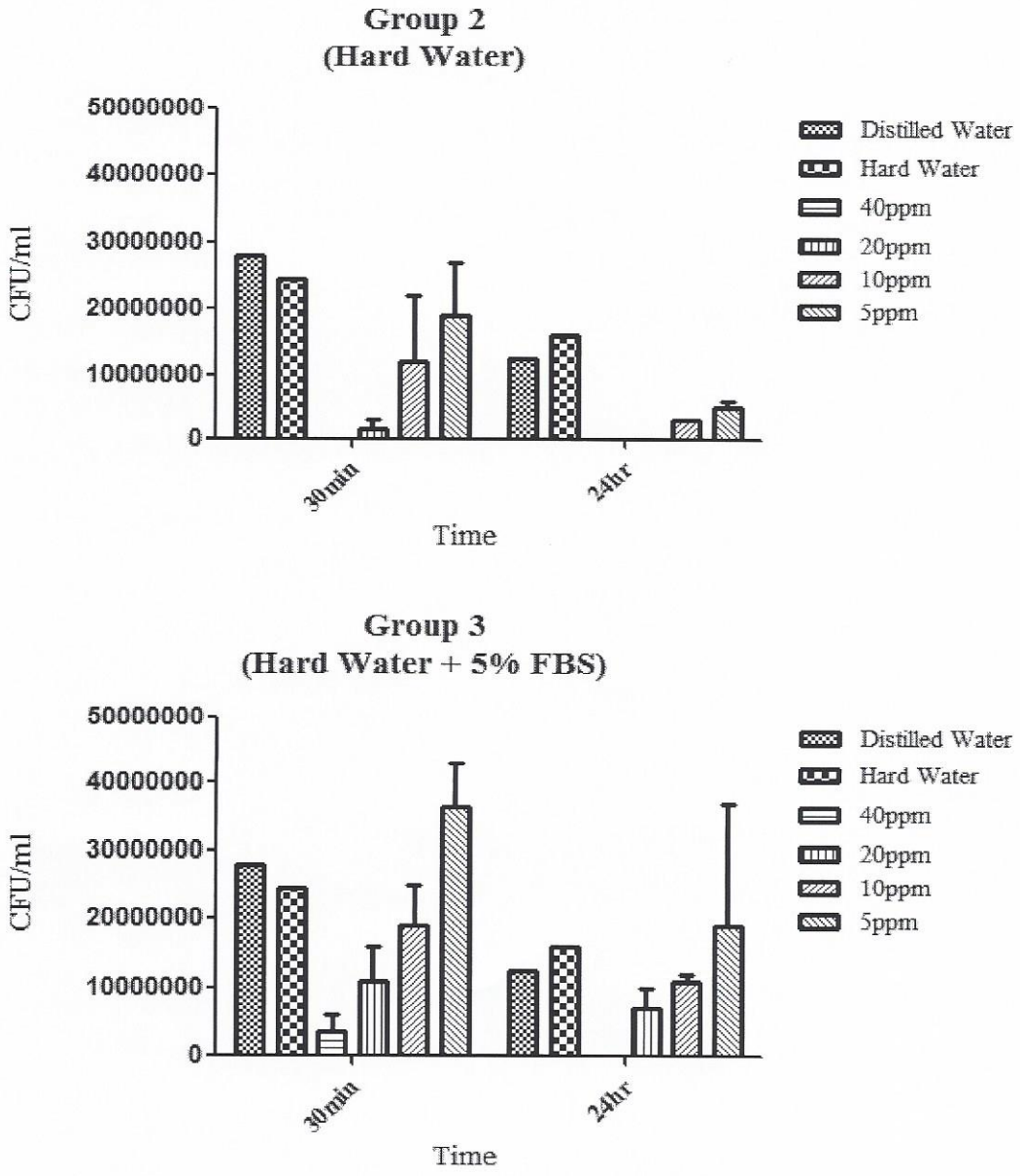


그림1. 은이온수의 증류수, 경수 및 유기물 희석재로 희석한 다양한 농도에 따른 *Salmonella* Typhimurium에 대한 항균 효과

5. PRRS 바이러스에 대한 은이온수의 항바이러스 효능 시험

1) 바이러스 배양

: 공시바이러스주를 MARC-145 세포주에 접종하여 계대 배양하였다. 공시바이러스의 함유량을 미리 시험하여 $10^{6.0}$ $TCID_{50}$/mL이상인 것을 시험에 공

시한다.

2) 은이온수의 준비

: 은이온수의 희석은 증류수를 이용하여 희석한다

3) 은이온수의 처리

: 증식된 4℃의 바이러스액 (세포배양액) 0.1 ml를 각각의 은이온수 희석액 10 ml에 섞은 후 4℃에서 정확히 30분 또는 24시간 반응시키며, 이 때 각 시험관 처리는 차례대로 1분 간격으로 실시하며, 도중에 10분마다 잘 흔들어 준다. 대조군은 은이온수 대신에 증류수를 사용한다.

4) 바이러스 증식여부 판정

: 정확히 30분간의 반응이 끝나면 MARC-145 세포가 단층을 이룬 96 well tissue culture plate에 희석별로 5 well에 반응액 50 μl를 접종하고 5% CO_2, 37℃ 배양기에서 1시간 동안 흡착시킨다. 반응한 희석액을 모두 제거하고 세포 배양액으로 교체한 후 5% CO_2 37℃ 배양기에서 5일 동안 배양한다. 바이러스의 존재유무는 CPE (Cytopathic effect)를 확인하여 최종 판정한다. 바이러스 함유량 계산은 Kaerber method를 이용한다.

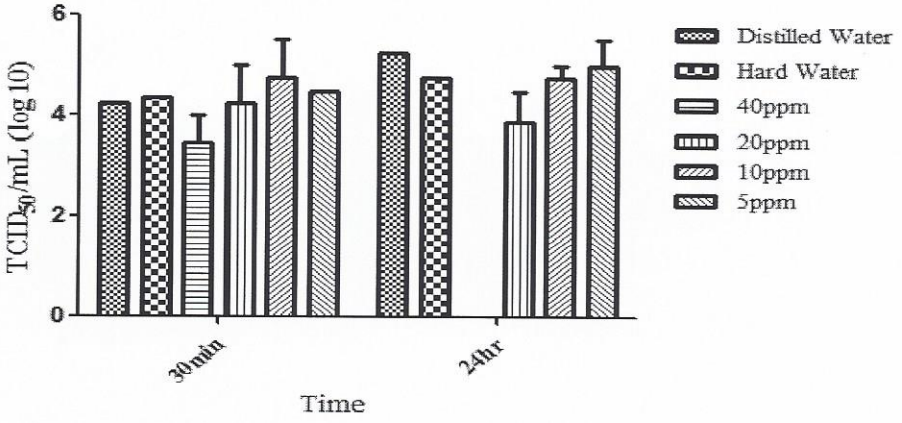
5) 유효배수 평가

: 병원체 대조군의 바이러스함량에서 처리군의 바이러스함량을 대조로 하여 10^4TCID_{50} 이상의 불활화가 인정되는 희석농도를 유효농도로 한다. 공세 제품에 대한 최종 희석배수 결정 시 각각의 시험결과는 상용대수로 환산하여 계산하되, 20% 오차범위 내로 들어오는 3반복 시험결과 값의 중위값 (median)으로 한다.

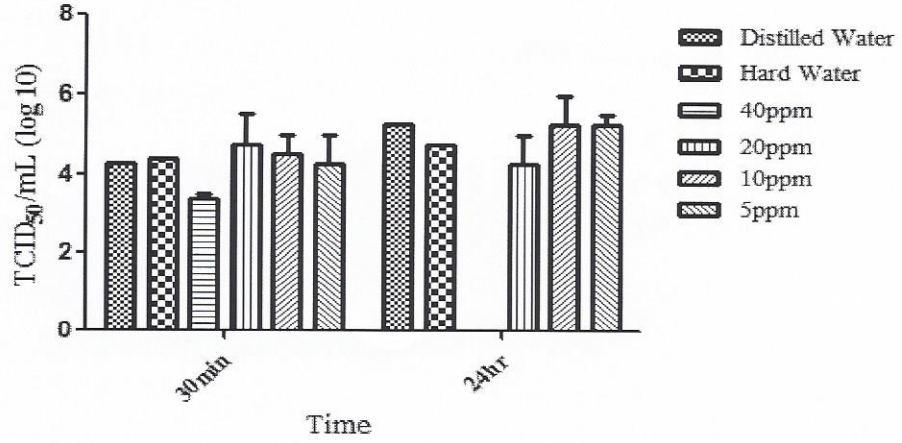
6) 시험결과

: 시험 결과 30분 또는 24시간 동안 유기물이 없거나 낮은 처리군1, 2에서 은이온수가 40 ppm 일 때 90-100%의 항바이러스 효과를 관찰하였다. 또한, 은이온수 20 ppm을 24시간 처리한 결과 90-95%의 PRRS 바이러스 증식 억제를 보였다. MARC-145 세포에서 배양 후 접종 5 일까지 은이온수 40 ppm의 농도에서 세포 독성은 관찰되지 않았다.(그림2)

Group 1
(Distilled Water)



Group 2
(Hard Water)



Group 3
(Hard Water + 5% FBS)

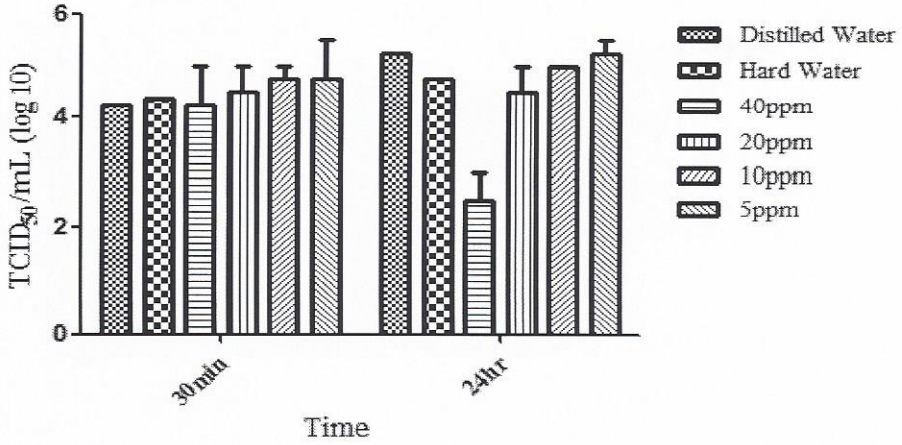


그림2. 은이온수의 증류수, 경수 및 유기물 희석재로 희석한 다양한 농도에 따른 PRRSV에 대한 항바이러스 효과

6. 시험결과에 대한 요약 및 고찰

○ 본 시험에서는 은이온수를 이용하여 두 가지 *Salmonella* Typhimurium과 PRRS 바이러스에 대한 소독제 효능 평가를 실시하였다. 본 시험의 결과는 전반적으로 은이온수는 훌륭한 항균 효과를 보였으며, 특히 20-40 ppm에서 PRRS 바이러스와 *Salmonella* Typhimurium 모두에서 90-100%의 높은 소독효과를 보였다. 따라서, 은이온수는 PRRSV 및 *Salmonella* Typhimurium을 제어 및 처리하기 위해 농장 및 방역 절차에 적합한 효과적인 소독제로 사용될 수 있을 것으로 판단된다.