

조류 인플루엔자와 구제역 바이러스 차단방역을 위한 미산성 차아염소산수의 소독 조건

김진윤¹ · 윤동식² · 이화용² · 정우석^{3,*} · 박승춘^{1,*}

¹경북대학교 수의과대학, ²(주) 엔퓨텍, ³농림축산검역본부 동물약품평가과

Establishment of optimal disinfection condition of weak acid hypochlorous solution for prevention of avian influenza and foot-and-mouth disease virus transmission

Jin-Yoon Kim¹, Dong-Sik Yun², Haw-Yong Lee², Woo-Seog Jeong^{3,*}, Seung-Chun Park^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

²Enputech Co., Gwangju 12807, Korea

³Veterinary Pharmaceutical Management Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

Abstract: This study examined the disinfection conditions (exposure time, 0–30 min; exposure temperature, 4°C–65°C) of hypochlorous acid water (HOCl) in automobile disinfection equipment. The study tested poliovirus type 1 (PV1), low pathogenic avian influenza virus (AIV, H9N2), and foot and mouth disease virus (FMDV, O type). As a result, the PV1 and FMD viruses were inactivated easily (virus titer 4 log value) by HOCl (> 100 ppm) but the AIV required higher exposure temperatures (> 55°C). In conclusion, the exposure temperature and time are important factors in deactivating AIV and FMDV.

Keywords: avian influenza virus, disinfection, foot-and-mouth disease virus, hypochlorous acid solution

*Corresponding authors

Seung-Chun Park
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, 80 Daehak-ro, Buk-gu, Daegu 41566, Korea

Tel: +82-53-950-5964
Fax: +82-53-950-5964
E-mail: parksch@knu.ac.kr

Woo-Seog Jeong
Animal and Plant Quarantine Agency, 177 Hyeoksin 8-ro, Gimcheon 39660, Korea

Tel: +82-54-912-0554
Fax: +82-54-912-0584
E-mail: jeongws@nvrqs.go.kr

ORCID

Jin-Yoon Kim
<https://orcid.org/0000-0003-0708-4262>
Dong-Sik Yun
<https://orcid.org/0000-0001-9328-3510>
Haw-Yong Lee
<https://orcid.org/0000-0002-7023-7308>
Woo-Seog Jeong
<https://orcid.org/0000-0002-3214-9323>
Seung-Chun Park
<https://orcid.org/0000-0001-8539-1087>

Conflict of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Received: May 4, 2019
Revised: May 8, 2019
Accepted: May 8, 2019

구제역(Foot-and-Mouth Disease, FMD)과 조류 인플루엔자(Avian Influenza, AI) 감염병 통제는 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 막대한 비용을 지출하고 있다. 가금류 산업에서 병원성 조류 인플루엔자 바이러스(AIV)는 경제적 손실뿐만 아니라 공중보건학적으로도 큰 위험을 초래하는 것으로 알려져 있다 [1]. AIV의 인체감염은 흔치 않으나 다량의 바이러스에 접촉하는 농장주, 수의사 등이 고위험군에 속한다 [2-4]. FMD 바이러스(FMDV)는 돼지, 양, 시슴, 흑염소, 소 등 우제류 동물에 감염된다 [5,6]. 주요 증상은 입술, 잇몸, 구강, 혀, 코, 유두 및 발굽 사이에 물집(수포)이 형성되어 보행 불편, 식욕저하 등이 나타날 수 있다 [7,8]. FMDV는 전파 속도가 매우 빠르고, 어린 동물은 50% 이상의 폐사를 보인다. 젖소는 우유 생산량이 줄기 때문에 직접적으로 막대한 경제적 손실이 발생한다. 우리나라에서 FMD는 1911년 첫 기록 이후 2010년 11월부터 2011년 4월까지 크게 유행하였다 [9]. 2010년 4월부터 6월까지 돼지 및 가축에서 13건의 구제역이 발생하였고 주로 type O형으로 동정되었다 [1]. 2017년 발생한 FMDV는 보은, 정읍에서 O형, 연천에서 A형이 동시에 나타났다 [10]. AIV는 2014년 국내에서 병원성이 높은 H5N8가 야생 조류 및 가금류 농장에서 발생하였다. 그 해 5월 8일까지 야생 조류 38마리와 가금 농장 200군데에서 고병원성 AIV를 분리하여 야생 조류와 가금 농장의 관계를 유전적 서열과 역학으로 분석한 결과 야생 조류들이 발생지역을 경유하는 것으로 나타나 [11-13] 이러한 이동을 AI 바이러스 도입과 확산의 원인으로 추정하였다 [14,15].

소독제는 전염성이 높은 FMDV와 AIV 발생 시 이들 병원체의 확산을 막는데 중요한 역할을 하므로 소독약의 특성을 정확하게 알고 사용하여야 한다. 그리고 주요 거점의 소독장비와 소독약 사용 운영을 확립하여 국도 및 지방도를 통한 FMDV와 AIV의 확산을 효과적으로 차단해야 한다. Jeong 등 [16]은 국내에서 시판중인 소독약을 계열별로 분류하여 FMDV에 대한 효과

를 분석하고 비교하였다. 대부분 차량용 소독기는 차량 하부 세척과 분무소독 혹은 연무소독의 2단계 소독으로 구성되어 있으며 대부분 미산성 HOCl을 사용한다. 미산성 HOCl은 식품의약품안전처 식품첨가물공전에 등재된 살균소독제로 유효염소 농도 10-30 ppm에서 살균, 탈취, 바이러스 제거용으로 이용된다.

우리나라에서는 FMDV와 AIV는 2010년도 이후에는 계절에 상관없이 발생하는 재난형 질병이 되었다. 관심, 주의, 경계 그리고 심각으로 구성된 4단계 방역단계로 차단방역을 하고 있으며 차량용 소독기의 운영은 확산을 막는데 중요한 요소이다. 이러한 차량용 소독기에 장착하여 사용할 수 있는 염소계 소독약인 미산성 HOCl은 유기물과 온도에 민감하지만 소독력이 뛰어나고 환경에 영향을 적게 주면서 사람과 동물에 비교적 안전한 소독제로 알려져 있다 [17,18]. 본 연구에서는 우리나라 현장에서 운영 중인 차량용 소독기에서 생성되는 미산성 HOCl (Weak acid hypochlorous solution, WAHS)이 FMDV와 AIV를 불활화시킬 수 있는 최적 조건을 설정하고자 하였다.

미산성 HOCl의 준비는 OH Radical 스팀 차량 소독기 (OH Radical Steam Vehicle Disinfector, ORSVD, Enputech, Korea)를 이용하여 pH 4.0-6.5의 미산성의 HOCl을 준비하였다. 생성된 미산성 HOCl의 바이러스 불활화 효력을 알아보기 위하여 먼저 약독화된 human polio virus PV1 strain CHAT (ATCC VR-1562, American Type Culture Collection, Manassas, USA) (PV1)를 이용하여 측정하였다. 세포는 HeLa cell (ATCC® CCL-2™, American Type Culture Collection)을 사용하였으며 37°C와 95%의 습도를 유지한 5% CO₂ Incubator에서 배양하였다. 배양액은 100 unit/mL의 penicillin G와 100 µg/mL의 streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 15%의 소태아 혈청(Gibco/BRL, Grand Island, USA) 및 20 µM glutamine이 포함된 RPMI 1640으로 T-75 flask 내에서 배양하였다. 증식된 바이러스액 속의 유기물을 최소화하기 위해서 PEG/NaCl을 사용하여 침전시켰다. 침전된 바이러스는 칼슘, 마그네슘 무첨가 인산완충액(PBS[-])에 부유시킨 후 배양배지는 무혈청 배지를 이용하였다. 시험 바이러스 역가 측정은 시험 3일 전에 HeLa cell을 96 well plate에 넣고 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 시험농도는 30,

40, 60 ppm으로 맞추었고 반응온도는 실온(22°C)과 얼음 위(4°C)에서 0, 10, 30분 동안 반응시켰다. 세포독성은 MTT 염색법을 이용하여 계산했고 세포 생존율 평균값을 이용하여, “Reed and Muench” 법으로 측정하였다 [19,20].

저병원성(Low pathogenicity) AIV (LPAIV, H9N2, 농림축산검역본부)에 대해서는 LPAIV액 1 mL을 유기물 희석액(비동화된 5% 소태아혈청을 함유한 경수) 19 mL에 섞은 후, 혼합액 2.5 mL을 꺼내어 동량의 미산성 HOCl에 넣고 혼합하였다. 시험은 계대배양 중 바이러스 증식이 최대인 시점에 채득하고 사용 직전까지 얼음물에 보관하였다. LPAIV를 동량으로 접종한 후에 4°C에서 30분간 반응을 시키며 도중에 10분마다 혼합하고 반응이 끝나면 1 mL을 꺼내어 동량의 중화배지(비동화된 10% 소태아혈청을 함유한 PBS)에 넣어 혼합한 후 발육란에 접종하여 바이러스 함량을 측정하였다. FMDV (O형, 농림축산검역본부는 LPAIV와 같은 방법으로 실시하였고 반응이 끝나면 1 mL을 꺼내어 동량의 중화배지(비동화된 10% 소태아혈청을 함유한 DMEM 배지)에 넣어 혼합한 다음 LFBK 세포주에 접종하여 바이러스에 의한 세포변성효과(Cytopathic Effect, CPE)를 측정하였다. 현장에서 ORSVD는 AIV와 FMDV 3분 이하로 소독약과 바이러스의 접촉이 이루어지므로 노출온도와 노출시간 설정을 실시하였다.

표준바이러스인 PV1에 대하여 미산성 HOCl의 농도별(30 ppm, 40 ppm 그리고 60 ppm)로 노출시간을 0분, 10분 그리고 30분 동안 노출시켜 불활화의 정도를 4°C와 실온에서 측정하였다. 바이러스 역가와 세포 독성 값을 산출하여 CCID₅₀/well (50% cell culture infective [또는 inhibitory] dose per well)로 바이러스 불활화 정도를 로그값으로 Table 1에 나타냈다. 4°C와 실온에서 미산성 HOCl 30 ppm 이상의 농도에서 PV1과 10분 이상 접촉할 때 99.9991% (> 5.04 log value)와 99.9992% (> 5.11 log value)의 바이러스 불활화가 관찰되어 효력이 있는 것으로 확인되었다. 따라서 AIV와 FMDV를 불활화시키는 효력이 있는지 확인하기 위해 LPAIV (H9N2)를 이용하여 미산성 HOCl 노출농도를 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm로 순차별로 소독력 검증을 실시하였다(Fig. 1). 60 ppm에서 바이러스 역가 감소치는 1.8 log 감소 그리고 120 ppm은 5 log 감소를 보여 바이러스 감소치가 4 log 이상으로 LPAIV에 대한 소독제 효력이 인정되었

Table 1. Inactivation of Polio virus Type 1 using weak acid hypochlorous solution at various concentrations generated from a hydroxyl (OH) Radical Steam Vehicle Disinfector

Virus disinfectant concentration (ppm)	CCID ₅₀ * (Log value)					
	4°C			Room temperature		
	0 min	10 min	30 min	0 min	10 min	30 min
0	nt	nt	0.72	nt	0.36	0.54
30	nt	> 5.04	> 5.04	nt	> 5.11	> 5.11
40	nt	> 4.93	> 4.93	nt	> 4.96	> 4.96
60	nt	> 4.85	> 4.95	nt	> 4.88	> 4.88

nt, no treatment.

*50% cell culture infectious dose (CCID).

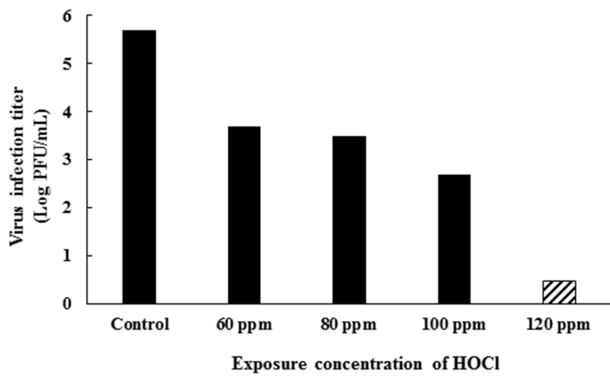


Fig. 1. Virus inactivation of weak acid hypochlorous solution (HOCl) against low pathogenicity avian virus (LPAIV). 120 ppm HOCl was found to be an effective disinfection concentration with cell toxicity.

Table 2. Inactivation of low pathogenic avian influenza virus (H9N2) after exposure to a weak acid hypochlorous solution (60 ppm) at various temperatures and times produced from hydroxyl (OH) Radical Steam Vehicle Disinfectant

Temperature (°C)	Reaction time (min)	Virus titer (Log PFU/mL)
4*	30	5.5
	5	4.3
45	7	3.5
	15	2.5
	3	1.5
55	5	0.6
	7	0
	2	0
65	3	0
	9	0

*Control.

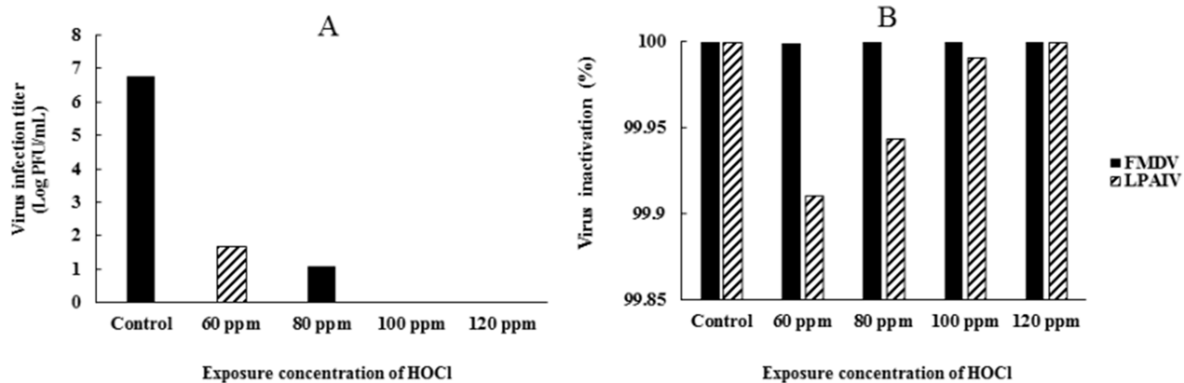


Fig. 2. (A) Inactivation of FMDV using a weak acid hypochlorous solution (HOCl) at various concentrations generated from hydroxyl (OH) Radical Steam Vehicle Disinfectant (B) Virus inactivation comparison of LPAIV and FMDV at various concentrations of HOCl. FMDV, foot-and-mouth disease virus; LPAIV, low pathogenicity avian virus.

다[21]. 하지만 120 ppm의 미산성 HOCl 농도에서는 세포독성을 보였다. 80 ppm에서 바이러스 역가 감소치는 2.2 log 감소, 100 ppm에서 3 log 감소를 보여 소독력이 없는 것으로 판정되었다. FMDV는 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, 120 ppm의 농도에서 4°C에서 30분간 노출시킨 후에 세포변성효과(CPE)로 소독력 확인한 결과(Fig. 2A), 60 ppm에서 바이러스 역가 감소치는 5.05 log, 80 ppm에서 5.65 log, 100 ppm과 120 ppm에서 6.75 log로 모두 99.9999% 이상의 불활성화를 보였다(Fig. 2B). 위의 결과를 기준으로 할 때 미산성 HOCl 60 ppm의 농도로 FMDV 차단 방역이 가능하나 AIV의 방역에는 적절치 않은 것으로 나타났다. AIV에 대하여 미산성 HOCl 60 ppm에서 노출온도와 노출시간에 따른 AIV 불활화 조건을 시험하였다(Table 2). 그 결과 60 ppm에서 노출온도와 노출시간을 55°C, 3분 혹은 65°C, 2분 이상으로 차량용 소독제를 적용 시 효과적으로 AIV 차단방역에 적용이 가능할 것으로 나타났다. 차량용 소독기에서 미산성 HOCl은 AIV와 FMDV를 불활화시키기 위해서는 미산성 HOCl의 온도와 노출시간이 중요한 요소인 것으로 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 농림식품기술기획평가원(IPET)의 가축질병대응 기술개발사업(1160983-3) 지원에 의하여 수행되었다.

References

1. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg* 1938;27:493-497.
2. Centers for Disease Control. Information on Avian Influenza. Centers for Disease Control, Atlanta, 2015. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/avianflu/index.htm>.
3. Lemon SM, Mahmoud AA. The threat of pandemic influenza: are we ready? *Biosecur Bioterror* 2005;3:70-73.
4. World Organisation for Animal Health (OIE). Avian Influenza Portal. World Organisation for Animal Health (OIE), Paris, 2014. Available from: <http://www.oie.int/animal-health-in-the->

- world/web-portal-on-avian-influenza/.
5. Park JH, Lee KN, Ko YJ, Kim SM, Lee HS, Park JY, Yeh JY, Kim MJ, Lee YH, Sohn HJ, Moon JS, Cho IS, Kim B. Outbreaks and diagnosis of foot-and-mouth disease serotype O in the Republic of Korea, April-June 2010. *Transbound Emerg Dis* 2014;61:277-284.
 6. Yoo HS. Foot and mouth disease: etiology, epidemiology and control measures. *Infect Chemother* 2011;43:178-185.
 7. Davies G. Foot and mouth disease. *Res Vet Sci* 2002;73:195-199.
 8. Yoon H, Yoon SS, Kim YJ, Moon OK, Wee SH, Joo YS, Kim B. Epidemiology of the Foot-and-mouth disease serotype O epidemic of november 2010 to April 2011 in the Republic of Korea. *Transbound Emerg Dis* 2015;62:252-263.
 9. Cho HW, Chu C. Years of epidemics (2009–2011): pandemic influenza and foot-and-mouth disease epidemic in Korea. *Osong Public Health Res Perspect* 2013;4:125-126.
 10. Korea Rural Economic Institute. Current Status of Foot-and-Mouth Disease and Improvement Plan. Korea Rural Economic Institute, Naju, 2017.
 11. Lee DH, Song CS. Surveillance of wild birds for avian influenza virus in Korea. *Korean J Vet Res* 2013;53:193-197.
 12. Oh GJ. Comparisons of attitude on media's report for avian influenza between poultry breeder and nonbreeder. *J Agric Med Community Health* 2009;34:58-66.
 13. Weber DJ, Barbee SL, Sobsey MD, Rutala WA. The effect of blood on the antiviral activity of sodium hypochlorite, a phenolic, and a quaternary ammonium compound. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1999;20:821-827.
 14. Kim YJ, Lee YJ, Jeong OM, Lee EK, Jeon WJ, Jeong WS. Characteristics of highly pathogenic avian influenza in Korea. *Korean J Vet Public Health* 2007;31:193-202.
 15. Yang M, Xu W, Goolia M, Zhang Z. Characterization of monoclonal antibodies against foot-and-mouth disease virus serotype O and application in identification of antigenic variation in relation to vaccine strain selection. *Virology* 2014; 11:136.
 16. Jeong J, Kang HM, Lee EK, Song BM, Kwon YK, Kim HR, Choi KS, Kim JY, Lee HJ, Moon OK, Jeong W, Choi J, Baek JH, Joo YS, Park YH, Lee HS, Lee YJ. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014. *Vet Microbiol* 2014;173:249-257.
 17. Hong JK, Lee KN, You SH, Kim SM, Tark D, Lee HS, Ko YJ, Seo MG, Park JH, Kim B. Inactivation of foot-and-mouth disease virus by citric acid and sodium carbonate with deicers. *Appl Environ Microbiol* 2015;81:7610-7614.
 18. Kim HM, Shim IS, Baek YW, Han HJ, Kim PJ, Choi K. Investigation of disinfectants for foot-and-mouth disease in the Republic of Korea. *J Infect Public Health* 2013;6:331-338.
 19. Takekawa JY, Newman SH, Xiao X, Prosser DJ, Spragens KA, Palm EC, Yan B, Li T, Lei F, Zhao D, Douglas DC, Muzaffar SB, Ji W. Migration of waterfowl in the East Asian flyway and spatial relationship to HPAI H5N1 outbreaks. *Avian Dis* 2010;54 Suppl:466-476.
 20. World Health Organization. Avian and Other Zoonotic Influenza. World Health Organization, Geneva, 2014. Available from: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/en/.
 21. Animal and Plant Quarantine Agency. Guidelines for Activity Test of Disinfectants. Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon, 2018.