

37. 살균소독력시험법

분석원리 : 본 시험방법은 기구등의 살균소독제의 살균소독력 유무를 측정하는 방법으로 제1법인 세균현탁액시험법과 제2법인 세균표면시험법 및 제3법인 포자현탁액시험법이 있으며, 별도의 규정이 없는 한 제1법인 세균현탁액시험법으로 측정한다.

살균소독력의 정의 : 기구등의 살균소독제에 대하여 규정된 조건에서 규정된 시험균의 초기균수(cfu/mL)에 대한 생균수(cfu/mL) 감소율(%)을 말한다.

제1법 세균현탁액시험법

본 시험방법에는 희석중화시험법과 막여과법이 있다. 희석중화시험법은 간섭물질이 들어있는 시험균주 현탁액을 시험용액에 첨가하여 20℃에서 5분간 반응시킨 후 미리 검증해 둔 적합한 중화제를 즉시 사용하여 반응을 억제시키고 각 시료중의 생균수를 측정하여 생균수 감소율을 측정하는 방법이다. 막여과법은 중화제 대신에 여과막을 사용하여 반응을 억제시키는 방법으로 적합한 중화제가 없는 경우 사용할 수 있다.

또한, 본 시험을 할 때에는 검증시험을 동시에 수행하여야 한다.

1) 시험용액의 조제

시험용액은 검체 일정량을 취하여 경수를 사용하여 다음과 같이 각각

다른 3가지 농도로 조제한다. 또한 이들 시험용액은 시험 60분전에 제조된 것을 사용하여야 한다.

- 제1액 : 제품에 표시된 사용농도보다 1.25배 높게 희석한 액. 단, 원액을 희석하지 않고 그대로 사용하는 경우에는 원액을 제1액으로 한다.

- 제2액 및 제3액 : 제1액을 2배 및 4배 희석한 액

2) 시험균주

다음의 2가지 시험균주를 표준균주로 사용한다.

- *Escherichia coli* ATCC 10536 또는 *Escherichia coli* ATCC 11229

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

다만, 상기 표준균주 외에 다음과 같은 시험균주를 선택하여 추가할 수 있다.

- *Bacillus cereus* ATCC 21772

- *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 27969

- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311

- *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (또는 *Listeria monocytogenes* ATCC 19115)

3) 시험균주의 활성배양

시험균주를 TSA배지에 도말하여 36℃에서 18~24시간 배양한다. 같은 방법으로 2차 배양을 하고 다시 3차 배양을 하며, 2차 배양균 또는 3차 배양균을 활성배양균으로 한다. 다만, 추가 시험균주 중 *V.*

*parahaemolyticus*의 활성배양을 위해서는 염화나트륨이 2%가 되도록 조정된 TSB배지 10mL에 시험균 10 μ L를 접종하여 36 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 배양한다. 1차 배양이 완료되면 2차 배양 및 3차배양은 염화나트륨이 2%가 되도록 조정된 TSB배지 100mL에 한다.

4) 시험균주 현탁액의 조제 및 계수

(1) 조제 : 100mL 삼각플라스크에 희석액(TSCS) 10mL와 유리비드(직경 3~4mm) 5g을 넣고 백금이를 사용하여 *E. coli* 활성배양균을 옮긴다. 이때 백금이를 희석액(TSCS)에 담그고 삼각플라스크의 벽면에 문질러 완전히 균괴가 떨어지도록 한 다음 3분간 진탕교반기를 이용하여 잘 섞은 후 유리비드 안쪽의 현탁액을 취하여 다른 시험관으로 옮긴다. 희석액(TSCS)을 사용하여 생균수를 1.5~5 $\times 10^8$ cfu/mL로 조정하고 20 $^{\circ}$ C의 항온수조에서 2시간 방치한 액을 *E. coli* 시험균주 현탁액으로 한다.

따로 *S. aureus* 활성배양균을 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 *S. aureus* 시험균주 현탁액을 조제한다. 다만, 추가 시험균주중 *V. parahaemolyticus*의 경우에는 상기 3)의 활성배양균을 멸균된 50mL 원심분리관에 넣고 20 $^{\circ}$ C, 5000 \times g (6,000rpm)에서 5분간 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 버린 후, 잔류된 균괴에 희석액(TSCS) 25mL를 첨가하여 10초간 진탕교반기를 이용하여 교반한다. 교반이 완료되면 다시 원심분리하여 상등액을 버린 후, 희석액(TSCS) 2mL를 첨가하여 균괴를 현탁시켜 둔다. 100mL 삼각플라스크에 희석액(TSCS) 10mL와 유리비드 5g을 넣고 미리 준비한 균 현탁액을 첨가하여 3분간 진탕교

반기를 이용하여 잘 섞은 후 희석액(TSCS)을 사용하여 생균수를 $1.5 \sim 5 \times 10^8$ cfu/mL가 되도록 조정하고 20°C의 항온수조에서 2시간 방치한 액을 시험균주 현탁액으로 한다.

(2) 계수 : 희석액(TSCS)을 사용하여 *E. coli* 시험균주 현탁액을 $10^{-6} \sim 10^{-7}$ 으로 희석한 후 이 액 1mL씩 2매의 페트리접시에 각각 넣고 45°C로 유지한 TSA배지 약 15mL를 무균적으로 분주하여 냉각응고시킨 후 TSA배지 3~5mL를 가하여 중첩시킨다. 냉각응고된 페트리접시를 거꾸로 하여 36°C에서 24시간 배양한다. 페트리접시에서 집락수를 세고 페트리접시를 24시간 추가 배양한다. 잘 분리된 집락이 추가로 보이지 않을 때, 페트리접시의 최대 집락수를 세어 *E. coli* 시험균주 현탁액의 생균수(N)를 다음 계산식에 따라 산정한다.

$$\text{시험균주 현탁액의 생균수}^*(\text{cfu/mL}) = \frac{c}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

- c : 페트리접시에서 계수된 집락수의 합
- n_1 : 첫 번째 희석에서 계수된 페트리접시의 수
- n_2 : 두 번째 희석에서 계수된 페트리접시의 수
- d : 첫 번째 희석액의 희석배수

* 생균수의 계산은 페트리접시 당 15~300개의 집락을 생성한 페트리접시를 택하여 계산한다. 결과의 신뢰성을 위하여 적어도 2개 이상의 페트리접시를 사용하여야 한다. 만약 2단계의 희석배수에서 모두 유효범위의 결과가 나오면 상기 식에 의하여 생균수를 산정한다. 단, 한 단계의 희석배수에서 유효범위의 결과를 얻었을 경우 생균수는 산술평균으로 계산한다. 계산된 결과는 두 자리 유효숫자를 얻을 때까지

반올림한다. 마지막 숫자가 5미만인 경우, 앞자리 숫자는 조정되지 않는다. 마지막 숫자가 5이상인 경우, 앞자리 숫자에 1을 더한다. 마지막 숫자가 5일 경우는 인접한 자리수가 홀수일 때는 위로 반올림하고, 짝수일 경우는 0으로 처리한다. 두 자리의 유효숫자를 얻을 때까지 이 과정을 반복한다. 생균수는 1.0과 9.9사이의 숫자를 10의 배수로 곱한 방식으로 계산한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁액을 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 *S. aureus* 시험균주 현탁액의 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주 현탁액의 생균수는 1.5×10^8 cfu/mL ~ 5×10^8 cfu/mL이어야 한다.

5) 시험균주 현탁희석액의 조제 및 계수

(1) 조제 : *E. coli*의 생균수가 $6 \times 10^2 \sim 3 \times 10^3$ cfu/mL가 되도록 *E. coli* 시험균주 현탁액을 희석액(TSCS)으로 희석하여 조제한 액을 *E. coli* 시험균주 현탁희석액으로 한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁액을 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 *S. aureus* 현탁희석액을 조제한다.

(2) 계수 : *E. coli* 시험균주 현탁희석액을 희석액(TSCS)으로 10배 희석하고 이 액 1mL씩 2매의 페트리접시에 각각 넣어 상기 4) (2)와 같이 배양한다. 페트리접시에서 최대 집락수를 세고 *E. coli* 시험균주 현탁희석액의 생균수(Nv)를 다음 계산식에 따라 산정한다.

$$\text{분시험 및 검증시험의 생균수}^*(\text{cfu/mL}) = \frac{c}{n \times d \times V}$$

c : 페트리접시에서 계수된 집락수의 합

n : 계수된 페트리접시의 수

d : 희석배수(희석중화시험법과 시험균주 현탁희석액의 경우에는 10^{-1})

V : 샘플의 부피(희석중화시험법과 그 검증시험 및 시험균주 현탁희석액의 경우에는 1.0mL, 막여과법과 그 검증시험의 경우에는 0.1mL)

따로 *S. aureus* 현탁 희석액을 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 *S. aureus* 시험균주 현탁희석액의 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주 현탁희석액의 생균수는 6×10^2 cfu/mL ~ 3×10^3 cfu/mL이어야 한다.

6) 시험조작

시험용액, 시험균주 현탁액, 시험균주 현탁희석액, 시액 및 물 등은 항온수조에서 20℃로 유지시킨다.

(1) 희석중화시험법

① 본시험

시험관에 간섭물질 1mL 및 *E. coli* 시험균주 현탁액 1mL를 첨가하여 즉시 혼합하고 20℃ 항온수조에서 2분간 방치한 후 시험용액(제1액) 8mL를 첨가하여 혼합한 다음 20℃ 항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 반응혼합액 1mL를 취하여 중화제 8mL와 물 1mL가 들어있는 시험관에 넣고 20℃ 항온수조에서 5분간 중화시킨다. 중화완료 후 중화반응액 1mL씩 2매의 페트리접시에 각각 넣고 상기 4) (2)와 같이 TSA 배지를 가하여 배양한다. 페트리접시에서 최대 집락수를 세고 시험용액의 살균소독 작용에 의한 생균수(N_a)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁액 및 나머지 시험용액(제2액 및 제3액)

에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 시험용액의 살균소독 작용에 의한 생균수를 산정한다. 단, 원액을 사용하는 검체는 시험용액 (제1액)을 9.8mL 첨가하고, 간섭물질 및 시험균주 현탁액의 농도를 상기 사용한 농도보다 10배 높게 조제하여 각각 0.1mL씩 첨가하여 상기 시험조작과 동일하게 조작한다.

② 검증시험

① 시험조건 검증법

시험관에 간섭물질 1mL와 *E. coli* 시험균주 현탁희석액 1mL를 넣고 수 초 간 혼합하여 20°C 항온수조에서 2분간 방치하고 경수 8mL를 첨가하여 혼합한 후 20°C 항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 반응혼합액에서 1mL씩 취하여 2매의 페트리접시에 각각 넣고 상기 4) (2)와 같이 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 시험조건 검증법에서의 생균수(A)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁희석액에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주의 생균수는 시험균주 현탁희석액 생균수의 0.05배수 이상이어야 한다.

② 중화제 독성 검증법

시험관에 중화제 8mL, 물 1mL 및 *E. coli* 시험균주 현탁희석액 1mL를 넣고 수 초간 혼합한 후 20°C 항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 반응혼합액에서 1mL씩 취하여 2매의 페트리접시에 각각 넣고 상기 4) (2)와 같이 TSA 배지를 가하여 배양한다. 페트리접시의 최대 집락

수를 세고 중화제 독성 검증법의 생균수(B)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁희석액에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주의 생균수는 시험균주 현탁희석액 생균수의 0.05배수 이상이어야 한다.

© 희석중화 검증법

시험관에 간섭물질 1mL, 희석액(TSCS) 1mL 및 시험용액(제1액) 8mL를 넣고 수 초간 혼합한 후 20℃항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 반응혼합액 1mL를 취하여 중화제 8mL가 담겨져 있는 시험관에 옮긴 후 20℃항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 액에 *E. coli* 시험균주 현탁희석액 1mL를 첨가하여 혼합하고 20℃항온수조에서 30분간 반응시킨다. 반응혼합액에서 1mL씩 취하여 2매의 페트리접시에 각각 넣고 상기 4) (2)와 같이 TSA 배지를 가하여 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 희석중화 검증법의 생균수(C)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁희석액에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주의 생균수는 중화제 독성시험법에서 산정한 생균수의 0.5배수 이상이어야 한다.

(2) 막여과법

시험용액, 시험균주 현탁액, 시액 및 물 등은 항온수조에서 20℃로 유지시킨다.

① 본시험

시험관에 간섭물질 1mL 및 *E. coli* 시험균주 현탁액 1mL를 첨가하여 즉시 혼합하고 20℃ 항온수조에서 2분간 방치한 후 시험용액(제1액) 8mL를 첨가하여 혼합한 다음 20℃ 항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 반응혼합액 0.1mL씩 취하여 세척액 50mL씩과 함께 2대의 막여과장치에 각각 옮기고 즉시 여과한다. 여과시간은 1분을 초과하지 않도록 한다. 각 막여과장치에 세척액 150~500mL씩 첨가하여 여과하고 추가로 물 50mL씩 첨가하여 여과한다. 여과막은 여과한 쪽을 위로 향하게 하여 TSA배지 표면에 밀착시켜 36℃에서 24시간 배양한다. 이 때, 여과막과 배지 표면 사이에 공기가 들어가지 않도록 주의한다. 페트리접시에서 집락수를 세고 페트리접시를 24시간 추가 배양한다. 잘 분리된 집락이 추가로 보이지 않을 때, 페트리접시에서 최대 집락수를 세고 시험용액의 살균소독 작용에 의한 생균수(Na)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁액 및 나머지 시험용액(제2액 및 제3액)에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 시험용액의 살균소독 작용에 의한 생균수를 산정한다. 단, 원액을 사용하는 검체는 시험용액(제1액)을 9.8mL 첨가하고, 간섭물질 및 시험균주 현탁액의 농도를 상기 사용한 농도보다 10배 높게 조제하여 각각 0.1mL씩 첨가하여 상기 시험조작과 동일하게 조작한다.

② 검증시험

㉠ 시험조건 검증법

상기 6) (2) ㉠의 *E. coli* 시험균주 현탁액 1mL 대신에 *E. coli* 시험균주 현탁희석액 1mL를, 시험용액(제1액) 8mL 대신에 경수 8mL를, 반응혼합액 0.1mL 대신에 반응혼합액 1mL를, 세척액 150 ~500mL 대신에 물 50mL를 사용하여 상기 시험과 동일하게 조작한다. 각 페트리 접시의 최대 집락수를 세고 시험조건 검증의 생균수(A)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁희석액에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 시험조건 검증의 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주의 생균수는 시험균주 현탁희석액 생균수의 0.05배수 이상이어야 한다.

㉡ 여과과정 검증법

E. coli 시험균주 현탁희석액 0.1mL씩 취하여 세척액 50mL씩과 함께 2대의 막여과장치에 각각 옮기고 즉시 여과한다. 각 여과장치에 물 50mL씩 첨가하여 여과한 후 여과지를 상기 6) (2) ㉠과 같이 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 여과과정 검증의 생균수(B)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁희석액에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 여과과정 검증의 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주의 생균수는 시험균주 현탁희석액 생균수의 0.05배수 이상이어야 한다.

© 여과방법 검증법

시험관에 간섭물질 1mL, 희석액(TSCS) 1mL 및 시험용액(제1액) 8mL를 첨가하여 혼합한 후 20℃ 항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 반응혼합물에서 0.1mL씩 취하여 세척액 50mL씩과 함께 2대의 막여과 장치에 각각 옮겨 여과하고 물 150mL~500mL씩 첨가하여 여과한다. 각 여과장치에 세척액 50mL 및 *E. coli* 시험균주 현탁희석액 0.1mL씩 첨가하여 여과한 후 물 50mL를 추가로 가하여 여과한 다음 여과지를 상기 6) (2) ①과 같이 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 여과방법 검증의 생균수(C)를 상기 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁희석액에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 여과방법 검증의 생균수를 산정한다. 이 때, 각 시험균주의 생균수는 여과과정 검증법에서 산정한 생균수의 0.5배수 이상이어야 한다.

7) 판정

각 시험균과 시험용액 별로 다음 계산식에 따라 생균수 감소율을 각각 계산하여 제1액의 생균수 감소율이 99.999%이상일 때 적합한 것으로 본다.

$$\text{생균수 감소율(\%)} = \frac{N - 10N_a}{N} \times 100$$

N_a : 시험용액의 살균소독 작용에 의한 생균수*(cfu/mL)

* 본 시험에서 계수된 집락수가 15개 이하인 경우의 생균수(N_a)는

“ 1.5×10^2 cfu/mL”를, 계수된 집락수가 300개 이상인 경우의 생균수(Na)는 “ 3×10^3 cfu/mL”를 각각 적용한다.

제2법 세균표면시험법

본 시험방법은 간섭물질이 들어있는 시험균주 현탁액을 스테인리스 스틸 표면에 도말하여 건조시킨 후 이 막위에 시험용액을 처리하여 20℃에서 5분간 반응시키고 즉시 검증된 적합한 중화제를 사용하여 반응을 억제 시키는 방법으로 각 표면의 생균수를 측정하여 생균수 감소율을 측정하는 방법이다. 다만, 본 시험을 할 때에는 시험용액 대신 희석액을 사용하여 대조시험을 실시하고 검증시험을 동시에 수행하여야 한다.

1) 시험용액의 조제

시험용액은 검체 일정량을 취하여 경수를 사용하여 다음과 같이 각각 다른 3가지 농도로 조제한다. 또한 이들 시험용액은 시험 60분전에 제조된 것을 사용하여야 한다.

제1액 : 제품에 표시된 사용농도로 희석한 액. 단, 원액을 희석하지 않고 그대로 사용하는 경우에는 원액을 제1액으로 한다.

제2액 및 제3액 : 제1액을 2배 및 4배 희석한 액

2) 시험균주

제1법 2)의 2가지 시험균주를 표준균주로 사용하되, 추가균주는 사용하지 않는다.

3) 시험균주의 활성배양

제1법 3)에 따른다.

4) 시험균주 현탁액의 조제 및 계수

제1법 4)에 따른다.

5) 시험표면 접종액의 조제

소형시험관에 *E. coli* 시험균주 현탁액 400 μ L와 간섭물질 100 μ L를 첨가하여 1분간 진탕교반기를 이용하여 잘 섞은 후 20 $^{\circ}$ C 항온수조에서 30분간 방치한 액을 *E. coli* 시험표면 접종액으로 한다.

따로 *S. aureus* 시험균주 현탁액에 대해서도 상기 시험조작과 같이 *S. aureus* 시험표면 접종액을 조제한다.

6) 시험표면의 조제

E. coli 시험표면 접종액 10 μ L를 담체(carrier, ϕ 1cm \times 0.07cm 스테인리스 스틸 디스크 ANSI 304 2B) 중앙에 접종하여 36 $^{\circ}$ C로 조절된 가열판 위에서 건조시킨 것을 *E. coli* 시험표면으로 한다. 따로 *S. aureus* 시험표면 접종액에 대해서도 상기 시험조작과 같이 *S. aureus* 시험표면을 조제한다.

7) 시험조작

시험용액, 시액, 기구 등은 20 $^{\circ}$ C로 유지시킨다. 담체와 유리병은 데시케이터에 건조하여 준비한다.

① 본시험

E. coli 시험표면을 멸균된 집계를 사용하여 *E. coli* 시험표면 접종액의 건조된 표면이 위로 향하게 하여 유리병(바닥 지름 2~3cm, 용량 1

5~20mL)에 조심스럽게 넣는다. 유리병안의 *E. coli* 시험표면 중앙에 시험용액(제1액) 50μL를 첨가하고 20℃에서 5분간 반응시킨 후 중화제 9.95mL와 유리비드 2~3g을 첨가하여 진탕교반기에서 1분간 혼합하고 막여과장치로 여과한다. 여과할 때 희석액(TSCS) 100~150mL를 2회 또는 3회 나누어 세척한다. 막여과장치로부터 여과막을 분리하여 제1법 (2) ①에 따라 배양한다. 상기 실험과정을 준비된 *E. coli* 시험표면으로 5회 반복한다. 각각 페트리접시의 최대 집락수를 세고 시험용액의 살균소독작용에 의한 생균수(Nd)를 다음 계산식에 따라 산정한다.

$$\text{본시험 및 검증시험의 생균수(cfu/carrier)} = \frac{c}{n \times d}$$

- c* : 페트리접시에서 계수된 집락수의 합
- n* : 계수된 페트리접시의 수
- d* : 희석배수

따로 희석액(TSCS)을 사용하여 대조시험의 생균수(Nc)를 산정한다. 이 때, 반응혼합액은 희석액(TSCS)으로 10^{-2} , 10^{-3} 및 10^{-4} 으로 희석하여 막여과장치로 여과하고 시험표면 반복횟수는 3회로 한다.

S. aureus 시험표면과 나머지 시험용액(제2액 및 제3액)에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 시험용액의 살균소독작용에 의한 생균수를 산정한다. 각 시험균의 대조시험 생균수는 상기 식에 따라 산정할 때 1.5×10^5 cfu/carrier이상이어야 한다.

② 검증시험

① 중화 검증법

유리병에 중화제 9.95mL와 시험용액(제1액) 50 μ L를 넣고 혼합하여 20 $^{\circ}$ C에서 5분간 정치시킨 후 *E. coli* 시험표면과 유리비드 2~3g을 첨가한다. 진탕교반기에서 1분간 혼합한 후 반응혼합액을 10^{-3} , 10^{-4} 및 10^{-5} 으로 희석하여 막여과장치로 여과한다. 여과할 때 희석액 100~150mL를 2회 또는 3회 나누어 세척한다. 막여과장치로부터 여과막을 분리하여 제1법 (2) ①에 따라 배양한다. 상기 기술된 실험과정을 따로 준비한 *E. coli* 시험표면으로 2회 반복한다. 각각 페트리접시의 최대 집락수를 세고 중화 검증법 시험의 생균수(B)를 상기 7) ①의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험표면에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 중화 검증법 시험의 생균수를 산정한다. 각 시험균주의 생균수는 1.5×10^5 cfu/carrier 이상이어야 한다.

② 중화제 독성 검증법

상기 7) ② ①의 시험용액(제1액) 대신 희석액(TSCS)을 사용하여 상기 중화 검증법에 따라 시험한다. 각각 페트리접시의 최대 집락수를 세고 중화제 독성 검증법 시험의 생균수(A)를 상기 7) ①의 계산식에 따라 산정한다.

따로 *S. aureus* 시험표면에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 중화제 독성 검증법 시험의 생균수를 산정한다. 각 시험균주의 생균수는 중화검증법에서 산정한 생균수의 0.5배수 이상~2배수 이하이어야 한다.

8) 판정

각 시험균과 시험용액별로 다음 계산식에 따라 생균수 감소율을 각각 계산하여 제1액의 생균수 감소율이 99.99%이상일 때 적합한 것으로 본다.

$$\text{생균수 감소율(\%)} = \frac{N_c - N_d}{N_c} \times 100$$

N_c : 대조시험의 생균수(cfu/carrier)

N_d : 시험용액의 살균소독 작용에 의한 생균수*(cfu/carrier)

* 본 시험에서 계수된 집락수가 15개 이하인 경우의 생균수(N_d)는 “1.5 ×10 cfu/carrier”를, 계수된 집락수가 300개 이상인 경우의 생균수(N_d)는 “3×10² cfu/carrier”를 각각 적용한다.

제3법 포자현탁액시험법

본 시험방법에는 희석중화시험법과 막여과법이 있다. 희석중화시험법은 간섭물질이 들어있는 포자 현탁액을 시험용액에 첨가하여 20℃에서 60분간 반응시킨 후 미리 검증해 둔 적합한 중화제를 즉시 사용하여 반응을 억제시키고 각 시료중의 포자수를 측정하여 그 감소율을 측정하는 방법이다. 막여과법은 중화제 대신에 여과막을 사용하여 반응을 억제시키는 방법으로 적합한 중화제가 없는 경우 사용할 수 있다.

또한, 본 시험을 할 때에는 검증시험을 동시에 수행하여야 한다.

1) 시험용액의 조제

시험용액은 검체 일정량을 취하여 경수를 사용하여 다음과 같이 각각 다른 3가지 농도로 조제한다. 또한 이들 시험용액은 시험 60분전

에 제조된 것을 사용하여야 한다.

제1액 : 제품에 표시된 사용농도보다 1.25배 높게 희석한 액. 단, 원액을 희석하지 않고 그대로 사용하는 경우에는 원액을 제1액으로 한다.

제2액 및 제3액 : 제1액을 2배 및 4배 희석한 액

2) 시험균주

Bacillus subtilis ATCC 6633을 사용한다.

3) 포자용액의 조제

약 10^6 개의 포자를 보통배지에 접종하고 30℃에서 18~24시간 배양한다. 이 배양액 2~3mL를 황산망간첨가 한천배지를 넣어 굳힌 배양병(Roux bottle)에 접종하여 30℃에서 14일간 배양한다. 멸균유리구슬과 물로 집균하여 10,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상층액을 제거한 다음 다시 물에 부유시켜 세척하는 과정을 3회 반복하고 잔사를 물에 부유시켜 75℃에서 10분간 가열한다. 이 포자용액은 냉장보관 하여 사용하되 장기보관시에는 냉동보관한다.

4) 포자현탁액의 조제 및 계수

(1) 조제 : 포자액을 물을 사용하여 $1.5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL로 조정하고 20℃항온수조에서 방치한 액을 포자현탁액으로 한다. 이 액은 제조 후 2시간 이내에 사용하여야 한다.

(2) 계수 : 물을 사용하여 포자현탁액을 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 으로 희석한 후 이 액 1mL씩 2매의 페트리접시에 각각 넣고 45℃로 유지한 보통한천배지를 가하여 제1법 4) (2)에 따라 배양하고 포자현탁액의 포자수(N)를

산정한다. 이 때, 포자현탁액의 포자수는 $1.5 \sim 5 \times 10^6$ cfu/mL이어야 한다.

5) 포자현탁희석액의 조제 및 계수

(1) 조제 : 포자의 수가 $6 \times 10^2 \sim 3 \times 10^3$ cfu/mL가 되도록 포자현탁액을 물로 희석하여 조제한 액을 포자현탁 희석액으로 한다.

(2) 계수 : 포자현탁희석액을 물로 10배 희석하고 이 액 1mL씩 취하여 2매의 페트리접시에 각각 넣고 45°C로 유지한 보통한천배지를 가하여 제1법 4) (2)와 같이 배양한다. 페트리접시에서 최대 집락수를 세고 포자현탁희석액의 포자수(N_V)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다. 이 때, 포자현탁희석액의 포자수는 6×10^2 cfu/mL \sim 3×10^3 cfu/mL이어야 한다.

6) 시험조작

다음의 접촉온도(θ) 및 접촉시간(t)을 사용한다.

- 접촉온도(θ) : 20°C
- 접촉시간(t) : 60분

다만, 상기 조건외에 다음과 같은 조건을 선택하여 추가할 수 있다.

- 접촉온도(θ) : 4°C, 10°C, 40°C 또는 75°C 등
- 접촉시간(t) : 5분, 15분 또는 30분 등

시험전 모든 시약은 다음의 온도에서 유지되어야 한다.

- 접촉온도(θ)가 40°C 이하인 경우 : 시험용액, 포자현탁액, 간섭물질은 항온수조에서 θ °C로, 중화제 및 물은 20°C로 유지시킨다.

- 접촉온도(θ)가 40°C 를 초과하는 경우 : 시험용액은 $\theta^{\circ}\text{C}$ 로, 중화제, 포자현탁액, 간섭물질, 물은 20°C 로 유지시킨다.

(1) 희석중화시험법

① 본시험

시험관에 간섭물질 1mL 및 포자현탁액 1mL를 첨가하여 즉시 혼합하고 $\theta^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 2분간 방치한 후 시험용액(제1액) 8mL를 첨가하여 혼합한 다음 $\theta^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 t 분간 반응시킨다. 이 반응혼합액 1mL를 취하여 중화제 8mL와 물 1mL가 들어있는 시험관에 넣고 20°C 항온수조에서 5분간 중화시킨다. 중화완료 후 중화반응액 1mL씩 2매의 페트리접시에 각각 넣고 보통한천배지를 가하여 제1법 4) (2)와 같이 배양한다. 페트리접시에서 최대 집락수를 세고 시험용액의 멸균 작용에 의한 포자수(Na)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다.

따로 나머지 시험용액(제2액 및 제3액)에 대해서도 상기 시험조작과 동일하게 조작하여 시험용액의 멸균 작용에 의한 포자수를 산정한다. 단, 원액을 사용하는 검체는 시험용액(제1액)을 9.8mL 첨가하고, 간섭물질 및 포자 현탁액의 농도를 상기 사용한 농도보다 10배 높게 조제하여 각각 0.1mL씩 첨가하여 상기 시험조작과 동일하게 조작한다.

② 검증시험

Ⓐ 시험조건 검증법

시험관에 간섭물질 1mL와 포자현탁희석액 1mL를 넣고 수 초 간 혼합하여 $\theta^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 2분간 방치하고 경수 8mL를 첨가하여 혼합한 후

$\theta^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 t 분간 반응시킨다. 이 반응혼합액에서 1mL씩 취하여 2매의 페트리접시에 각각 넣고 제1법 4) (2)와 같이 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 시험조건 검증법에서의 포자수(A)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다. 이 때, 포자수는 포자현탁희석액 포자수의 0.05배수 이상이어야 한다.

㉑ 중화제 독성 검증법

시험관에 중화제 8mL, 물 1mL 및 포자현탁희석액 1mL를 넣고 수 초간 혼합한 후 20°C 항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 반응혼합액에서 1mL씩 취하여 2매의 페트리접시에 각각 넣고 제1법 4) (2)와 같이 보통한천배지를 가하여 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 중화제 독성 검증법의 포자수(B)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다. 이 때, 포자수는 포자현탁희석액 포자수의 0.05배수 이상이어야 한다.

㉒ 희석중화 검증법

시험관에 간섭물질 1mL, 물 1mL 및 시험용액(제1액) 8mL를 넣고 수 초간 혼합한 후 $\theta^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 t 분간 반응시킨다. 이 반응혼합액 1mL를 취하여 중화제 8mL가 담겨져 있는 시험관에 옮긴 후 20°C 항온수조에서 5분간 반응시킨다. 이 액에 포자현탁희석액 1mL를 첨가하여 혼합하고 20°C 항온수조에서 30분간 반응시킨다. 반응혼합액에서 1mL씩 취하여 2매의 페트리접시에 각각 넣고 제1법 4) (2)와 같이 보통한천배지를 가하여 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 희석중화 검증법의 포자수(C)를 상기 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한

다. 이 때, 포자수는 중화제 독성시험법에서 산정한 포자수의 0.5배수 이상이어야 한다.

(2) 막여과법

① 본시험

시험관에 간섭물질 1mL 및 포자현탁액 1mL를 첨가하여 즉시 혼합하고 θ C항온수조에서 2분간 방치한 후 시험용액(제1액) 8mL를 첨가하여 혼합한 다음 θ C항온수조에서 t분간 반응시킨다. 이 반응혼합액 0.1mL씩 취하여 세척액 50mL씩과 함께 2대의 막여과장치에 각각 옮기고 즉시 여과한다. 여과시간은 1분을 초과하지 않도록 한다. 각 막여과장치에 세척액 150~500mL씩 첨가하여 여과하고 추가로 물 50mL씩 첨가하여 여과한다. 여과막은 여과한 쪽을 위로 향하게 하여 보통한천배지 표면에 밀착시켜 36°C에서 24시간 배양한다. 이 때, 여과막과 배지 표면 사이에 공기가 들어가지 않도록 주의한다. 페트리접시에서 집락수를 세고 페트리접시를 24시간 추가 배양한다. 잘 분리된 집락이 추가로 보이지 않을 때, 페트리접시에서 최대 집락수를 세고 시험용액의 평균 작용에 의한 포자수(N_a)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다. 단, 원액을 사용하는 검체는 시험용액(제1액)을 9.8mL 첨가하고, 간섭물질 및 포자현탁액의 농도를 상기 사용한 농도보다 10배 높게 조제하여 각각 0.1mL씩 첨가하여 상기 시험조작과 동일하게 조작한다.

② 검증시험

㉠ 시험조건 검증법

상기 6) (2) ①의 포자현탁액 1mL 대신에 포자현탁희석액 1mL를, 시험용액(제1액) 8mL 대신에 경수 8mL를, 반응혼합액 0.1mL 대신에 반응혼합액 1mL를, 세척액 150~500mL대신에 물 50mL를 사용하여 상기 시험과 동일하게 조작한다. 각 페트리접시의 최대 집락수를 세고 시험조건 검증의 포자수(A)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다. 이 때, 포자수는 포자현탁희석액 포자수의 0.05배수 이상이어야 한다.

㉡ 여과과정 검증법

포자현탁희석액 0.1mL씩 취하여 세척액 50mL씩과 함께 2대의 막여과장치에 각각 옮기고 즉시 여과한다. 각 여과장치에 물 50mL씩 첨가하여 여과한 후 여과지를 제1법 6) (2) ①과 같이 배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 여과과정 검증의 포자수(B)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다. 이 때, 포자수는 포자현탁희석액 포자수의 0.05배수 이상이어야 한다.

㉢ 여과방법 검증법

시험관에 간섭물질 1mL, 물 1mL 및 시험용액(제1액) 8mL를 첨가하여 혼합한 후 θC 항온수조에서 t 분간 반응시킨다. 이 반응혼합물에서 0.1mL씩 취하여 세척액 50mL씩과 함께 2대의 막여과장치에 각각 옮겨 여과하고 물 150mL~500mL씩 첨가하여 여과한다. 각 여과장치에 세척액 50mL 및 포자 현탁희석액 0.1mL씩 첨가하여 여과한 후 물 50mL를 추가로 가하여 여과한 다음 여과지를 제1법 6) (2) ①과 같이

배양한다. 페트리접시의 최대 집락수를 세고 여과방법 검증의 포자수 (C)를 제1법 5) (2)의 계산식에 따라 산정한다. 이 때, 포자수는 여과과정 검증법에서 산정한 포자수의 0.5배수 이상이어야 한다.

7) 판정

시험용액 별로 다음 계산식에 따라 포자수 감소율을 각각 계산하여 제 1액의 포자수 감소율이 99.9%이상일 때 적합한 것으로 본다.

$$\text{포자수 감소율(\%)} = \frac{N - 10N_a}{N} \times 100$$

N_a : 시험용액의 멸균 작용에 의한 포자수*(cfu/mL)

* 본시험에서 계수된 집락수가 15개 이하인 경우의 생균수(N_a)는 “ 1.5×10^2 cfu/mL”를, 계수된 집락수가 300개 이상인 경우의 생균수(N_a)는 “ 3×10^3 cfu/mL”를 각각 적용한다.

장 치

막여과장치 : 최소한 50mL의 용액을 담을 수 있어야 하고 적합한 여과막(지름 : 47~50mm, pore size : $0.45\mu\text{m}$)을 사용하여야 한다. 진공을 사용하는 경우 균일한 여과율을 보여 미생물이 여과막 전면에 균일하게 분포될 수 있어야 하며 지나치게 장시간 여과를 하지 않도록 세척액 100mL가 20~40초 사이에 여과될 수 있도록 설계되어야 한다.

배 지

1) TSA배지(Tryptone Soya Agar)

Tryptone, pancreatic digest of casein	15.0g
Soya peptone, papaic digest of soybean meal	5.0g
NaCl	5.0g
Agar	15.0g

위의 성분을 증류수 1,000mL에 녹여 pH 7.2로 조정 한 후 121℃에서 15분간 멸균한다.

2) TSB배지(Tryptone Soya Broth)

Tryptone, pancreatic digest of casein	15.0g
Soya peptone, papaic digest of soybean meal	5.0g
NaCl	5.0g

위의 성분을 증류수 1,000mL에 녹여 pH 7.2로 조정 한 후 121℃에서 15분간 멸균한다.

3) 보통배지(Nutrient Broth)

Peptone	10.0g
Beef Extract	3.0g

위의 성분을 증류수 1,000mL에 녹여 pH 7.2로 조정 한 후 121℃에서 15분간 멸균한다.

4) 보통한천배지(Nutrient Agar)

보통배지 1,000mL에 정제한천 15.0g을 가하여 가열 용해하고 증류수양을 보정한다. pH 6.8로 조정 한 후 121℃에서 15분간 멸균한다.

5) 황산망간첨가 한천배지(Amended Nutrient Agar)

보통한천배지에 황산망간($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)을 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 가하고 121°C 에서 15분간 멸균한다.

시 액

1) 멸균인산완충용액

무수인산이수소칼륨 34g을 증류수 500mL에 용해하고 1N 수산화나트륨 175mL를 가해 pH 7.2로 조정하고 여기에 증류수를 가하여 1,000mL로 하여 인산완충액으로 한다. 이것을 121°C 에서 20분간 멸균한 후 이 액 1mL를 멸균증류수 800mL에 가하여 희석한 액을 멸균인산완충용액으로 한다.

2) 물

유해한 물질이나 미생물의 성장을 방해하는 물질이 없어야 한다. 증류된 물을 사용하되 탈염된 물을 사용하여서는 안 된다. 121°C 에서 15분간 멸균한다.

3) 희석액(TSCS)

Tryptone Sodium Chloride Solution:

Tryptone, pancreatic digest of casein 1.0g

NaCl 8.5g

위의 성분을 증류수 1,000mL에 녹여 pH 7.2로 조정한 후 121°C 에서 15분간 멸균한다.

4) 중화제

다음의 중화제 중에서 적절한 것을 선택하여 멸균된 것을 사용하고 검 증시험에서 유효성이 검증되어야 한다.

(1) 기본 중화혼합제

레시틴(lecithin)	3g
폴리소르베이트80(polysorbate 80)	30g
치오설페이트염(sodium thiosulfate)	5g
히스티딘(L-histidine)	1g
사포닌(saponine)	30g

위의 성분을 1% 멸균인산완충용액 또는 희석액을 가하여 1,000mL 로 한다.

(2) 멸균인산완충용액

인산이수소칼륨(KH_2PO_4) 34g을 물 500mL에 용해하고 1N 수산화나 트륨액을 이용하여 pH 7.2로 조정한다. 다음 이 액에 물을 가하여 1,000mL로 한다.

(3) 5% 또는 0.5%(V/V) 난황 용액

살균된 난황액(난황에 동량의 멸균생리식염수를 가한 것)을 10mL 또는 1mL에 물을 첨가하여 100mL로 한다.

(4) 3%(V/V) 폴리소르베이트80, 4g/L 라우릴설페이트염(sodium lauryl sulfate)과 3g/L 레시틴을 함유한 용액

(5) 5%(V/V) 난황과 4%(V/V) 폴리소르베이트80를 함유한 용액

(6) 7%(V/V) ethylene oxide condensate of fatty alcohol, 20g/L 레시틴과 4%(V/V) 폴리소르베이트80을 함유한 용액

(7) 4%(V/V) ethylene oxide condensate of fatty alcohol와 4g/L 레시틴을 함유한 용액

(8) 3%(V/V) 폴리소르베이트80, 3g/L 레시틴과 1g/L 히스티딘을 함유한 용액

(9) 글라이신(glycine)

(10) 3%(V/V) 폴리소르베이트80과 3g/L 레시틴을 함유한 용액

(11) 50mg/mL 인지질 유화제와 4g/L 레시틴을 함유한 용액

(12) 0.05g/L 또는 0.5g/L 치오글리콜레이트염용액

(13) 0.8g/L 또는 1.5g/L 시스테인용액

(14) 0.5g/L 치오설페이트염용액

상기에서 열거한 중화제 이외에 적절한 다른 중화제를 사용할 수 있다.

5) 세척액

세척액은 멸균된 것을 사용하고 막을 통하여 여과 될 수 있어야 한다.

다음의 세척액 중 한가지를 사용할 수 있다.

(1) 물

(2) 희석액(TSCS)

(3) 0.1%(V/V) 폴리소르베이트80 용액

(4) 0.5%(V/V) 폴리소르베이트80 용액

(5) 0.5%(V/V) 폴리소르베이트80과 레시틴(0.7g/L)을 함유한 용액

(6) 중화제

(7) 멸균인산완충용액

상기에서 열거한 용액 이외에 적절한 다른 용액을 사용할 수 있다.

6) 경수

검체의 희석에 사용되는 경수는 다음과 같이 조제한다.

- 용액 A : 19.84g의 무수 염화마그네슘과 46.24g의 무수염화칼슘을 물에 용해하여 1L로 맞춘다.

- 용액 B : 35.02g의 탄산수소나트륨을 물로 용해하여 1,000mL로 맞춘다.

1,000mL의 메스플라스크에 용액 A 3.0mL를 넣고 최소 600mL의 물을 가해주고, 용액 B 8.0mL를 가해준 후 물을 가하여 1,000mL로 한다. 용액의 pH를 7.0으로 조정하고 최대 pore size가 0.45 μ m 이하인 여과막에 통과시켜 제공한다. 용액은 4~8 $^{\circ}$ C에서 최대 1개월 간 보관할 수 있다.

7) 세균현탁액시험법 또는 포자현탁액시험법의 간섭물질

간섭물질로는 알부민용액(청정조건 또는 오염조건)을 사용하여야 하나 간섭물질이 시험용액과 반응하여 침전이 발생할 경우 다음의 적절한 간섭물질을 선택하여 실험할 수 있다.

(1) 알부민 용액(Bovine albumin solutions)

시험에 사용되는 알부민 용액의 조제는 다음과 같다.

- 청정조건을 위한 조제

0.3g의 알부민(Dubos medium을 위한 Cohn fraction V)을 물 100mL에 녹이고 막여과를 통하여 제공한다.

- 오염조건을 위한 조제

3g의 알부민(Dubos medium을 위한 Cohn fraction V)을 물 100mL에 녹여서 막여과를 통하여 제공한다.

(2) 우유

항생제나 어떠한 첨가제도 들어있지 않은 분말우유 100g을 물 1/로 용해한 후 10%(V/V)용액으로 제조하여 105°C에서 30분(또는 121°C에서 5분)간 멸균한다.

(3) 효모추출물

미생물용 건조 효모추출물을 물에 100g/L이 되도록 용해하고, NaOH를 이용하여 pH를 7.0±0.2 로 조정한 후 121°C에서 15분간 멸균한다.

(4) 서당

서당을 물에 100g/L이 되도록 용해하고 여과막을 이용하여 제공한다.

(5) pH 5와 pH 9의 완충용액

(6) 라우릴설페이트염(Sodium lauryl sulfate)

라우릴설페이트염을 물에 50g/L이 되도록 용해하고 121°C에서 15분간 멸균한다.

8) 세균표면시험법의 간섭물질

실제사용 조건을 반영하기 위하여 사용되는 간섭물질은 알부민용액과 트립톤용액을 혼합하여 제조한 것으로 다음의 제조방법에 따라 제조하여 보관한다.

- 알부민용액 : 멸균인산완충용액 10mL에 알부민 0.3g을 첨가하고 여과
제균한다.

- 트립톤용액 : 멸균인산완충용액 10mL에 트립톤 0.1g을 첨가하고 여과
제균한다.

각 여과제균한 용액을 사용하기 직전에 50 μ L씩 동량 혼합하고 20 $^{\circ}$ C에
보관한다.