

정 오 표

페이지	줄	원문	수정	비고
8	8	포장하여	포장되어야	하여 → 되어야
88	14	침입된	침입한	된 → 한
89	9	침천	침전	천 → 전
120	19	15LB	15lb	LB → lb
125	8	K987	987P	K 삭제 P 추가
151	제목(영문)	Inactvate	Inactvated	d 추가
158	4	(srellitism)	(satellitism)	sre → sate
225	30	sf9	Sf9	대문자
226	4	sf9	Sf9	대문자
270	25	가리나룸	갈리나룸	가 → 갈
276	7	봉전한다	봉전한다.	마침표
294	13	단총을	단총이	을 → 이
304	12	형성되었을	형성되었을	었 → 었
321	27	바이올렛	바이올렛	오 → 올
329	8	요막강액	뇨막강액	요 → 뇨
337	28	봉전한다	봉전한다.	마침표
338	1	생물학적제제	생물학적제제	적 추가
388	제목(영문)	Parvovirus·Coro~	Parvovirus, Coro~	· → ,
394	5	DAB ~...	DAB ~... 1ml	1ml 줄위로
396	1	florescence	fluorescence	u 추가
397	3	danine	caninie	d → c
401	19	β-propiolatone	β-propiolactone	c 추가
411	제목(영문)	Compounded	Compound	e 삭제
433	2	안된다	아니된다	안 → 아니
463	1	tuberclin	tubeculin	u 추가
463	5	Tubeculin	Tuberculin	r 추가
581	16	freezing/thwing	freez-thaw cycle	
624	6	Clycerine	Glycerine	C → G
635	10	Bloking	Blocking	c 추가
640	14	multiplctyity	multiplcty	ity 삭제
643	10	다.(kalo~)	다(kalo~).	마침표 위치변경
647	4	congugate	conjugate	g → j
667	20	다.(se~)	다(se~).	마침표 위치변경
672	26	카바스립프 표본	카바스립 표본	프 삭제
677	24	카바스립프 표본	카바스립 표본	프 삭제
702	16	fachyzoit	fachyzoite	e 추가
703	12	kit을	kit를	을 → 를
735	12	이진희석	2진희석	이 → 2
744	9	인산완충심염수	인산완충식염수	심 → 식
746	12	이진희석	2진희석	이 → 2
746	28	분분주	분주	분 삭제
761	제목(영문)	Bursa	Bursal	l 추가
764	11	디시	디쉬	시 → 쉬
769	12	유효한다	유효하다	한 → 하
774	7	유효한다	유효하다	한 → 하
778	29	디시	디쉬	시 → 쉬
816다음	6	새균성	세균성	새 → 세

GOVP1200520836

636,0805
L-2
2004

발간등록번호

11-1380644-000054-01

동물용 생물학적제제 기준(안)

Standard of Veterinary Biologicals (draft)

2004

농 립 부
국립수의과학검역원



동물용 생물학적제제 기준(안) 내용목록

1. 발간사
2. 편집위원 명단
3. 목차
 - 동물용 생물학적제제 총칙
 - 통 칙
 - 동물용 생물학적제제 각조
 - 백신
 - 진단제제
 - 동물용 생물학적제제 일반 시험법
 - 부록
 - 동물용 생물학적제제 분류번호
 - 동물용 생물학적제제 제품명칭
 - 시약, 시액, 완충액 및 배지

여 백

발 간 사

동물용 생물학적제제 기준서(안)의 초판을 발간하게 된 것을 참으로 기쁘게 생각합니다. 동물용의약품의 제조·수입 및 판매 등에 관한 사항과 국가검정 등에 관한 사항을 총괄적으로 규정하고 있는 「동물용의약품등취급규칙」(농림부령) 제45조는 국립수의과학검역원장이 동물용의약품 등의 규격과 기타 필요한 기준을 정하여 고시할 수 있도록 규정하고 있으며, 그에 따라 동물용의약품 중항생제나 일반 화학제에 대한 기준서(동물용의약품공정서; 국립수의과학검역원 고시)가 과거에 만들어져 다수의 개정판이 발간되어왔지만 동물용 생물학적제제에 대한 기준서는 현재까지 발간된 적이 없었습니다.

한편, 인체의약품의 경우 약사법 제44조에 의거하여 「생물학적제제기준및시험방법」을 식품의약품안전청 고시로 제정하여 지속적으로 개정판을 발간해 오고 있는 실정이며, 일본 등 선진국에서도 동물용 생물학적제제의 기준이 별도로 제정되어 운용되고 있는 것을 고려하여 이 책의 집필자들은 동물용 생물학적제제의 개발·연구 및 생산에 필수적으로 요구되는 통일된 기준을 제정하여 동물용 백신 및 진단제제를 효율적으로 생산하고 품질을 관리할 수 있는 지침서를 만들고자 하였습니다.

이 기준서는 가축위생연구소의 전신인 우역혈청소 창립(1911년) 이후부터 가축위생연구소가 발족되어 현재 국립수의과학검역원에 이르기까지(1911년~2002년) 약 90년간 국내에서 개발한 각종 중요한 동물용 생물학적제제의 기준 및 시험방법을 집대성하여 국내에서 최초로 발간되는 동물용 생물학적제제 기준의 단행본으로서, 국립수의과학검역원의 수의과학기술개발 연구사업의 연구과제로 수행되었으며 국립수의과학검역원의 다수 연구원들이 상당한 시간과 노력을 투입하여 완성하게 되었음을 밝혀둡니다. 각각의 품목별 기준 및 세부내용을 기술하기 위하여 국내에서 동물용 생물학적제제를 생산하고 있는 5개 회사의 제품제조기준서 등을 참고하였으며 동물용 생물학적제제 총칙 및 통칙 관련사항은 식품의약품안전청의 「생물학적제제기준및시험방법」의 관련 부분들을 참조로 하여 작성하였음을 아울러 밝혀둡니다.

이렇게 작성된 동물용 생물학적제제 기준서(안)를 초석으로 하여 관련부서 및 제조회사 등과의 추가적인 협의를 거쳐 가까운 시기에 국립수의과학검역원 고시로 제정되어 운용되기를 바라며, 동물용 생물학적제제의 효율적인 생산, 공정성의 확보 및 품질향상에 크게 기여하여 동물 질병의 효율적인 예방 및 진단을 통하여 국내 수의·축산분야 산업의 발전 및 안전축산식품의 생산에 크게 이바지하는 계기가 되기를 기원합니다.

다시 한번 집필한 연구원들의 노고에 감사드리며 본서는 최초로 발간되는 기준서인 관계로 미진하거나 잘못된 부분이 있을 것으로 생각되며 이러한 문제점들에 대해서는 앞으로 관련 전문가 여러분의 관심과 지속적인 충고를 부탁드립니다, 향후에 보다 발전된 개정판이 계속하여 출판되기를 바랍니다.

2004년 12월

편집위원장 수의학박사 **김재학**

동물용 생물학적제제 기준(안) 편집위원 명단

위원장 : 김재학	책임연구원 수의학박사
위원 : 김병한	가축위생연구원 수의학박사
이희수	가축위생연구원 수의학박사
권창희	가축위생연구원 수의학박사
강승원	가축위생연구원 수의학박사
성환우	가축위생연구원 수의학박사

목 차

I. 동물용 생물학적제제 총칙	3
II. 통칙	9
III. 동물용 생물학적제제 각조	17
1. 백신	25
2. 진단제제	457
IV. 동물용 생물학적제제 일반시험법	789
V. 부록	809

여 백

I. 동물용 생물학적제제 총칙

여 백

I. 동물용 생물학적제제 총칙

1. 목적

이 규정은 약사법 제44조 및 동물용의약품등 취급규칙 제45조의 규정에 의거 동물용 생물학적제제의 기준에 관한 총칙을 규정함을 목적으로 한다.

2. 생산관리

2.1. 동일 장소에서 2가지 이상의 제제를 동시에 제조할 수 없으며 동일제제 생산에 사용되는 균 또는 바이러스주들도 동시에 동일 장소에서 취급할 수 없다.

2.2. 청결

생산에 사용되는 장치, 장비와 물자는 청결하여야 하고 독성물질의 오염으로부터 방지하여야 한다.

2.3. 정돈

제제 생산조작 중의 모든 용기는 표시를 하여 식별하기 쉽게 정돈하여야 한다.

2.4. 오염의 방지

2.4.1. 아포 형성균 또는 바이러스 제제에 대한 모든 생산은 격리된 장소에서만 국한함을 원칙으로 한다.

2.4.2. 바이러스 제제는 각각 따로 작업할 수 있도록 하고 다른 제제 생산 장소로 바이러스의 이동이 가능한 공기 전파 등(특히 원심과 혼합할 때)을 방지하도록 유의하여야 한다.

2.4.3. 동일 작업일에 동일인이 다른 제제 생산에 종사하지 않도록 충분한 종사자를 확보하고 있어야 한다.

2.4.4. 동일한 장소에서 다른 제제를 계속 생산하고자 할 때는 타 제제 생산과의 중간에는 만족할 만한 소독 또는 멸균을 하여야 한다.

2.4.5. 진단용으로 송부된 병성감정용 검체는 격리된 장소에서 시험하여야 하며 분리된 병원체는 바로 제제 생산용으로 사용할 수 없다.

(단, 자가농장용 백신일 경우에는 예외로 한다.)

2.5. 동물관리

2.5.1. 생산 또는 시험용으로 사용하는 동물은 전염성 질병의 증세가 있는지 관찰하여야 하며 항상 충분한 수를 수용하여야 한다.

- 2.5.2. 동물은 항상 잘 균형된 사료로서 청결하게 위생적으로 사육하여야 한다.
- 2.5.3. 질병을 전염할 가능성이 있는 동물 폐사체 또는 오물을 제조업소 내에서 소각 처분하여야 한다.

3. 분병과 용기

3.1. 분주실

- 3.1.1. 분병은 분주실에서 하여야 한다.
- 3.1.2. 분주실에는 원액에서 최종 용기로 제제의 일정량을 분주하기 위하여 특별한 설치가 되어 있는 무균실이 있어야 한다.
- 3.1.3. 무균 조작은 제제가 충전과정에서 오염되지 않도록 하여야 한다.

3.2. 분병과정

분병 조작은 제제가 충전과정에 오염이나 변질하지 않도록 적당한 방법으로 하여야 하며 생균 또는 생바이러스를 취급하는 장소와 완전히 격리된 장소에서 작업하여야 한다.

3.3. 용기

- 3.3.1. 제제의 최종용기는 제품의 성상의 유지에 적합한 것이어야 하며, 그 용기는 생물학적제제가 변종 또는 부패하거나 발효 및 품질이 저하되지 않아야 한다. 백신 용기는 대한약전에 규정된 주사제용 용기이어야 한다.
- 3.3.2. 최종 용기는 분병 후 곧 밀봉하여야 한다. 마개는 제제에 유해한 영향을 주지 않는 물질이어야 하며 제제의 사용기간 동안 공기가 통하지 않도록 하여야 한다.

3.4. 분병량

제제를 최종 용기에 분병할 때에는 표시량의 4% 이상의 과량을 넣어야 한다.

4. 시험

생균, 생바이러스를 사용하는 제제의 시험은 생산에 사용되는 장소와 격리된 장소에서 하여야 한다.

5. 기록

5.1. 제조 기록서

- 5.1.1. 제조 기록서에는 원료 관리사항, 제조 관리사항, 포장 관리사항, 제조공정도, 포장공정도, 작업소의 출입제한 및 작업원의 위생관리 사항, 시설 및 기구관리에 관한 사항, 제품의 입, 출고 보관방법에 관한 사항의 모든 단계가 명백하

게 기록되어 있어야 한다.

5.1.2 검체 발취량, 채취장소, 채취방법 및 각 제제별 품질관리 검사기준에 의한 시험성적에 관한 사항이 기록되어 있어야 한다.

5.1.3 제조 기록서에는 그 결과에 관계없이 모든 결과가 기록되어 있어야 한다.

5.2. 기타 기록

기록서에는 제조업소에 보관 사용되어 있는 모든 종균의 완전한 경력(경과 과정)이 기록되어 있어야 한다.

6. 검사품

각 제조번호 마다의 검사품은 검사에 필요한 충분한 양을 취하여야 한다.

7. 용기 및 포장의 표시

모든 제제는 용기 및 포장에 명백한 기재표시가 되어 있어야 한다.

7.1. 용기의 표시

용기에는 동물용의약품등취급규칙 제37조에 규정된 사항 및 다음 사항을 기재 표시하여야 한다.

- (1) 제제의 명칭
- (2) 용량
- (3) 제조업자
- (4) 제조번호와 제조년월일
- (5) 유효기간 및 저장방법
- (6) 사용량 및 사용법
- (7) 함유하는 병원체의 생사 구별
- (8) 생물학적제제의 성상에 관한 특징
- (9) 방부제 등 생물학적제제의 본래의 성분외의 것을 함유한 때는 그 성분의 품명 및 분량
- (10) 첨가된 물질명과 그 농도
- (11) 기타 사용상 필요한 주의 사항

7.1.1. 용기의 포장표시

용기가 포장되지 않을 때에는 포장에 표시하여야 할 사항을 표시하여야 한다.

7.1.2. 소용기의 표시

소용기로 위의 전 사항을 표시하지 못할 때는 적어도 다음 사항을 기재하여야 하며 이에 사용되는 용기는 포장되어야 하고 포장에는 포장에 표시할 사항이 기재되어야 한다.

- (1)제제의 명칭
- (2)제조번호
- (3)유효기간

7.1.3. 무표시 용기

용기에 아무런 표시를 할 수 없을 때는 용기는 포장하여 하고 포장에 표시할 사항을 기재하여야 한다.

7.2. 포장의 표시

포장의 표시는 용기의 표시 규정에 따른다.

7.3. 설명서

설명서에는 다음 사항을 기재하여야 한다.

- (1) 제법의 개요
- (2) 사용법 및 사용량
- (3) 금기
- (4) 부작용과 그 외의 주의사항
- (5) 저장방법

8. 운송

제제는 사용장소에 도착할 때까지 그 역가가 유지되도록 취급하여야 한다.

9. 저장과 유효기간

저장방법과 유효기간은 통칙 및 각 제제의 규정에 따른다.

10. 용제의 첨부

건조제제의 용제는 첨부된 용제를 사용한다. 그러하지 아니할 때는 사용 용제에 대한 별도 지시에 따른다.

Ⅱ. 통 칙

여 백

II. 통칙

1. 이 기준은 동물용 생물학적제제 기준 및 시험방법(이하 “제제기준”이라 한다)에 대하여 그 정의, 제조, 성상, 품질, 저장법 등에 관한 기준을 정한 것이다.
2. 동물용 생물학적제제의 적부는 통칙, 제제의 각조, 일반 시험법 및 국가검정 동물용의약품 검정기준의 규정에 따라 판정한다.
3. 동물용 생물학적제제 각조의 제제명은 한글과 영자로 표기하며 제제별 좌우측 상단에 분류번호를 표기한다.
4. 영자는 첫 번째 사용시 한글표기 다음 괄호속에 영자 전 단어 및 약자를 제시하고 두 번째 사용시는 영자 또는 약자만 표기한다.
5. 사용 병원체명, 세포주, 배지, 약품, 시약명, 고유명사, 화학물질명(또는 분자식), 단위 등과 적절한 외래어가 없는 특수전문 용어 등은 영자로 표기한다.
6. 숫자는 아라비아 숫자로 사용하며 모든 계량단위는 국제표준단위를 사용함을 원칙으로 한다.

〈 보 기 〉

주된 계량의 단위에 대하여는 다음의 기호를 쓴다.

센티미터	cm	킬로그램	kg
밀리미터	mm	그램	g
마이크로미터	μm	밀리그램	mg
나노미터	nm	마이크로그램	μg
평방센티미터	cm^2	나노그램	ng
몰	mol	피코그램	pg
밀리리터	ml	중력가속도	g
수은주밀리미터	mmHg	카이자	cm^{-1}

7. 질량백분율은 %, 질량 대 용량 백분율은 w/v%, 용량백분율은 vol%, 그리고 용량대 질량백분율은 v/w%를 쓴다.
8. 온도의 표시는 셀시우스씨법에 따라 아라비아숫자의 오른쪽에 “℃”를 붙인다.
9. 용매명을 표시하지 않은 용액은 수용액을 말한다.
10. 건조제제는 따로 규정이 없는 한 적당한 용제(“부유용액”을 포함)를 첨부해야한다. 또한 정의의 항에서 단순히 “용제를 가한다”라고 기재 하였을때는 첨부된 용제를 사용하여 그 동물용 생물학적제제의 용기 등에 직접 기재된 방법에 의한 것으로 한다.
11. 제조에 사용되는 의약품은 대한약전에 수재 되어 있는 것은 그 규격에 적합한 것을 사용하여야 하며 따로 규정이 없는 경우에는 목적에 적합한 규격의 것을 사용한다.
12. 동물용생물학적제제에 있어서 “적당한 것을 사용할 수 있다” 등으로 된 불활화제(不活化劑) 및 보존제 등은 그 동물용생물학적제제의 일반적인 사용량에 있어서 안전하고 또한 약효를 저해(沮害)하거나 시험에 지장을 일으키는 것은 아니된다.
13. “최종원액”이란 한 용기내에서 조제되어 바로 분주할 수 있는 상태로서 그 내용의 어느 부분을 취하여도 정상 및 품질에 있어서 균일하다고 인정되는 것을 말한다. 다만, 그 균일한 상태를 유지하기 위해 교반조작을 실시하는 것을 허용한다.
14. 제조번호란 통상 동일한 최종원액에서 유래하는 최종제품의 한군을 말한다.
15. 동일한 최종원액에서 유래하는 제품군에 대해서는 통상 하나의 제조번호를 붙인다. 다만 동일한 최종원액에서 미생물의 오염의 기회가 동일하다고 보지 않는 조작에 의하여 분주 밀봉된 최종 제품군 또는 동일한 조건이라고 볼 수 없는 건조 조

작에 의하여 건조된 최종제품군에 있어서는 동일한 제조번호에 분주 구분마다의 기호를 부기한다.

16. 동일한 최종원액으로부터 연속적 조작에 의하여 분주된 경우라도 분주량을 달리하는 최종제품군은 15항에 따른다.
17. 동물용 생물학적제제의 정의항에 있어서 백색이라고 기재한 것은 백색 또는 거의 백색이며 무색이라고 기재한 것은 무색 또는 거의 무색을 나타내는 것이다. 색조를 시험할 때는 따로 규정이 없는 한 최종제품의 용기를 직접 백색의 배경을 사용하여 관찰한다. 투명성을 시험할 때는 따로 규정이 없는 한 최종제품의 용기를 직접 백색과 흑색의 배경을 사용하여 관찰한다.
18. 동물용 생물학적제제 각조의 규정 중 검정은 통상 동일 제조번호마다 실시한다. 다만, 함습도시험, 무균시험, 기타 특별히 규정하는 시험은 분주 구분마다 실시한다.
19. 용제가 첨부되어 있는 동물용 생물학적제제 각조의 시험은 함습도 및 따로 규정한 것을 제외하고 그 용제를 사용하여 용기 등에 기재된 방법에 따라 용액 또는 부유액으로 한 것에 대하여 실시한다. 또한 동결 보존되어 있는 각조 동물용 생물학적제제의 시험은 적당한 온도에서 용해시켜 액상으로 된 것에 대하여 실시한다.
20. “불활화시험”이란 그 동물용 생물학적제제의 제조과정 중에 존재한 특성의 독성 성분이 규정에 표시된 정도 이하로 그 독성이 소실되어있는 것을 판정하는 시험이다.
“……부정시험”이란 그 동물용 생물학적제제 중에……에 표시한 물질 및 미생물 등이 규정에 표시된 정도로는 존재하지 않는다는 것을 판정하는 시험이다.
“특성시험”이란 그 동물용 생물학적제제의 내용물의 성상, 성분, 냄새, 색깔 등이 규정에 표시한 정도 이상으로는 변화하지 않는다는 것을 판정하는 시험

이다.

“동정시험”이란 그 동물용 생물학적제제에 표시된 동물용 생물학적제제라는 것을 판정하는 시험으로서 통상 용기의 표시 등에 표시사항의 기재 표시 후에 실시하는 것이다.

21. 시험은 따로 규정이 없는 한 상온에서 실시한다. 상온이란 15 - 25℃를 말한다.
22. 시험을 실시할 때는 따로 규정이 없는 한 동물용 생물학적제제 각조의 부기에 수록된 시약, 시액, 완충액 및 배지를 사용한다. 시험에 있어서 단순히 물이라고 기재된 것은 대한약전에서 규정한 정제수를 말한다.
23. 중량을 “정확히 단다”라 함은 규정된 수치의 중량을 그 자리수까지 단다는 것을 뜻한다. 용량을 “정확히 취한다”라 함은 용량을 전량피펫, 메스플라스크 또는 뷰렛을 써서 취한다는 것을 뜻한다.
중량을 “정밀하게 단다”라 함은 달아야할 최소단위를 고려하여 0.1mg, 0.01mg 또는 0.001mg까지 단다는 것을 뜻한다.
24. 검체의 채취량 등에서 “약”이라고 한 것은 그 규정치의 $\pm 10\%$ 의 범위의 값을 말한다.
25. 검액의 접종량 등에서 수치를 단순히 기재한 것은 통상 그 규정치의 $\pm 5\%$ 범위의 값을 말한다.
26. 일반시험법중 이화학시험에 있어서 규정된 값(이하 “규격치”라 한다)과 시험에 의하여 얻은 값(이하 “실험치”라 한다)과의 비교에 의하여 적부의 판정을 실시할 때에는 실험치는 규격치보다 한자리 더 계산하고 끝숫자를 반올림하여 규격치와 비교한다.
27. 시험에 사용하는 모든 동물(실험동물 및 목적동물)은 건강한 것으로 한다. 시험에 사용하는 동물시험에서 “사고사”라함은 당해 시험과 상관없이 시험동물이 폐사한 것을 의미하며 시험에 의하여 동물이 예측하지 못한 이상을 나타낼 때는 그

것이 동물용 생물학적제제에 의한 것이 아니라는 것이 분명하게 되지 않을 때는 이 시험에 부적합한 것으로 한다.

28. 동물용 생물학적제제 각조에 따른 규정이 없는 것은 동물용 생물학적제제 총칙 및 통칙에 따른다.
29. 동물용 생물학적제제 각조에 있어서 “최종원액”항에 페놀 또는 치메로살을 가하도록 규정된 것 외에 적당한 보존제를 넣을 수 있다.
다만, 적당한 보존제를 사용하였을 때는 따로 정하는 기준 및 시험법에 따라 판정한다.
30. 이 기준에 규정하는 시험방법에 대신하는 방법으로서 그것이 규정하는 방법 이상의 정확도와 정밀도가 있을 때는 그 방법을 쓸 수 있다. 다만, 그 결과에 대하여 의심이 있을 때에는 규정하는 방법으로 최종의 판정을 실시한다.
31. 저장은 별도로 규정한 경우를 제외하고 2~8℃로 한다. 다만, 액제의 경우는 동결을 피하여 보관하는 것으로 한다.
32. 제조년월일은 최종원액의 분병일(동결건조 제품의 경우 동결건조 종료일)로 한다.
33. 최종 유효년월일은 따로 규정한 경우를 제외하고는 제조년월일로부터 산정한다.
34. 이 제제 기준에 부록을 둔다.

여 백

Ⅲ. 동물용 생물학적제제 각조

여 백

Ⅲ. 동물용생물학적제제 각조

1. 백신

● 1-1 소	27
1-1-1-01 탄저 (아포) 생백신	29
1-1-1-02 기종저 생백신	33
1-1-1-03 탄저 (스턴), 기종저 생 혼합백신	37
1-1-1-04 송아지 대장균 필러스 정제백신	42
1-1-2-01 우역 생백신	48
1-1-2-02 소 아까바네병 생백신	53
1-1-2-03 소 유행열 생백신	59
1-1-2-04 소 로타바이러스, 코로나바이러스 생 혼합백신	65
1-1-2-05 소 전염성비기관염, 바이러스성설사, 파라인플루엔자 불활화 혼합백신	71
1-1-2-06 소 아까바네병 불활화백신	77
1-1-2-07 소 유행열 불활화백신	82
1-1-3-01 소 타일레리아(범안열원충) 생백신	88
● 1-2 돼지	97
1-2-1-01 돼지 단독 생백신	99
1-2-1-02 돼지 위축성비염 불활화백신	104
1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라 폐렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합백신	108
1-2-1-04 돼지 위축성비염, 파스튜렐라 폐렴, 흉막폐렴 불활화 혼합백신	119
1-2-1-05 돼지 대장균 불활화백신	125
1-2-1-06 돼지 대장균 필러스, 클로스트리듐 독소이드 불활화 혼합백신	129
1-2-1-07 돼지 마이코플라스마 폐렴 불활화백신	136
1-2-1-08 돼지 위축성비염, 파스튜렐라 폐렴, 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신	145
1-2-1-09 돼지 위축성비염, 위축성비염 독소이드, 파스튜렐라폐렴, 파스튜렐라독소이드 불활화 혼합백신	151
1-2-1-10 돼지 위축성비염, 위축성비염 독소이드, 파스튜렐라 폐렴, 헤모필루스 폐렴, 마이코플라스마 폐렴 불활화 혼합백신	156
1-2-1-11 돼지 파스튜렐라 폐렴, 흉막 폐렴 불활화 혼합백신	168

1-2-2-01 돼지 콜레라(열병) 생백신	173
1-2-2-02 돼지 콜레라(열병) 이·엔·디(END) 음성 생백신	181
1-2-2-03 돼지 전염성위장염 생백신	188
1-2-2-04 돼지 전염성위장염, 로타바이러스 생 혼합백신	193
1-2-2-05 돼지 일본뇌염 생백신	201
1-2-2-06 돼지 유행성설사 생백신	206
1-2-2-07 돼지 파보바이러스 불활화백신	213
1-2-2-08 돼지 뇌심근염 불활화백신	218
1-2-2-09 돼지 파보바이러스 유전자재조합 불활화백신	224
1-2-2-10 돼지 엔테로 바이러스 불활화백신	229
1-2-2-11 돼지 오제스키병 불활화백신	235
1-2-2-12 돼지 콜레라(열병), 돼지단독 생 복합백신	241
1-2-2-13 돼지 유행성 설사, 돼지 전염성 위장염 불활화 혼합백신	247

● 1-3 닭	255
1-3-1-01 닭 마이코플라스마병 불활화 유성백신	257
1-3-1-02 가금 티푸스 불활화백신	262
1-3-1-03 가금 티푸스 불활화 유성백신	268
1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신	274
1-3-2-02 닭 전염성기관지염 생백신	279
1-3-2-03 닭 전염성후두기관염 생백신	284
1-3-2-04 닭 전염성에프(F)낭병 생백신	289
1-3-2-05 마력병 생동결백신	294
1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신	298
1-3-2-07 계두 생백신	303
1-3-2-08 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염 생 혼합백신	309
1-3-2-09 닭 뇌척수염, 계두 생혼합백신	314
1-3-2-10 뉴캐슬병 불활화백신	320
1-3-2-11 뉴캐슬병 불활화 유성백신	323
1-3-2-12 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염, 산란저하증 불활화 혼합 유성백신	326

1-3-2-13 뉴캐슬병, 산란저하증, 전염성에프(F)낭병, 닭 레오바이러스 불활화 혼합 유성백신	334
---	-----

● 1-4 개 343

1-4-1-01 개 렘토스피라 불활화백신	345
1-4-1-02 개 보데텔라 브론키셉티카 생백신	351
1-4-1-03 개 보데텔라 브론키셉티카 균체, 독소이드 불활화 혼합백신	355
1-4-2-01 광견병 생백신	360
1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신	365
1-4-2-03 개 파보바이러스, 코로나바이러스 생 혼합백신	370
1-4-2-04 개 파보바이러스 불활화백신	378
1-4-2-05 개 코로나바이러스 불활화백신	383
1-4-2-06 개 파보바이러스, 코로나바이러스 불활화 혼합백신	388
1-4-2-07 개 디스토퍼, 전염성간염, 파보바이러스, 파라인플루엔자(생), 코로나바이러스 불활화 혼합백신	397
1-4-4-08 개 디스토퍼, 전염성간염, 파보바이러스, 파라인플루엔자(생), 렘토스피라 불활화 복합백신	411
1-4-4-09 개 디스토퍼, 전염성간염, 파라인플루엔자(생), 파보바이러스, 렘토스피라 불활화 복합백신	426

● 1-6 토끼 443

1-6-2-01 토끼 바이러스성 출혈병 불활화백신	445
-----------------------------------	-----

● 1-7 오리 451

1-7-2-01 오리 바이러스성간염 생백신	453
-------------------------------	-----

2. 진단제제

● 2-1 소 459

2-1-1-01 소 결핵 피·피·디(PPD)진단액	461
2-1-1-02 요네병 피·피·다(PPD)진단액	471

2-1-1-03	요네병 항체검사(ELISA)용 항원	482
2-1-1-04	요네병 보체결합반응 검사용 항원	491
2-1-1-05	소 브루셀라병 평판응집반응 검사용 항원	503
2-1-1-06	소 브루셀라병 시험관 혈청응집반응 검사용 항원	509
2-1-1-07	소 브루셀라병 우유유회환 검사용 항원	515
2-1-1-08	소 브루셀라병 로즈벵갈 검사용 항원	522
2-1-1-09	소 브루셀라병 보체결합반응 검사용 항원	527
2-1-1-10	우폐역 보체결합반응 검사용 항원	538
2-1-1-11	탄저 가열 침강반응 검사용 항혈청	545
2-1-1-12	렙토스피라 현미경 응집반응 검사용 항원	550
2-1-1-13	소 캄필로박터 시험관 응집반응 검사용 항원	554
2-1-2-01	소 백혈병 한천젤 면역확산반응 검사용 항원	558
2-1-3-01	소 간질 진단액	563
2-1-3-02	소 바베시아 간접형광항체 검사용 항원	567
2-1-3-03	소 네오스포라 간접형광항체 검사용 항원	572
2-1-3-04	소 네오스포라 항체검사(ELISA) 키트	580
● 2-2 돼지	587
2-2-1-01	돼지 위축성비염 마이크로플레이트 혈청응집반응 검사용 항원	589
2-2-1-02	돼지 마이코플라스마페럼 항체검사(ELISA)용 항원	593
2-2-1-03	돼지 파스튜렐라페럼 항체검사(ELISA)용 항원	601
2-2-1-04	돼지 흉막페럼 항체검사(ELISA)용 항원	608
2-2-1-05	돼지 단독 시험관 발육응집반응 검사용 항원	615
2-2-2-01	돼지 콜레라(열병) 바이러스검사용 단클론성 항체	620
2-2-2-02	돼지 일본뇌염 혈구응집억제반응 검사용 항원	625
2-2-2-03	돼지 오제스키병 항체검사(RIDEA) 키트	633
2-2-2-04	돼지 파보바이러스 혈구응집억제반응 검사용 항원	640
2-2-2-05	돼지 생식기호흡기증후군바이러스 간접형광항체 검사용 항원	645
2-2-2-06	돼지 콜레라(열병) 항체검사(ELISA) 키트	651

2-2-2-07 돼지 유행성설사바이러스 검사용 단클론성 항체	659
2-2-2-08 돼지 뇌심근염 혈구응집억제반응 검사용 항원	664
2-2-2-09 돼지 전염성위장염바이러스 검사용 단클론성 항체	671
2-2-2-10 돼지 로타바이러스 검사용 단클론성 항체	676
2-2-2-11 돼지 생식기호흡기증후군바이러스 검사용 단클론성 항체	681
2-2-2-12 돼지 호흡기코로나바이러스 검사용 단클론성 항체	686
2-2-2-13 돼지 인플루엔자바이러스 검사용 단클론성 항체	691
2-2-3-01 독소플라스마 간접형광항체 검사용 항원	696
2-2-3-02 독소플라스마 항체검사(LATEX) 키트	702
2-2-3-03 돼지 선모충 항체검사(ELISA) 키트	708
● 2-3 닭	715
2-3-1-01 추백리 급속전혈(혈청)응집반응 검사용 항원	717
2-3-1-02 추백리 시험관 혈청응집반응 검사용 항원	722
2-3-1-03 닭 마이코플라스마 갈리셉티쿰 급속혈청응집반응 항원	727
2-3-1-04 닭 마이코플라스마 갈리셉티쿰 혈구응집억제반응 검사용 항원	732
2-3-1-05 닭 마이코플라스마 시노비에 급속혈청응집반응 검사용 항원	738
2-3-1-06 닭 마이코플라스마 시노비에 혈구응집억제반응 검사용 항원	743
2-3-2-01 뉴캐슬병 혈구응집억제반응 검사용 항원	749
2-3-2-02 닭 전염성기관지염 혈구응집억제반응 검사용 항원	755
2-3-2-03 전염성에프(F)낭병 한천겔 면역확산반응 검사용 항원	761
2-3-2-04 산란저하증 혈구응집억제반응 검사용 항원	766
2-3-2-05 조류인플루엔자 혈구응집억제반응 검사용 항원	771
2-3-2-06 조류인플루엔자 한천겔 면역확산반응 검사용 항원	776
● 2-4 개	781
2-4-2-01 광견병바이러스 검사용 단클론성 항체	783

여 백

1. 백 신

여 백

1-1 소

여 백

탄저 생백신

Anthrax Spore Vaccine, Live

1. 정의

탄저균 제2묘의 아포를 배양하여 페놀(phenol)이 첨가된 글리세린(glycerin) 식염수액에 부유시켜 만든 백신이며 탄저의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

탄저균 제2묘(육균)주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 2년 간격으로 보통한천 배지에 배양, 계대하며 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

그람(gram) 양성의 간균이고 운동성이 없다.

마우스(15g), 기니픽(250~300g), 토끼(2kg), 산양(25~30kg)의 피하에 0.2ml 씩 접종(산양은 피내주사)하였을 때 마우스는 100%, 기니픽은 50% 이상 폐사하고 토끼, 산양은 전부 내과생존 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

탄저균 배양배지로 특수 아포한천배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

한천평판상의 한 개 집락을 선정하여 보통한천배지 사면에 이식하여 37℃에서 24~48시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

종균배양을 한 균을 특수 아포한천 배지에 이식하여 37℃에서 7~10일간 배양한다.

3.2.3. 집균

잡균의 혼입 유무와 아포형성도를 확인한 후 배양병내의 응고수를 제거하고

1-1-1-01

20ml의 보존액(부기2)과 멸균 초자구를 가하여 집균한다. 집균된 원액의 한천편과 이물을 제거하기 위하여 멸균가제를 놓은 100목 동망에서 여과한다. 다음, 균액을 30분간 진탕하여 균질액으로 만든다. 이것을 60℃ 항온수조에서 60분간 중탕하여 균의 성장체를 죽여 0~5℃의 냉장고에 3개월 동안 정치한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 아포수시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

원액을 뉴트리엔트 브로스(nutrient broth)로 10^{-6} ~ 10^{-8} 까지 희석하여 희석배수별 1ml씩 각각 3개의 한천평판배지에 접종하여 37℃에서 48시간 배양한다.

3.3.2.2. 판정

평균 아포수가 500만±50만개/ml이어야 한다.

3.4. 최종원액

원액을 10배 단계 희석법으로 10^{-6} ~ 10^{-8} 까지 희석하여 3회 이상 아포수를 계산하고 아포수를 500만±50만/ml 되도록 보존액(부기2)으로 조정한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 규칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 거의 투명한 액체로서 정치하면 약간의 침전이 인정되나 흔들면 쉽게 균등액이 되며, 이물 또는 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 석탄산 함유량 0.1% 이하 이어야 한다.

4.4. 아포수 시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

건강한 15~16g 의 마우스 10마리, 280~300g의 기니픽 10마리 및 2kg이상의 토끼 5마리의 복부피하에 검사품 0.5ml씩을 접종하고, 25kg의 산양 3마리의 배부피내에 각각 1ml씩 접종하여 10일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

마우스는 100%, 기니픽 50%이상 이 폐사(백신접종에 기인하는 탄저패혈증) 하여야 한다. 토끼 및 산양은 모두 생존해야 하며 체온의 동요 또는 원기 쇠약은 5일 이내에 소진 되어야 하며, 주사국소의 종장은 토끼는 5일, 산양은 7일 이내 소실되어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

경측부 또는 배측의 피내에 주사한다.

건강한 동물에만 주사하고 주사 후 3~4일간은 휴식 시켜야한다.

1-1-1-01

<부 기>

부기1. 특수 아포한천 배지

Beef infusion 1,000ml
Sodium chloride(NaCl) 3g
Agar 30~40g
pH 6.8로 조정하여 고압멸균한다.

부기2. 보존액

Glycerin 30ml
Phenol 0.1ml
Sodium chloride(NaCl) 0.85g
D.W 70ml
고압멸균한다.

기종저 생백신

Blackleg Vaccine, Live

1. 정의

기종저 제2묘균의 배양액에 10%의 비올로 톨루엔(toluene)을 가하여 만든 백신이며 기종저 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

기종저균 제2묘주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 간편가간(肝片加肝) 브로스(liver-broth)를 사용하여 1년 간격으로 계대 하며 균주는 4℃전후의 냉장소에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

그램(gram)양성의 큰 간균이며, 주립편모가 있고, 운동성이있는 아포형성균이다. 건강한 기니픽(400~500g)에 liver-broth에서 48시간 배양한 균부유액 2ml를 피하 접종 하였을 때 내과생존한다. 마우스에 병원성이 없다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Liver-broth(부기1)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

시험관의 liver-broth에 24~48시간 배양하여 증식이 양호한 기종저균 배양액을 종균으로 사용한다.

3.2.2. 본배양

약 3,000~6,000ml의 liver-broth를 넣은 후 경질의 배양병에 원배양균 10~20 ml을 이식하여 37℃에서 48~96시간 배양한다.

3.2.3. 집균 농도조절

48~96시간 배양 후 순수도를 확인하고 실온에서 5~10 시간 정치한 후

1-1-1-02

100메쉬 동망과 4중의 가제로 여과하여 집균한다.

3.3 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 아포수시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

아포수 계산은 검사품을 nutrient broth로 10배 단계 희석하여 일반 혐기성 세균 검사법(액체배지정량시험)에 따라 세균수를 측정한다.

3.3.2.2. 판정

아포수는 200만개/ml 이상 이어야 한다.

3.4. 최종원액

원액을 nutrient broth를 10배 단계 희석하여 혐기성 세균검사법에 의거 기종저균의 아포수가 2×10^6 개/ml이상이 되도록 농도를 조절한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 10%의 비율로 Toluene을 가한 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 갈색의 혼탁한 부유액이며 정치하면 회갈색의 침전물이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 기종저배양액과 Toluene에 의한 특수한 냄새를 가지며 소분된 내용의 성상이 균일하고 이물이나 굵은 입자가 없어야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 toluene의 함유량은 8~10%이어야 한다.

4.4. 아포수시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 300~350g의 건강한 기니픽 6마리와 체중 100~120kg의 어린소 2마리를 선정하여 기니픽에는 검사품 2ml, 어린소에는 5ml씩을 피하에 접종하고 각각 14일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

관찰기간중 임상소견에 이상이 없고 부검결과 기종저의 육안적 병변이 없어야 한다. 단 검사품의 접종과 관계없는 사고가 생겼을 때는 이를 제외하고 판정한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

견부피하에 소는 1.0ml, 양은 0.5ml 주사한다.

<부 기>

부기1. 간편가간(肝片加肝) 브로스(liver-broth : a piece of liver in broth)

Liver infusion	500ml
Beef infusion	500ml
Peptone	10g
Sodium chloride	5g
Dextrose	5g
L-Cystine	0.5g

상기액을 잘 용해하여 pH 8.4로 수정하고 100℃ 30분간 가열하여 여과한다.

이 여액에 자불한 간편을 수세하여 약 1cm³의 크기로 세절하여 이를 적당량 가하여 고압멸균한다.

멸균 후 pH는 7.0~7.2가 된다.

탄저, 기종저 생 혼합백신

Anthrax, Blackleg Combined Vaccine, Live

1. 정의

탄저약독균과 기종저약독균의 각각 배양액을 혼합하고 톨루엔(toluene)을 가하여 만든 백신이며 탄저와 기종저의 동시 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

탄저균인 south Africa Sterne 34 F₂주와 기종저균 제2묘주 또는 국립수의과학 검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Sterne 34 F₂주는 nutrient broth에 계대하여 동결건조 하여 4℃이하에 보존하며, 기종저균 제2묘주는 간편가간 브로스(liver-broth)(부기3)에 연1회 계하며 4℃전후의 냉장고에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

Sterne 34 F₂주는 협막을 형성하지 않으며, 마우스와 기니픽에 병원성이 없다. 기종저균 제2묘주는 그람(gram)양성의 대간균이며 주립편모가 있고 운동성이 있는 아포형성균이다. liver-broth에 48시간 배양한 기종저 제2묘균 부유액을 기니픽(400~500g)에 2.0ml를, 마우스에 0.2ml를 피하 주사하였을 때 내과하며, 병원성이 없다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Sterne 34 F₂주는 특수 아포 형성 한천(special spore forming agar)배지(부기1)를 사용하고, 기종저균 제2묘주는 liver-broth 배지(부기3)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

Sterne 34 F₂주는 동결건조 종균을 뉴트리엔트 브로스(nutrient broth)에 이식하여 37℃에서 48시간 배양한 것을 사용한다. 기종저균 제 2묘주는 시험관내의 liver-broth 이식하여 37℃에서 24~48 시간 배양한 것을 사용한다.

1-1-1-03

3.2.2. 본배양

Sterne 34 F₂주는 배양된 종균을특수 아포 형성한천배지(부기1)에 이식하고 37℃부란기내에서 4~5일간 배양한다. 기종저균 제2묘주는 3,000~6,000ml의 liver-broth를 넣은 경질의 배양병에 종균배양액 10~20 ml를 이식하고 37℃에서 48~96 시간 배양한다.

3.2.3. 집균

3.2.3.1. 탄저균

탄저균 Sterne 34 F₂ 주는 본배양된 균을 채집하여 100메쉬(mesh)의 동망과 가제로서 여과하여 한천편과 이물을 제거하고 균괴의 세분과 균질화를 위해 초자구 병에서 30분간 진탕한다. 진탕한 균액을 60℃에서 1시간 가열하여 균의 성장체를 죽이고 0~5℃의 냉암소에 3개월간 정치한다.

3.2.3.2. 기종저균

기종저균 제2묘주는 5~10 일간 냉암소에 정치한 후 100메쉬(mesh)동망과 4중의 가제로 여과하여 집균한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 아포수시험

3.3.2.1. 탄저균

3.3.2.1.1. 재료 및 시험

검사품을 동량씩 혼합한 것을 nutrient broth로 10배 단계 희석한 후 nutrient agar를 사용하여 평판법으로 균수를 측정한다.

3.3.2.1.2. 판정

검사품 규정량 중의 평균 아포수가 1×10^7 CFU이어야 한다. 단, 평균 아포수가 $0.8 \times 10^7 \sim 0.2 \times 10^7$ CFU 범위에 있을 때는 아포수 시험 기준에 적합한 것으로 한다.

3.3.2.2. 기종저균

기종저 생 백신(1-1-1-02)의 3.3.2에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 탄저균

균원액을 10배 단계 희석법으로 희석하여 아포수를 계산하여 아포수가 1,000만개/ml 되도록 보존액(preservation solution)(부기2)으로 농도를 조정한다.

3.4.2. 기중저균

기중저 균의 아포수는 2×10^6 개/ml 이상이 되도록 농도를 조정한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제의 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 갈색의 혼탁한 부유액이며, 정치하면 갈회색의 침전물이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 용기별 내용물의 성상이 균일하고, 이물이나 굵은 입자가 없어야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제의 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 생아포수검사

3.3.2에 의한 검사방법에 따른다.

4.4. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 toluene의 함유량은 3~5%이어야 한다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 500g~600g의 건강한 기니픽 10마리와 체중100~120kg의 건강한 어린소 2마리 및 체중 25~30kg의 건강한 산양 3마리를 선정하여 검사품을 기니픽에는 1ml, 산양에는 2ml, 어린 소에는 6ml씩 각각의 피하에 접종한 후 14~21일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

기니픽은 80%이상이 생존하여야 하며, 산양과 어린소는 지두대의 종장과 체온의 동요가 있으나 7일내에 쇠퇴하고 이상없이 생존하여야 한다. 단, 검사품 접종과 관계없는 사고가 있을 때는 이를 제외하고 판정한다.

1-1-1-03

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

견부 피하에 주사하며, 소는 2.0ml, 양은 1.0ml씩을 주사한다.

<부 기>

부기1. 탄저균 배양 배지(special spore forming agar media)

N-Z Caseine	50g
Yeast extract, (Difco)	25g
Dipotassium phosphate	20g
Mono potassium phosphate	5g
Sodium sulfate	1.5g
Regent agar	150g
* Trace element solution	5ml
D.W	5,000ml

pH 7.2 조정하고 고압멸균한다.

* Trace element solution

MgSO ₄ solution	5g/100ml
MnSO ₄ solution	3g/100ml
CaCl ₂ solution	5g/50ml
FeSO ₄ solution	1g/100ml

pH 7.0~7.2

부기2. 보존액(preservation solution)

D.W	2,500ml
NaCl	25g
Saponin	0.5g
Glycerin	2,500ml

15Lbs 2시간 멸균한다.

부기3. 간편가간(肝片加肝) 브로스 (liver-broth : a piece of liver in broth)

기중저생균백신 부기1과 동일하다.

송아지 대장균 필리스 백신

Calves Escherchia coli Pilus Vaccine (Oil)

1. 정의

대장균의 pilus를 분리 정제하여 유성 보존제(oil adjuvant)와 혼합하여 만든 백신이며 송아지 대장균 설사증 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Pilus(K₉₉, F₄₁)를 갖고 있는 VRI-92주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

MacConkey agar 평판배지에서 전형적인 대장균 집락을 선택하여 tryptic soy broth(TSB)배지에 18~24시간 계대배양하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

그람음성의 간균이며 포도당, 유당, 맥아당을 분해해서 산과 가스를 낸다. 인돌(Indol)시험 양성, 보게스 프로스카우어(Voges-Proskauer, VP)반응 음성, 메틸레드(methyl red, MR)반응 양성, 구연산 이용시험(citrate utilization test)음성이다. 송아지 설사에 관여하는 대장균은 장관 섬모부착인자(K₉₉, F₄₁등)를 가지며 내열성 장독소(enterotoxin, ST)를 산생한다. 신생 송아지에 호발하며 심한 설사, 폐사 또는 발육장애의 원인이 된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

MacConkey agar 및 Minca medium(부기1)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 균주를 MacConkey agar배지에 이식하여 특징적인 성상을 확인하고 혈액한천 평판상의 순수집락을 선정하여 TSB에 접종하여 37℃에서 36~48시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

제조용 Minca medium을 룩스병(1,000ml) 1개당 200ml씩 분병한 후 121℃에서 30분간 고압멸균한 각 병에 종균 배양액을 5ml씩 이식하여 37℃에서 36~48시간 배양한다.

3.2.3. 집균

배양병에 멸균 생리식염수와 멸균 초자구를 넣고 흔들어 집균한 다음 동망과 가제를 이용하여 한천편을 제거하고 잡균 혼입 여부와 mannose-resistant hemagglutination(MRHA)시험(부기2)으로 pilus 생성유무를 확인하고 5℃에서 원심분리(17,000×g, 20분)하여 상층액은 버리고 침전된 균을 집균한다.

3.2.4. 필루스 분리 및 정제

침전 집균된 균체를 본 배양 용량의 1/10의 PBS(pH 7.5)에 부유시켜 60℃에서 20분간 열처리하여 균체로부터 pilus를 분리시키고 이를 5℃에서 원심분리(17,000×g, 20분)하여 상층액으로부터 pilus를 수집한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

최종 조정된 항원액을 선택 배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 세균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

정제된 pilus K₉₉는 말혈구, F₄₁은 기니픽 혈구를 사용하여 MRHA 시험을 실시한다. MRHA가 각각 256배/50μl 이상 되도록 PBS로 희석하여 농도를 조정한다.

3.4.2. 항원혼합

조정된 항원량과 유성보존제 양을 2:3의 비율로 하여 잘 흔들어 혼합한 후 merthiolate(1:10,000)를 가하여 균질화한다.

1-1-1-04

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

백색의 유탁액으로 장기간 정치하여도 분리층이 형성되지 않아야 하며, 이물·이취가 없고 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량이 0.2%이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

건강하고 병원성 대장균에 감수성이 있는 체중 300~400g의 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 2마리는 1ml를 근육에, 2마리는 1ml를 피하에, 2마리는 0.1ml 씩 피내에 접종한 후 7일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 기니픽은 주사반응을 나타냄없이 시험이 끝날때까지 건강하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 300~400g의 건강한 기니픽 15마리를 선정하여 사용한다. 기니픽 10마리에 검사품 규정량의 1/4를 3주 간격으로 2회 근육내에 접종하고 5마리는 대조로 한다. 2차 접종 14일 후 대조군과 함께 심장채혈하여 혈청을 분리, 비동화한다음 말 및 기니픽 혈구를 사용하여 혈구응집억제반응<별첨>으로 pilus 항체가를 조사한다.

4.5.2. 판정

검사품 접종군의 pilus에 대한 혈구응집억제 항체가는 256배 이상이어야 하며 대조군은 4배 이하이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월 간 유효하다.

6. 사용방법

- 임신한 소나 양은 분만 8주전과 2-3주전, 2회 2ml씩 경부근육내에 주사한다.
- 백신을 접종받은 경험이 있는 모우(양)는 다음 임신기마다 분만 2-3주 전에 2ml씩 1회만 추가 주사한다.

1-1-1-04

<별첨> 혈구응집억제반응 시험(haemagglutination inhibition test, HI)

U형 microplate에 0.5% D-mannose를 함유한 PBS와 가검혈청 50 μ l를 2배 단계 희석한 후 동량의 K₉₉ 및 F₄₁ pilus 항원(4HA 단위가)을 각각 가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 감작시킨 후 K₉₉항원에는 1% 말혈구, F₄₁ 항원에는 1% 기니픽 혈구를 100 μ l씩 가하여 5 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨 후 혈구응집억제가를 판독한다.

<부 기>

부기 1. Minca medium

KH ₂ PO ₄	1.36g
NA ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	10.1g
Glucose	1g
Yeast extract	1g
Trace salt*	1g
Agar	20g
D.W	upto 1,000ml

pH 7.5로 맞춘 후 15lb에서 20분 멸균

* Trace salt

MgSO ₄ ·7H ₂ O	8g
MNCl ₂ ·4H ₂ O	1g
FeCl·4H ₂ O	0.135g
CaCl ₂ ·4H ₂ O	0.4g
Distilled water	upto 1,000ml

부기 2. MRHA Test

배양균액을 1회 PBS로 원심 세척한 후 U형 microplate에서 0.5% D-mannose가 함유된 PBS 50 μ l와 항원 50 μ l를 2진 희석한 후 K₉₉는 동량의 1% 말혈구, F₄₁은 동량의 1% 기니픽 혈구를 가하고 5 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨 후 혈구응집가를 측정한다.

우역 생백신

Linderpest Vaccine, Live

1. 정의

가토화 계대화 (lapinized-avianized, LA) 우역바이러스를 조직배양세포에 연속계대한 조직배양 우역바이러스 LATC (lapinized-avianized tissue culture) 주를 조직배양 세포에 증식시켜 동결건조한 생백신이며 우역의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

가토화 계대화 우역바이러스를 원숭이 신장세포에(Vero cell)에 계대배양한 LATC주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Vero cell를 세포증식용 배지(부기2)에 종독원액 1/10량을 접종하고 37℃에서 7일간 배양하여 감염세포액의 50% 유제액을 -70℃이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

원숭이 신장단층 세포에 종독을 접종하였을 때 잘 감염되며 37℃에서 7일간 회전 배양후 세포변성(cytopathic effect, CPE)효과가 80%이상 진행되고 이때 바이러스의 감염가는 $10^{5.0}$ TCID₅₀/0.1ml이상이다. 건강한 송아지 근육 내에 종독을 접종하였을 때 경미한 발열 이외에 하등의 이상이 인정되지 않고 강력한 면역이 성립되어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

롤러보틀(roller bottle)에 형성된 단층의 Vero세포(부기)를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기2) 및 세포유지용 배지(부기3)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

Vero세포(부기1)를 세포증식용 배지(부기2)에 부유시켜 37℃에서 2~3일간 배양한다. 바이러스 접종 전 배양세포에 세포변성효과(CPE)가 인정이 되어서는 아니된다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을때 종독으로부터 5대 이내 계대한 우역 바이러스 약 0.1~1.0 M.O.I (multiplicity of infection)가 되게 접종한 후 1시간동안 37℃에서 흡착시킨후 세포유지용 배지(부기3)을 분주하고 37℃에서 회전배양한다

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상인 출현하였을 때 배양병을 동결 및 용해 과정을 3회 반복 시킨 후 3,000rpm으로 15분간 원심분리하여 세포파편을 제거하고 무균적으로 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품과 우역 바이러스에 대한 고도면역 혈청을 동량 가하여 5℃에서 2시간 감작한 후 Vero단층배양세포에 접종하고 37℃에서 회전 배양하면서 CPE를 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

배양세포에서 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 10배 단계 희석하여 각 희석단위 별로 Vero 세포배양 시험관 5개에 0.1ml씩 각각 접종하고 37℃에서 7일간 회전배양하면서 CPE 출현여부를 관찰한다.

1-1-2-01

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액의 80%와 보호제(부기4) 20%를 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 담갈색을 띠는 회백색의 건조괴이며 용해용액을 가하여 흔들면 적등색의 투명한 액체이며 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따라 함습도가 4% 이하이어야 한다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미립바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스함유량 시험

4.6.1. 재료 및 시험

3.3.3.1에 의한 방법에 따른다.

4.6.2. 판정

소 1두분당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g의 강한 기니픽4마리, 체중 100~150kg의 우역바이러스 항체음성인 송아지 2마리를 사용한다.

마우스에는 검사품의 현탁액 0.5ml를 피하에, 기니픽에는 5ml을 복강 내 접종하고 7일간 관찰한다. 송아지에는 1두분을 피하에 접종하고 14일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험동물은 관찰기간 중 이상이 인정되어서는 아니 된다.

4.8. 역가 시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 송아지 2마리를 7일 후에 채혈한 혈청에 대하여 혈청중화 항체가를 측정한다.

4.8.2. 판정

혈청 중화 항체가는 혈청희석 10배 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

목의 피하에 1두분씩 주사한다.

<부 기>

부기1. 세포주

Vero세포 : African green monkey kidney 기원

부기2. 세포증식용 배지(minimum essential medium (α -M.E.M))

Eagle's	93~88%
Tryptose phophate broth	2~5%
Calf serum	5%
NaHCO ₃ (1.4~2%)	2%
Antibiotics	2%

부기3. 세포유지용 배지

(부기2)사항 중 calf serum을 2~3%로 한다.

부기4. 보호제

Lactose	800g
KH ₂ PO ₄	4.53g
K ₂ HPO ₄	10.03g
Monpotassium (KH ₄ PO ₄)-L-glutamate	80g
Gelatin	80g
D.W	4,000ml
Antibiotics	30ml

(Penicillin 80만 IU, Streptomycin 0.8g, Fungizone 2.0mg, 증류수4,000ml)

소 아까바네병 생백신

Bovine Akabane Virus Vaccine, Live

1. 정의

약독화된 소 아까바네병 바이러스를 조직 배양세포에 증식시켜 이 바이러스 배양액을 동결 건조한 생백신이며 소 아까바네병의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

JH-15주(JaGar-39주를 HmLu-1 세포에 15대 계대하여 약화시킨 바이러스주), 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

바이러스를 햄스터 폐 유래주화세포(HmLu-1)에 접종하고 34℃에서 배양한 후 세포변성효과가 약 80%이상 출현하였을 때 수확하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

소 아까바네 표준 항혈청과 중화하고 임신 우에 접종했을 때 발열 및 기타 임상 증상을 일으키지 않으며, 40℃에 배양했을 때 배양성이 저하되며, 마우스 피하에 접종했을 때 병원성이 없어야한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

HmLu-1(햄스타 폐 유래 주화세포)세포주를 사용한다.

3.1.2. 배지

TV용액(부기1), 세포증식용 배지(부기2), 및 세포유지용 배지(부기3)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

HmLu-1 주화세포를 TV 용액으로 소화시켜 분산된 세포를 3×10^5 세포/ml가 되도록 세포증식용 배지(부기2)에 부유하여 37℃에서 2~3일간 정치배양한다.

1-1-2-02

3.2.2. 바이러스배양

배양세포가 70~80%정도 단층이 형성되었을 때 종독을 세포유지용 배지(부기3)에 100TCID₅₀/ml가 되도록 혼합하여 배지를 교환하여 접종하고 접종한 후 34℃에서 5~7일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상이 출현하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 수집하여 1,500rpm에 10분간 원심하여 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

제조용 원액에 동량의 소 아까바네 바이러스 고도 면역혈청을 동량혼합하여 37℃에서 60분간 감작, 바이러스를 중화시켜 단층이 형성된 HmLu-1 세포에 접종하여 34~37℃에서 7일간 배양, 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과 및 혈구응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

제조용 원액을 바이러스 증식용 배지로 10배 단계 희석한 후 37℃에서 배양하면서 세포변성효과를 관찰하여 TCID₅₀/ml를 산출하여 바이러스의 함량을 측정한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 10^{6.5}TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 동량의 보호제(부기4)를 가하고 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉진한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물적 제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유한 회백색의 건조괴로서 용해용 용액에 쉽게 용해되어 균일한 현탁액이 되며 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성성이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 미입 바이러스 부정시험

4.3.1. 재료 및 시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.3.2. 판정

세포변성효과 및 혈구응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

4.4. 바이러스 함량시험

4.4.1. 재료 및 시험

검사품을 세포 유지용 배지로 10배 단계 희석한 후 각 희석별 바이러스액을 각각 증식용 배양세포에 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양 관찰한다.

4.4.2. 판정

바이러스 함량은 1마리분당 $10^{5.2}$ TCID₅₀이상이어야 한다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 마우스 10마리, 체중 300~350g의 기니퓰 4마리 및 체중 100~200kg의 항체음성 소 1마리를 사용한다. 검사품을 마우스 10마리에 0.5ml씩 피하에, 기니퓰 4마리에 2ml씩 복강 또는 근육 또는 피하에 접종 후 7일간 관찰하며 감수성 있는 소(체중100~200kg) 1마리에는 검사품 20두분을 피하에 접종하고 14일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

감수성 있는 소(체중 100~200kg) 2마리를 사용하여 1마리는 검사품을 1두분을 접종하고 1두는 대조로 하여 21일간 관찰한 후 혈청을 채취하여 중

1-1-2-02

화항체가를 측정한다. 가검혈청을 비동화한 후 바이러스 증식용 배양액으로 2 배수씩으로 희석하여 각 희석 혈청 0.5ml와 중화용 아까바네 바이러스 (200TCID₅₀/0.1ml)액을 동량 혼합하여 37℃에서 60분간 처리한 후 증식용 배양 세포에 각각 접종하고 37℃에서 7일간 배양 관찰한다.

4.6.2. 판정

접종군의 중화 항체가는 2배 이상이어야 하며 대조는 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

소 아까바네생독백신 희석액으로 용해하여 소의 연령, 품종, 체중에 관계없이 두당 1ml씩 건부 피하에 주사한다. 보강접종은 매년 모기발생 이전에 1회 접종한다.

<부 기>

부기1. TV액 (trypsin-versene solution)

NaCl	8.0gm
KCl	0.4gm
Dextrose	1.0gm
NaHCO ₃	0.58gm
Trypsin(1:250)	0.5gm
EDTA	0.2gm
D.W	1,000ml

부기2. 세포증식용 배지

α-MEM	900ml
Fetal calf serum	100ml
Lactalbumin hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2 mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200 IU/ml
Kanamycin	0.02 mg/ml

pH 7.0~7.4로 조정

부기3. 세포유지용 배지

α-MEM	900ml
소혈청	10ml
Lactalbumin hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2 mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200 IU/ml
Kanamycin	0.02 mg/ml

pH 7.0~7.4로 조정

1-1-2-02

부기4. 보호제 SPGA

Sucrose	0.217M
Monopotassium phosphate(KH_2PO_4)	0.0038M
Dipotassium phosphate(K_2HPO_4)	0.0072M
Monosodium glutamate($\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4\text{NNa} \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.0049M
Bovine albumin	2%
D.W	1,000mL

소 유행열 생백신

Bovine Ephemeral Fever Vaccine, Live

1. 정의

약독화 된 소 유행열 바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 이 바이러스액을 동결 건조한 백신이며 소 유행열 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

조직배양순화 소 유행열 약독 바이러스 BEF-B23M11주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

원숭이신장 조직세포(Vero cell)를 37℃에서 2~3일간 배양하여 단층이 형성되었을 때 소유행열 약독 바이러스의 원종독을 접종하여 2~3일간 배양한 후 세포 변성효과가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 감염액을 수확하여 -80℃ 이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

소 유행열 바이러스의 표준항혈청과 중화되어야 하고, 포유 마우스의 뇌내에 접종했을 때 독력이 인정되나 소에서는 임상증상이 관찰되지 않고 면역이 형성되어야 하며 소유행열 약독 바이러스는 Vero세포에 감염되며 접종 2~5 일 후에 세포변성효과가 일어나야 하고 종독의 바이러스 함량은 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

세포주는 원숭이 신장세포(Vero cell), 또는 BHK-21주화세포를 TV용액(부기 1)으로 소화시켜 분산된 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

배지는 세포증식용 배지(부기2) 및 세포유지용 배지(부기3)를 사용한다.

1-1-2-03

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

Vero세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.2. 바이러스배양

세포단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 다음 세포유지용 배지에 종독을 접종하여 34℃에서 2~3일간 회전배양한다.

3.2.3. 바이러스수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상이 출현하였을 때 배양병을 동결 및 용해 과정을 3회 반복시킨 후 배양액을 무균적으로 수집하여 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

불활화된 검사품을 소 유행열 바이러스의 고도면역혈청으로 동량혼합하여 37℃에서 1시간 중화한 후, 각 바이러스 희석액 0.1ml씩을 Vero세포 또는 BHK-21 배양세포에 접종하고 37℃에서 7일간 배양 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성 효과 및 혈구응집성 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 세포 배양액으로 10배 단계 희석하여 각 희석별 바이러스액을 Vero배양세포에 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양한 후 세포변성 효과를 관찰하여 바이러스감염가를 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액 80%에 보호제(부기4)를 20%의 비율로 가하고 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 대황백색의 건조 괴로서 용해용 용액을 가하여 흔들면 적등색의 균일한 용액이 되며 굵은입자나 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입바이러스 부정시험

3.3.2 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량시험

4.6.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석한 후 각 희석별 바이러스 액을 각각 10개의 조직배양 세포에 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양 하여 관찰한다.

4.6.2. 판정

1두분당 바이러스 함량이 $10^{3.0}$ TICD₅₀ 이상이어야 한다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 마우스 10마리, 체중 300~350g 의 기니픽 4마리, 체중 100~200kg 의 소 유행열 바이러스 항체 음성의 소 2마리를 사용한다. 마우스 10마리는 0.5ml를 피하에, 기니픽 4마리는 복강에 5ml를 각각 접종하여 7일간 관찰하고 검사품 1두분을 소 2마리에 각각 근육접종하여 14일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

1-1-2-03

마우스와 기니픽은 관찰기간 중 이상없이 생존하여야 하고 소는 가벼운 발열(40℃ 이하)이 인정되나 3일 이상 계속되지 않고, 그외 이상이 인정되어서는 아니된다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 소 2마리에 검사품 1두분을 재 접종하고, 14일 후에 혈청을 채취하여 중화항체가를 측정한다. 가검혈청을 56℃에서 30분간 비동화한 후 세포증식용 배지로 2진 희석하여 각 희석혈청 0.1ml와 중화용 소 유행열 바이러스(200TCID₅₀/0.1ml)액을 동량 혼합하여 37℃에서 60분간 감작시킨 후 증식용 조직배양세포 2개 이상에 각각 접종하고 37℃에서 7일간 배양하여 관찰한다.

4.8.2. 판정

중화항체가는 2배 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

모기가 발생하기 전에 건강한 소에 3~4주 간격으로 피하에 2ml씩 접종한다. 보강 접종은 매년 1회씩 모기가 발생하기 전에 접종한다.

<부 기>

부기 1. TV용액(trypsin-versene solution)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
Dextrose	1.0g
NaHCO ₃	0.58g
Trypsin (1:250)	0.5g
E.D.T.A.	0.2g
D.W	1,000ml

부기 2. 세포증식용 배지

Eagle MEM	80%
Calf serum	9%
Tryptose phosphate broth	10%
Penicillin	200IU/ml
Streptomycin	0.2mg/ml
Kanamycin	0.02mg/ml
Sodium bicarbonate 7% solution	2%

부기 3. 세포유지용 배지

Eagle MEM	80%
Calf serum	2%
Tryptose phosphate broth	10%
Yeast extract	0.5%
Sodium L glutamate	0.5%
Glucose	0.5%
Penicillin	200IU/ml
Streptomycin	0.5mh/ml

1-1-2-03

Kanamycin	0.02mg/ml
Sodium bicarbonate 7% solution	2%

부기 4. 보호제 LPGG (lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

소 로타바이러스, 코로나바이러스 생 혼합백신

Bovine Rota, Coronavirus Combined Vaccine, Live

1. 정의

약독화된 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 혼합동결건조한 생백신이며 소 로타바이러스와 코로나바이러스 감염증의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

2.1.1. 소 로타바이러스(bovine rotavirus, BRV)

MA104세포에서 15대 계대순환 약독화된 소 로타바이러스P44및 678주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 바이러스주를 사용한다.

2.1.2. 소 코로나바이러스(bovine coronavirus, BCV)

MDBK세포에서 25대 계대 순화 약독화된 소 코로나바이러스BC94주 또는국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 소 로타바이러스

MA104 주화세포를 37℃에서 세포증식용 배지(부기1)에 배양하여 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 후 trypsin이 ml당 0.5~2 μ g 함유된 세포유지용 배지(부기2)에 소 로타바이러스 P44주와 678주를 각각 1/10량을 접종하여 37℃에서 2~3일간 배양하면서 세포변성효과가 약 80%이상 일어났을 때 수확하여 -70℃이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 소 코로나바이러스

MDBK 주화세포를 37℃에서 세포증식용 배지(부기1)에 배양하여 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 후 세포유지용 배지에 소 코로나 바이러스 BC94주의 1/10량을 접종하여 37℃에서 4~6일간 배양하면서 세포 변성효과가 약 80% 이상 일어났을 때 수확하여 -70℃이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4℃이하에 보존한다.

1-1-2-04

2.3. 성장 및 독력

소 로타바이러스의 함량은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 하며 소 코로나바이러스의 함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 이상의 역가를 유지하여야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

배양세포는 MA104 및 MDBK 주화세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 소 로타바이러스

MA104 주화세포를 37℃에서 세포증식용 배지에 배양하여 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한후 trypsin이 ml당 0.5~2μg이 함유된 세포유지용 배지에 종독을 각각 1/10량 접종한후 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.2. 소 코로나바이러스

MDBK 주화세포를 37℃에서 세포증식용 배지에 배양하여 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 후 세포유지용 배지에 1/10량의 종독을 접종한다. 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스수확

3.2.3.1. 소 로타바이러스

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 수집하여 1,500rpm에 10분간 원심하여 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.3.2. 소 코로나 바이러스

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수집하여 1,500rpm에 10분간 원심하여 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1 재료 및 시험

불활화 전 원액검사품을 소 로타바이러스, 코로나바이러스 고도면역혈청을 동량 가하고 소 로타바이러스는 CV-1, MA104 또는 TF104세포에 소 코로나바이러스는 MDBK 세포에 접종하고 37°C에서 7일간 배양하여 관찰한다.

3.3.2.2 판정

세포변성효과 및 마우스, 기니픽 혈구에 대한 응집과 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 바이러스 함량시험

3.4.1. 재료 및 시험

3.4.1.1. 로타바이러스 함량시험

Trypsin 10 μ g/ml이 첨가된 조직배양용 배지로 1두분/1ml 되도록 용해시킨 검사품을 37°C에서 30분간 감작시킨 후 10배 단계 희석하여 각 희석액의 0.1ml 씩을 CV-1, MA102 또는 TF104 세포가 단층배양된 microplate 10 well에 접종한 후 5% CO₂ incubator에 4~7일간 배양 후 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 계산한다. 이때 사용되는 희석액 및 배양액은 Trypsin 1 μ g/ml을 함유한 배지를 사용한다.

3.4.1.2. 코로나바이러스 함량시험

조직배양용 배지로 1두분/1ml 되도록 용해시킨 검사품을 10배 단계 희석하여 각 희석액의 0.1ml씩을 microplate 10 well에 MDBK 세포와 동시에 접종한 후 5% CO₂ incubator에 4~7일간 배양 후 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 계산한다

3.4.2. 판정

바이러스 함량이 소 로타바이러스는 10^{7.5}TCID₅₀/ml 이상이어야 하며 소 코로나바이러스는 10^{6.0}TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.5. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 LPGG 보호제(부기)를 동량 가하고 잘 흔들어 혼합한다.

3.6. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유한 유백색의 건조 기로써 용해용 용액에 쉽게 용해되어 균일한 현탁액이 되며 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.4. 바이러스 함량시험

4.4.1. 소 로타바이러스 함량시험

3.4.1.1에 의한 검사에 따른다.

4.4.2. 소 코로나바이러스 함량시험

3.4.1.2에 의한 검사에 따른다.

4.4.3. 판정

1두분당 바이러스 함량이 소 로타바이러스는 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 하며 소 코로나바이러스는 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

시험에 적합한 체중 13~15g의 마우스 10마리, 체중 300~350g의 기니픽 4마리, 체중 120~150kg의 송아지 2마리를 사용한다. 검사품을 마우스 10마리에는 0.2ml를 피하에, 기니픽 4마리는 피하에 2ml를 접종하고 7일간 관찰한다. 송아지 2마리는 검사품 2두분을 근육 내에 접종하여 21일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 접종반응 및 이상이 관찰되어서는 아니된다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 300~350g의 기니픽을 15마리를 선정하여 10마리는 접종군으로 5마리는 대조군으로 한다. 접종군 기니픽에 검사품 1/2두분을 근육내에 접종하고 접종

3주 후에 채혈한 혈청을 사용하여 각각 중화항체가 시험을 실시한다. 중화 시험은 56℃에서 30분 비동화시킨 혈청을 세포유지용 배지로 2배 단계 희석한 다음 200TCID₅₀/0.1ml 중화용 바이러스를 동량 혼합하여 37℃에서 1시간 감작시킨 다음 각 혼합액을 배양세포에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다. 소 로타바이러스는 CV-1, MA104, TF104 세포, 소 코로나바이러스는 MDBK 세포 또는 적합한 세포를 사용하여 중화시험을 실시한다.

4.6.2. 판정

최대한 CPE (cytopathic effect)를 저지한 최고 혈청 희석배수를 중화항체가로 하고 소 로타바이러스 및 소 코로나바이러스에 대하여 각각 기하평균 8배 이상의 항체양성을 나타내어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

임신 후 접종 시 분만 6주전에 1차, 분만 4주전에 추가로 2.0ml씩 근육에 접종한다. 신생 송아지는 초유섭취 전에 4.0ml을 1회 경구투여한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle MEM or α -MEM	
Trptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate	2%
L-glutamin	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle MEM or α -MEM	
Trptose phosphate broth	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
L-glutamin	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. 보호제(LPGG)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

소 전염성비기관염(IBR), 바이러스성 설사(BVD), 파라인플루엔자(PI-3) 불활화 혼합백신

Infectious Bovine Rhinotrachitis, Bovine Viral Diarrhea, Parainfluenza-3 Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

소 전염성비기관염바이러스(IBRV), 바이러스성 설사병바이러스(BVDV) 파라인플루엔자 바이러스(PI-3)를 조직 배양 세포에 증식시켜 이 바이러스액을 불활화한 후 혼합하여 만든 백신이며 소 전염성비기관염, 파라인플루엔자 및 바이러스성 설사 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

IBRV는 PQ7주, BVDV는 NADL주나 T20주, PI-3는 NADL주 또는 국립수의 과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

1개월 이하의 송아지 신장세포를 37℃에서 2~3일간 배양하고 세포단층이 형성 되었을 때 IBRV, PI-3 및 BVDV를 각각의 배양기에 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml씩을 접종하고 35~37℃에서 배양하면서 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)가 70%이상출현 하였을 때 바이러스 감염액을 수확하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4℃이하에 보존한다

2.3. 성장 및 독력

각각의 바이러스는 표준 혈청과 중화되어야 하고 송아지 신장세포에 잘 감염되며 접종 2~5일 후에 세포변성효과가 일어나야 한다. 중독의 역가는 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml이상 이어 야하며 3대 이상 계대하지 않아야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

1-1-2-05

1개월 이하의 송아지 또는 소태아 신장세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

배지는 세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

1개월령 이하의 송아지 또는 소태아 신장을 무균적으로 채취하여 피질세포를 외과가위로 세절하고 0.25% trypsin 액으로 소화시켜 분산된 조직세포를 세포증식용 배지에 희석하여 3~5일간 37℃에서 정치 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층이 형성되었을 때 배양액을 제거한 다음 세포유지용 배지에 종독, IBRV, BVDV 및 PI-3 바이러스 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml씩을 각각의 배양기에 접종한 후 37℃에서 5~7일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상이 출현하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 수집하여 1,500rpm에 10분간 원심하여 상층액을 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 포르말린의 농도가 0.2%이하가 되게 가하여 IBRV 및 BVDV는 37℃에서 4~48시간 불활화하고 PI₃ 바이러스는 4℃에서 7일간 불활화한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학제제 일반 시험법 IV-5의 검사법에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

불활화 된 원액 검사품을 소 IBR, BVD 및 PI-3 바이러스의 고도면역 혈청을 동량 혼합하고 37℃에서 1시간 중화한 후 각 바이러스 희석액 0.1ml씩을 송아지 신장세포에 접종하고 저온에서 7일간 배양하여 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과 및 혈구응집성 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 전 각각의 바이러스 배양액을 10배 단계 희석하고 각 희석액의 0.1ml 씩을 송아지 신장 세포에 접종하고 37°C에서 7일간 배양하면서 세포변성효과를 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

IBRV와 BVDV의 바이러스 함량은 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 하며 PI₃의 바이러스 함량은 $10^{8.5}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

불활화가 끝난 IBR, BVDV, PI-3 바이러스 감염 배양액의 일부를 채취하여 멸균된 투석막에 넣고, 4~5°C 냉실에서 인산완충식염액속에 넣고 하룻밤 투석하여 포르말린을 제거한 다음 송아지 신장 세포에 접종하고 37°C에서 7일간 배양하면서 CPE를 관찰한다.

3.3.4.2. 판정

배양세포에 세포변성효과가 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

불활화 된 바이러스 원액에 수산화알루미늄겔(50mg±2mg/ml)을 10%가 되도록 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 담홍 또는 담황색의 부유액으로 굵은 입자나 이물 및 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2% 이하이어야 한다.

4.4. 불활화 확인시험

4.4.1. 재료 및 시험

검사품을 원심한 후 상층액 2.0ml를 투석막에 넣고 4℃에서 검사품 규정량의 100배 이상의 인산완충식염수(PBS)에 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다. 보호제를 가한 검사품은 보호제 첨가전의 재료를 상기와 같이 처리하여 시험재료로 한다.

송아지 신장세포 등의 초대배양세포 또는 소 전염성비기관염 바이러스에 대한 감수성이 동등한 소 신장 유래세포(MDBK세포주)를 사용한다. 초대배양세포는 시험관에 4~7일간 배양된 세포를 사용하며, MDBK세포를 사용할 때에는 4~5일 배양된 세포를 사용하기 전에 계대배양하여 사용한다.

시험관에 세포를 배양한 경우 배양된 액을 제거한 다음 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상의 시험관에 접종하여 37℃에서 7일간 회전배양하며, microplate에는 시험재료를 0.1ml씩 4개 이상의 well에 접종하고 20만개/ml로 조정된 MDBK 세포를 0.1ml를 넣어 7일간 정치배양한다. 이 때 대조의 접종재료는 세포 유지용 배지를 사용한다.

4.4.2. 판정

조직배양세포에서 IBR, BVD, PI₃ 바이러스의 특이한 세포변성효과 또는 다른 바이러스에 의한 세포변성효과가 인정되어서는 아니된다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 마우스 10마리, 체중 300~350g의 기니픽 4마리를 사용하며 검사품을 마우스 10마리에는 1.0ml씩을 피하에 기니픽 4마리에는 2.0ml씩을 근육에 각각 접종하고 7일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상이 인정되어서는 아니된다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

소 전염성비기관염에 대한 역가시험에는 체중 300~350 g의 기니픽 10마리, 바이러스성 설사병 및 파라인플루엔자 역가시험에는 체중 25kg의 재래 흑염소 (BVD, PI₃ 항체음성) 5마리를 사용한다.

기니픽 10마리에는 검사품 0.2두분씩을, 재래흑염소 5마리에는 검사품 1두분씩을 각각 3주 간격으로 2회 근육 접종하고 2주 후에 채혈한 혈청을 사용하여 각각 중화항체가 시험을 실시한다.

4.6.2. 혈청중화시험

중화시험에서는 가검혈청을 56℃에서 30분 동안 비동화한 혈청을 사용한다. 이것을 유지용 배양액으로 2배수 희석한다. 이 단계 희석액 0.3ml와 200 TCID₅₀/0.1ml가 되도록 희석하여 둔 검정용 바이러스 0.3ml를 동량 혼합하여 37℃에서 1시간 감작한다. 세포배양 시험관에는 배양된 액을 제거한 다음 혼합액을 0.1ml씩 2개 이상의 시험관에 접종하여 37℃에서 7일간 회전배양하며, microplate에는 시험재료를 0.1ml씩 4개 이상의 구멍에 접종하고 20만 개/ml로 조정된 MDBK세포를 0.1ml 넣어 7일간 정치 배양한다. 이때 대조의 접종재료는 희석액으로 사용된 유지용 세포 배양액을 동량 사용한다. 매일 현미경으로 관찰하여 CPE에 의한 양성과 음성을 판정한다. 이때 2개 중 1개에서 CPE를 저지한 최고혈청 희석배수로 역가를 나타낸다.

4.6.3. 판정

중화항체가는 4배 이상을 양성으로 하며 기니픽(IBR) 및 재래흑염소 (BVD, PI₃)의 80% 이상이 양성을 나타내어야만 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

3개월령 이상의 송아지 및 성우 모두 5ml씩 4주 간격으로 2회 근육 내에 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

α-MEM	900ml
소혈청	100ml
Lactalbumin hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200IU/ml
Kanamycin	0.02mg/ml

중조7%액으로 pH 7.0~7.4로 조정

부기2. 세포유지용 배지

α-MEM	900ml
소혈청	10ml
Lactalbumin hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200IU/ml
Kanamycin	0.02mg/ml

중조7%액으로 pH 7.0~7.4로 조정

소 아까바네병 불활화백신

Bovine Akabane Virus Vaccine, Inactivated

1. 정의

소 아까바네병 바이러스를 조직배양 세포에 증식시켜 이 바이러스를 불활화하여 만든 백신이며 소의 아까바네병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

국내 비육우 농장 유산태아에서 분리한 소아까바네 바이러스(NBE-9주) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

바이러스를 햄스터 폐 유래 주화 세포 (HmLu-1)에 접종하고 34℃에서 배양한 후 세포변성효과가 약 80%이상 출현하였을 때 수확하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

원종독을 생산할 때마다 면역원성을 조사하고, 혈청학적인 방법으로 동정한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

HmLu-1 세포주를 사용한다.

3.1.2. 배지

TV용액(부기1), 세포증식용 배지(부기2) 및 세포유지용 배지(부기3)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

HmLu 주화세포를 TV용액(부기1)으로 소화시켜 분산된 세포를 3×10^5 세포/ml가 되도록 증식용 배지에 부유하여 37℃에서 2~3일간 정치 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포가 70~80%정도 단층이 형성되었을 때 종독 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 세포유

1-1-2-06

지용 배지에 혼합하여 배지를 교환하여 접종하고 접종한 후 34℃에서 5~7일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상이 출현하였을 때 바이러스배양액을 무균적으로 수집하여 1,500rpm에 10분간 원심하여 상층액을 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 BEI를 0.004M이 되게 첨가한 후 37℃에서 5시간 불활화 후 4℃에서 overnight 시킨 다음 1M sodium thiosulfate를 첨가하여 37℃에서 1시간, 4℃에서 하룻밤 서서히 교반하여 감각시켜 중화시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 바이러스 함량시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

제조용 원액을 바이러스 증식용 배지로 10배 단계 희석한 후 37℃에서 배양하면서 세포변성효과를 관찰하여 TCID₅₀/ml를 산출하여 바이러스의 함량을 측정한다.

3.3.2.2. 판정

바이러스 함량은 10^{6.5}TCID₅₀/ml이상이어야 한다.

3.3.3. 불활화확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 끝난 바이러스 배양액을 HmLu-1 세포에 접종하고 37℃에서 7일간 배양하면서 세포변성효과를 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

배양세포에 세포변성효과가 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

불활화된 바이러스 원액은 수산화알루미늄겔(50mg±2mg/ml)을 10%가 되도록 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2% 이하이어야 한다.

4.4. 불활화 확인시험

4.4.1. 재료 및 시험

검사품을 원심한 후 상층액을 멸균된 투석막에 넣고 5℃에서 인산완충식염액 (PBS)에 하룻밤 투석하여 HmLu-1주 주화세포에 접종하고 30~37℃에서 7일간 배양하면서 세포변성효과 유무를 관찰한다.

4.4.2. 판정

특이한 세포변성효과가 일어나지 않아야 한다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 13~15 g의 마우스 10마리의 체중 300~350 g의 기니픽 4마리를 사용한다. 검사품을 마우스 10마리는 0.5ml를 피하에, 기니픽 4마리는 복강에 5ml씩을 각각 접종하고 7일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

모든 마우스와 기니픽은 관찰기간 중 이상없이 생존하여야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 300~350 g 기니픽 7마리를 선정하여 5마리에 검사품 0.5ml씩 근육에 각각 3주 간격으로 2회 접종하고 2마리는 대조로하여 접종 14일 후에 혈청 중화항체를 측정한다. 가검혈청 1ml를 56℃에 30분간 비동화한 후 바

1-1-2-06

이러스 증식용 배양액을 사용하여 2배수씩 희석하고 각 희석액에 200TCID₅₀/0.1ml의 중화시험용 바이러스액을 동량 혼합하여 37℃에서 1시간 감작시킨 후 배양세포에 접종하고 30~37℃에서 7일간 배양하여 세포변성 저지유무를 관찰한다.

4.6.2. 판정

중화항체는 8배 이상인 것이 80% 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

소의 품종, 체중에 관계없이 6개월 이상의 소에 3~4주 간격으로 3ml씩 2회 근육 내에 접종한다. 보강접종은 매년 흡혈곤충이 활동하기 전 1회 접종한다.

<부 기>

부기1. TV액 (trypsin-versene solution)

NaCl	8.0gm
KCl	0.4gm
Dextrose	1.0gm
NaHCO ₃	0.058gm
Trypsin(1:250)	0.5gm
EDTA	0.2gm
D.W	1,000ml

부기2. 세포증식용 배지

α-MEM	900ml
소혈청	100ml
Lactalbumin hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2 mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200 IU/ml
Kanamycin	0.02 mg/ml

중조7% 액으로 pH 7.0~7.4로 조정

부기3. 세포유지용 배지

α-MEM	900ml
소혈청	10ml
Lactalbumin hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2 mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200 IU/ml
Kanamycin	0.02 mg/ml

중조7% 액으로 pH 7.0~7.4로 조정

소 유행열 불활화 백신

Bovine Ephemeral Fever Vaccine, Inactivated

1. 정의

소 유행열 바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 이 바이러스액을 불활화하여 만든 백신이며 소 유행열 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

조직배양 소 유행열 바이러스 Dong Re주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

포유 햄스터 신장유래세포 (BHK-21)를 37°C에서 2~3일간 배양하여 세포단층이 형성되었을 때 소 유행열 바이러스 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하여 37°C에서 2~3일간 배양하여 세포변성효과가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 감염액을 수확하여 -80°C이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

소 유행열 바이러스의 표준항혈청과 중화되어야 하고 BHK-21세포에 잘 감염되며 접종 2~5일 후에 세포변성효과가 일어나야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

BHK-21 주화 세포를 TV용액(부기1)으로 소화시켜 분산된 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

배지는 세포증식용 배지(부기2) 및 세포유지용 배지(부기3)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

BHK-21 주화세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 37°C에서 2~3일간 배양한다.

3.2.2. 바이러스배양

세포단층이 70~80% 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 다음 세포유

지용 배지에 종독바이러스 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하여 34°C에서 2~3일간 회전배양한다.

3.2.3. 바이러스수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 배양액을 무균적으로 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액에 사용하고 나머지는 불활화제 (부기4)의 최종 농도가 0.01M(전체 량의 10%)이 되게 가한 후 37°C에서 4~5시간 동안 불활화시킨 후 20% sodium thiosulfate를 전체량의 10%가 되도록 첨가하여 37°C에서 1시간, 그리고 4°C에서 하룻밤 서서히 교반하여 BEI를 중화시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미립바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

제조용 원액을 바이러스 증식용 배지로 10배 단계 희석한 후 37°C에서 배양하면서 세포변성효과를 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화전 소유행열 바이러스 배양액을 10배 단계 희석하고, 희석된 바이러스를 0.1ml씩 각5개의 BHK-21주화세포 배양시험관에 접종하고 37°C에서 5~7일간 배양하면서 CPE를 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{6.0}$ TCID₂₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

불활화가 끝난 소 유행열 바이러스 배양액의 일부를 채취하여 증식된 BHK-21 주화세포에 접종하고 37°C에서 7일간 배양하면서 세포변성 효과를

관찰한다.

3.3.4.2. 판정

배양세포에 CPE가 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

불활화 된 바이러스 원액에 수산화알루미늄(120mg/ml)을 10%가 되도록 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린의 함량은 0.2% 이하이어야 한다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH가 6.4~7.4 이어야 한다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

13~15g의 마우스 20마리 및 체중 300~350g의 기니픽 10마리를 사용한다. 마우스에는 검사품의 0.2두분씩 근육에 2주 간격으로 2회 접종하고, 기니픽에는 1두분을 근육 내에 2주 간격으로 2회 접종한 후 7일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

시험동물은 최종 접종 후 7일까지 관찰기간 중 이상이 인정되어서는 아니된다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 기니픽 8마리 대조 2마리 및 마우스 접종 4개군(1개군 4마리씩)과 대조 1개군의 혈청을 혼합하여 비동화한 후 세포증식용 배지로 2배씩 희석하고 소 유행열 바이러스(YHL주의 200TCID₅₀/0.1ml)와 동량 혼합하여 34℃에서 1시간 감작한다. 감작이 끝난 0.1ml씩을 4개의 HmLu세포에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한 다음 CPE를 관찰하여 중화 항체가를 측정한다.

4.6.2. 판정

중화항체가는 2배 이상을 양성으로 하며 시험군은 80%이상이 양성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

소의 연령, 체중, 품종에 관계없이 3~4주 간격으로 3ml씩 2회 근육 내에 주사하고 추가 접종은 매년 모기발생 이전에 1회 접종한다.

<부 기>

부기1. TV용액 (Trypsin-Versene solution)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
Dextrose	1.0g
NaHCO ₃	0.58g
Trypsin (1:250)	0.5g
E.D.T.A.	0.2g
D.W	1,000ml

부기2. 세포증식용 배지

Eagle MEM	80%
Calf serum	9%
Tryptose phosphate broth	10%
Penicillin	200IU/ml
Streptomycin	0.2mg/ml
Kanamycin	0.02mg/ml
Sodium bicarbonate 7% solution	2%

부기3. 세포유지용 배지

Eagle MEM	80%
Calf Serum	2%
Tryptose phosphate broth	10%
Yeast extract	0.5%
Sodium L glutamate	0.5%
Glucose	0.5%
Penicillin	200IU/ml
Streptomycin	0.5mh/ml
Kanamycin	0.02mg/ml

Sodium bicarbonate 7% solution 2%

부기4. 불활화제 (BEI액)

2-bromoethylamine hydrobromide2.05g

0.2N Sodium hydroxide100ml

소 타일레리아(범안열원충) 생백신

Bovine Theileriosis Vaccine, Live

1. 정의

*Theileria sergenti*의 총체항원에 보호제를 가하여 동결한 백신이며 소타일레리아증 예방에 사용한다

2. 제조용 원충

2.1. 원충주

국내의 자연감염우에서 분리동정한 *Theileria sergenti* SH주 또는 국립수의 과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 총체를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

비장을 적출한 5개월령 송아지에 원충에 감염된 혈액 2ml를 피하내에 접종한 후 적혈구내의 기생율이 20%이상 상승되었을 때 헤파린이 가하여진 용기에 감염적혈구를 무균적으로 채혈하여 2,000rpm에 20분간씩 3회 세척한 후 적혈구 용적량과 동량의 6% dimethyl sulfoxide를 가하여 액체질소에 동결보존한다.

2.3. 성상 및 독력

소의 적혈구에 침입된 원충의 형태는 초기에는 원형, 그 후에는 원형, 난원형, 서양배의 모양이며 만성에서도 여러 가지 모양을 나타낸다. 원충의 크기는 아메바형은 0.2~4.0 μ m정도이며 광학 현미경으로 볼 수 있다. 혈액의 박충도말표본을 Giemsa염색하여 관찰한다. 소의 적혈구에 기생하여 고혈, 빈혈과 발육장애가 특징이다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 동물 및 총체

비장을 적출한 5개월령 송아지와 *Theileria sergenti* SH주를 사용한다.

3.1.2. 재료

적혈구 세척액(부기1), 적혈구 용혈액(부기2) PBS(부기3) 및 *Theileria sergenti* 배양액(부기4)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 총체항원의 생산

3.2.1.1. 동물 및 원충접종

비장 적출한 송아지에 *Theileria sergenti* 감염혈액(10% parasitemia) 2ml를 피하내에 접종한다.

3.2.1.2. 총체항원의 수확

원충을 접종한 후 2일 간격으로 채혈, Giemsa 염색하여 적혈구 내의 기생율이 20% 이상 상승하였을 때 헤파린이 가하여진 용기에 무균적으로 전채혈한 다음 적혈구 세척액(부기1)를 사용하여 2,000rpm에 20분간씩 3회 원심세척한다. 침전된 적혈구에 30배의 적혈구 용혈액(부기2)을 가하여 충분히 진탕한 후 4℃를 유지하면서 20,000xg에 30분씩 10회 원심세척하고 침전물질을 초음파 처리한 다음 총체항원의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -80℃에 동결보존한다.

3.2.2. 총체 외 항원의 생산

3.2.2.1. 동물 및 원충접종

비장 적출한 송아지에 *Theileria sergenti* 원충주를 인공감염 시킨다.

3.2.2.2. 총체항원의 수확

인공 감염 시킨 후 적혈구 내의 기생율이 20% 이상 상승하였을 때 헤파린이 가하여진 용기에 무균적으로 채혈한 다음 PBS(부기3)를 사용하여 2,000rpm에 20분간씩 3회 원심세척한 후 세척한 적혈구를 *Theileria sergenti* 배양액(부기4)에 접종한 다음 35℃의 CO₂ 5% 항온기에 배양하면서 그 상층액을 24시간 마다 3일간 수집하여 4℃에서 PBS로 24시간 투석한다. 이들 총체항원의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20℃이하에 동결보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 단백질 정량시험

단백질 정량방법(부기5)에 의하여 총체항원에 함유된 단백질량이 2mg/ml이상 되도록 조정한다.

3.3.3. 항원 특이성시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

총체항원과 외항원을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (부기6)하여 얻은 겔을 Coomassian blue로 염색한 후 단백질밴드를 조사한다.

3.3.3.2. 판정

SDS-PAGE의 결과 아래와 같은 단백질밴드가 인정되어야 한다.

1) 총체항원 : 16kD, 17kD, 27-31kD, 33kD, 42kD, 100kD

2) 외 항 원 : 14kD, 31kD, 33kD, 42kD, 90-93kD

3.4. 최종원액

총체항원과 외항원을 동량 혼합하여 단백질 함량을 2mg/ml이상으로 조정 한 다음 혼합된 량과 동량의 LPGG(부기7)를 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-1에 의한 검사에 따라 담홍갈색의 건조괴로서 이물 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.6. 비특이 반응시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 350~400g의 건강한 guinea pig 3수의 척추 측 피부 내에 검사품의 항원 0.2ml씩을 주사하고 15~30분 후와 24시간 후의 반응을 관찰한다.

4.6.2. 판정

모든 기니픽은 반응이 인정되지 않아야 한다.

4.7. 항원 특이성시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.8. 안전시험

4.8.1. 동물 및 시험

체중 20g의 마우스 10마리, 체중 200g의 기니픽 4마리, *Theileria*에 감염되지 않은 4개월령 송아지 2마리를 사용한다. 검사품을 마우스 10마리는 0.2ml 씩 피하에, 기니픽 4마리는 0.5ml을 피하와 근육 내에 각각 2마리씩 접종하고, 송아지 2마리에는 검사품의 규정량을 근육 내에 접종하여 14일간 관찰한다.

4.8.2. 판정

모든 마우스, 기니픽, 송아지는 관찰기간 중 이상없이 생존하여야 한다.

4.9. 역가시험

4.9.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 송아지 2마리에 검사품이 규정량을 근육 내에 재접종하여 2주 후 채혈한 혈청과 안전시험 전 채혈한 혈청을 사용하여 역가를 측정한다. 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody assay: IFA)에 의하여 *Theileria sergenti*의 항체를 측정한다. IFA용 항원의 제조는 비장적출 송아지에 이들 각 균주를 인공감염시켜 기생율이 20%이상일 때 채혈하여 백혈구를 제거(원심분리법)한 다음 적혈구만을 0.1M glycine buffer(pH 3.0)와 PBS(부기 3)로 처리하여 자가항체를 제거한다. 이 때 원심 침전된 적혈구와 1.75% BSA를 동량 혼합하고 slide에 도말하여 IFA용 항원 slide를 제작한 후 이를 -80℃에 보존하여 사용한다. IFA slide는 -20℃의 Acetone에 15분간 고정시킨 후 검사혈청을 2단계 계열 희석하여 37℃에서 1시간씩 각각 반응시킨 후 PBS로 3회 세척 후 적절히 희석된 conjugate(fluorescein-labeled anti-bovine IgG)를 감작시켜 형광항체 현미경으로 관찰한다.

4.9.2. 판정

접종군의 항체역가는 1:160배 이상이어야 하며 접종전은 음성이어야 한다.

1-1-3-01

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

이유후의 송아지에 1차 접종하고 1개월후 2차 접종한다. 매년 겨울 사사기에 1회 보강접종 한다. 용해용액, saponin "Quil-A"(0.5 mg/ml)으로 용해하여 피하 또는 근육 내에 2ml씩 주사한다.

<부 기>

부기1. 적혈구 세척액

Tris · HCl(pH7.4)	100 Unit/ml
NaCl	100 μ l/ml
EDTA	0.025 μ l/ml
Phenyl methyl sulfonyl flouride	1.5~2 μ l/ml

부기2. 적혈구 용혈액

Tris · HCl(pH7.4)	100 Unit/ml
NaCl	100 μ l/ml
EDTA	0.025 μ l/ml
Phenyl methyl sulfonyl flouride	1.5~2 μ l/ml

부기3. PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.52g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W.	1,000ml

부기4. 배양액

1) *T. sergenti* 배양액

감염적혈구(PCV)	9.1%
Medium 199	50.9%
정상 소혈청	40%

2) Medium 199 조성

Hepes	15mM
Streptomycin	100 μ g
Penicillin.....	100 IU

1-1-3-01

Hypoxanthine.....	50mg
Glutathione.....	3mg
Adenosine.....	3mg
M-199.....	1,000ml

부기5. 항원단백질 정량방법

1) 시약

A 시약 : 20% Na₂CO₃ 함유 0.1N NaOH

B 시약 : 0.5% CuSO₄ · 5H₂O 함유 1% sodium tartrate

C 시약 : A시약에 50ml에 B시약 1ml를 혼합하되 사용시 조성하여야 한다.

(하룻밤 지나면 사용 불가능)

E 시약 : Folin-Ciocalteu(Merk Co.)

2) 표준 단백질

결정 bovine albumin(Sigma Co.)을 정제수로 용해하여 2mg/ml가 함유되도록 희석하여 표준단백질로 사용한다.

3) 측정방법

표준단백질 각 단계별 희석액 0.2ml씩을 C 시약 1ml에 각각 넣고 잘 혼합하여 10분간 방치한 후 E시약을 0.1ml씩 넣고 즉시 잘 진탕하여 30분간 방치한 후 spectrophotometer(750μm)로 흡광도를 조정하여 표준곡선을 작성한다. 총체항원 원액을 증류수로 적정 희석배율로 희석하여 표준단백질 측정시와 동일한 방법으로 측정하여 흡광도에 따라 단백질 함량을 산출한다.

부기6. SDS-PAGE에 사용되는 gel용액

1) 30% stock gel

Polyacrylamide 100 Unit/ml

Bis 100μl/ml

D.W 0.025μl/ml

2) Running gel (10% polyacrylamide)

D.W 0.025μl/ml

Stock gel 2μl/ml

1M Tris gel	2 μ l/ml
10% ammonium persulfate	2 μ l/ml
TEMED	2 μ l/ml
3) Stacking gel (4% polyacrylamide)	
D.W	2.7ml
30% stock gel	1.2ml
0.5M Tris · HCl (pH 6.8)	2 μ l/ml
10% SDS	60 μ l
10% ammonium persulfate	60 μ l
TEMED	6 μ l
4) Electro buffer (chamber buffer)	
Tris	3.05g
Glycine	14.4g
SDS	1.0g
D.W	1,000ml
5) Transfer buffer	
Tris	3.05g
Glycine	14.4g
Methylalcohol	200ml
D.W	1,000 ml
6) Sample buffer	
0.5M Tris · HCl (pH 6.8)	2.5ml
20% SDS	1.0ml
2-Mercaptoethanol	1.0ml
Bromophenol blue 0.5%	250 μ l

부기7. 보호제(SPGG)

Lactose	74.4g
KH ₂ PO ₄	0.51g
K ₂ HPO ₄	0.85g
D.W	1,000ml

여 백

1-2 돼 지

여 백

돼지 단독 생백신

Erysipelothrix Vaccine, Live

1. 정의

약독 돼지 단독균 배양균액에 보호제를 가하여 동결건조한 생 백신이며 돼지단독의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

약독 돼지 단독균(*Erysipelothrix insidiosa*) NL-11주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 돼지 단독균 배지(부기1)에서 24~48시간 배양한 균액을 동결건조하여 4℃이하 냉암소에 보존하며 1년에 1회 계대한다.

2.3. 성상 및 독력

돼지 단독균의 일반성상을 가지며 0.02% 아크리프라빈(acriflavine) 배지에서 발육되는 내성균주이며, 체중 15g정도의 마우스와 돼지에 대해서는 병원성 없이 강력한 면역이 형성된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

돼지 단독균 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

동결건조된 돼지 단독균을 0.15M saline으로 용해하여 10% 소혈청을 첨가한 brain-heart infusion broth에 소량 접종하고 24~48 시간 배양한 후 다시 10% 소혈청을 첨가 한 brain-heart infusion agar평판배지에서 48~72 시간 배양하여 평평한 집락(smooth colony)를 3~4개 채취하여 돼지 단독균 배지(부기1)에 이식하여 37℃에서 24~48 시간 증식배양한다.

3.2.2. 본배양

돼지 단독균 배지(부기1)에 종균배양액을 1/100량 접종하여 37℃에서 10~16

1-2-1-01

시간 배양한다.

3.2.3. 집균

충분히 배양된 균액을 100목 동망으로 여과하여 집균한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따라 혼합 현탁액의 도말 염색표본에서 돼지 단독균 이외의 균이 검출되어서는 아니된다.

3.3.2. 생균수시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

배양 집균한 원액을 돼지 단독균 배지(부기1) 또는 nutrient broth로서 10배 단계 희석액 1ml를 10% 소혈청을 가한 brain-heart infusion agar 평판 또는 보통 한천평판에 이식하여 37°C에서 36~48시간 배양하여 균수를 계산한다.

3.3.2.2. 판정

생균수는 4억개/ml개 이상이어야 한다.

3.3.3. 동정시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

현탁액 0.1ml를 0.05~0.1% acriflavine첨가 한천배지에 이식하여 37°C에서 48~72 시간 배양하여 돼지 단독균의 발육을 확인하며 동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 그람(Gram)염색을 실시한다.

3.3.3.2. 판정

배양결과 돼지 단독균의 발육이 인정되어야 하며 그람 양성이어야 한다.

3.4. 최종원액

돼지 단독균수가 4억/ml개 이상 되도록 보호제(부기2)를 가하여 조정한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 회백색 또는 황갈색의 건조괴이며 용해용액으로 용해하면 균등한 현탁액이 되며 조대입자, 이물, 이취가 없고 소분용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따라 각소분 용기는 테스타 코일로써 무극 방전하여 방전이 인정되어야 한다.

4.3. 함습도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따라 함습도가 4%이하이어야 한다.

4.4. 순수시험

3.3.1에 의한 검사에 따른다.

4.5. 생균수 시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 동정시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

생후 28~32일령의 건강한 11~13g의 마우스 30마리를 선정 20마리는 검사품 현탁액 0.1ml을 피하에 접종하고 10마리는 대조군으로 하여 10일간 관찰한다. 또한 건강한 40~50kg의 중돼지 3마리에는 1궤정량을 피하에 접종하고 3주간 관찰한다.

4.7.2. 판정

마우스는 관찰기간동안 모두 내과생존 해야만하며 돼지는 관찰 결과 이상이 없어야 하며 부검결과 돼지 단독의 병변이 없어야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난후 검사품의 접종군 20마리와 대조군 10마리에 돼지단독 강독균액의 100MLD/0.2ml를 접종하고 14일간 관찰한다.

4.8.2. 판정

관찰결과 대조군은 100% 폐사하고 시험군은 80%이상 내과 생존해야 한다.

1-2-1-01

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

돼지의 이근부 또는 내복부의 피하에 2.0ml 주사한다.

주사 전 임상검사를 실시하여 체온이 높거나 교배 후 2주 이내, 임신말기, 분만직 후에는 주사를 피해야 한다. 주사부위는 주사 2~3일 후에 접종부에 소구진이 발생하는 경우가 있으나 수일 내로 소진된다.

<부 기>

부기1. 돼지 단독균 배지

Beef infusion	82.2%
Liver infusion	3.5%
Peptone	2.0%
Sodium phosphate($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	1.1%
Potassium phosphate ($\text{KH}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	0.1%
Ox-bile	0.1%

상기 조성성분을 혼합 용해하여 pH를 8.0으로 조절하고 15Lb 30분간 고압멸균한 다음 Dextrose와 Lactose의 최종 농도가 각각 0.5% 함유되도록 또 소 혈청을 10% 함유되도록 첨가한 후 배지의 최종 pH가 7.4~7.6이 되도록 수정하여 사용한다.

부기2. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH_2PO_4	0.517g
K_2HPO_4	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

돼지 위축성비염 불활화백신

Porcine Atrophic Rhinitis Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 보데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)균을 순수배양하여 얻은 균액을 불활화하여 만든 백신이며 돼지 위축성비염 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Bordetella bronchiseptica P4의 일상균 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Bordetella bronchiseptica P4주의 1상균를 Bordet Gengou blood agar(BGBA)배지에 이식하여 37℃에서 24시간 배양, *Bordetella bronchiseptica*의 전형적인 단독 집락을 선택하여 tryptic soy broth(TSB)배지에 계대 배양하여 배양한 균액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Bordetella bronchiseptica P4주 1상균의 B.b P4주 I 상균의 성장검사는 혈액배지에서 용혈성(+), MacConkey agar(+), nitrate 환원성(+), urea분해능(6시간이내+), glucose(-), lactose(-), malonate(-) 선택배지(G20G)에서의 특유(small colony, blue color change)의 배양성과 독신(CDNT)의 산생능을 가진다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

*Bordetella bronchiseptica*는 TSB배지 또는 이와 동등한 배지를 각각 제조용 배지로 사용한다. 균의 배양에 사용하는 배지에는 돼지에 고도의 알러지 현상을 일으킬 우려가 있는 것을 사용하여서는 아니된다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 균주를 Bordet Gengou blood agar(BGBA, 5% sheep boal) 또는

이와 동등한 배지에 이식하여 37℃에서 18~24시간 배양하여 본 균의 전형적인 집락을 선발하여 TSB 또는 이와 동등한 배지에 이식하여 18~24시간 배양한 것을 표준으로 사용한다.

3.2.2. 본배양

Tryptic soy agar(TSA) 배지를 룩스병 (1,000ml) 1개당 200 ml씩 분병, 15 lb에서 30분간 고압멸균하여 사용한다. 배양된 종균액을 룩스병당 5ml씩 이식하고 37℃에서 48시간 배양한다.

3.2.3. 집균

균이 배양된 룩스병에 적당량의 멸균된 생리식염수와 초자구를 함께 넣고 흔들어서 완전히 집균한다. 집균된 균액은 120목 동망 및 3겹 가아제를 통과시켜 한천면을 제거한 다음 균괴의 세분과 균질화를 위하여 초자구를 넣은 용기에서 흔들어서 진탕한다. 집균액의 일부를 채취하여 원액검사에 사용하고, 나머지는 항원농도를 조절한 후 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

포르말린을 0.3% 가하고 37℃에서 3일간 정치하되 1일 3회 이상 흔들어서준다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 각 항원액을 혈액배지에 이식하여 37℃에서 3일간 배양하여 균의 발육유무를 확인한다.

3.4 최종원액

3.4.1 항원농도조절

불활화전에 채취한 집균액을 10배 단계희석하여 제조용 배지를 사용, 균수를 측정하여 1두분(0.5ml)당 3×10^{10} 개 이상이 되게 조절한다.

3.5 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분 용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1 특성시험

제품 고유의 색으로 이물 및 이취가 없는 균액으로서 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린의 함량은 0.3% 이하이어야 한다.

4.4. 안전 시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 5마리는 0.5ml를 복강에 5마리는 0.5ml를 피하에 접종하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 근육 및 피하에 각 2마리씩 1ml를 접종하며 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰하며, 그리고 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 3마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종하여 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 관찰기간 동안 이상이 없이 생존하여야 하며 또한 자돈은 접종 후 1~2시간 내에 과민반응이 없어야 하고 관찰기간 동안에 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용이 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 마우스 20마리에는 검사품 10배 희석액을 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후에 *Bordetella bronchiseptica* 10LD₅₀/0.2ml를 각각 복강에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.2. 판정

검사품 접종군은 80% 이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

24개월간 유효하다.

6. 사용방법

자돈은 3주령에 1.0ml 근육 내에 접종하고 2주 후에 1.0ml을 보강 접종한다.

모돈은 분만 30일전 1.0ml 근육 내에 접종하고 15일 후 보강 접종한다.

돼지 위축성비염, 파스튜렐라페럼, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합백신

Porcine Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida,
Erysipelas, E.coli Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 보데텔라 브론키셉티카, 파스튜렐라 멀토시다, 돼지 단독균을 순수 배양한 균액과 대장균 순수항원을 각각 불활화하여 혼합한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며, 돼지의 위축성비염, 파스튜렐라페럼, 돼지단독 및 대장균 설사증 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Bordetella bronchiseptica P4주의 1상균, *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형 균주, *Erysipelothrix rhusiopathiae* T2주 및 *Escherichia coli*, K88ab, K88ac, K99 및 987P 혈청형균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. *Bordetella bronchiseptica* P4주의 1상균

Bordetella bronchiseptica P4주의 1상균를 Bordet Gengou blood agar (BGBA)배지에 이식하여 37°C에서 24시간 배양, *Bordetella bronchiseptica*의 전형적인 단독 집락을 선택하여 tryptic soy broth(TSB)배지에 계대 배양하여 배양한 균액을 -80°C이하에 동결보존 또는 동결 건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.2.2. *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형균주

Pasteurella multocida 3A 및 4D형균를 tryptose agar(TA)배지에 각각 이식한 후 37°C에서 18~20시간 배양한 후 전형적인 *Pasteurella multocida* 균주의 단독 집락을 선택하여 TSB배지에 계대 배양하여 각각 배양한 균액을 -80°C이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.2.3. *Erysipelothrix rhusiopathiae* T2주

Erysipelothrix rhusiopathiae T2균주를 10% 소혈청을 가한 brain heart infusion(BHI) broth배지에 소량 접종하고 24~48시간 배양한 후 다시 BHI agar 평판배지에서 48~72시간 배양하여 “S” Colony 3~4개를 채취하여 돼지 단독배지(부기1)에 이식하여 37°C에서 24~48시간 배양한 균액을 -80°C이하에 동결보존 및 동결 건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.2.4. *Escherichia coli* K88ab, K88ac, K99 및 987P혈청형 균주

Escherichia coli K88ab, K88ac, K99 및 987P혈청형 균주를 MacConkey agar 배지에 각각 이식하여 37°C에서 12~16시간 배양, *Escherichia coli*의 전형적인 단독 집락을 선택하여 TSB배지에서 6~8시간 계대배양하여 각각 배양한 균액을 -80°C이하에 동결보존 또는 동결 건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. *Bordetella bronchiseptica* P4주 I 상균

Bordetella bronchiseptica P4주 I 상균의 성장검사는 용혈성(+), MacConkey agar(+), G20G 선택배지에서의 발육능, nitrate 환원성(+), urea분해능(+), glucose(-), lactose(-), malonate(-)등을 실시하며 *Pasteurella multocida*의 성장검사는 용혈성(-), MacConkey agar(-), oxidase(-), catalase(-), urea분해능(-), glucose(+), lactose(-), sucrose(+), maltose(-), manitol(+) 등의 검사를 실시하며 혈액배지에 24시간 이상 배양 시 용혈성을 나타낸다.

2.3.2. *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형의 균주

*Pasteurella multocida*은 tryptic soy agar(TSA)배지에 16~18시간 배양시 진주빛을 띠고 협막을 형성하며, 이들 균은 각각 그람 음성 구간균으로 마우스에 접종 시 24~48시간 내에 마우스가 폐사되고 기니픽 피내에 접종했을 때 심한 괴사를 형성한다.

2.3.3. *Escherichia coli* T2주

Escherichia coli T2주는 본 균 특유의 생화학적 성상을 유지하고 닭 적혈구에 혈구응집능이 있어야 하며 agar gel immuno diffusion방법에 의해 *Erysipelothrix rhusiopathiae* type 2로 확인되어야 한다.

2.3.4. *Escherichia coli* 각 혈청형 균주

각 혈청형 균주는 특유의 생화학적 성상을 유지하는 병원성 대장균주로 mannose-resistant hemagglutination inhibition(MRHI)시험(별첨1,2) 또는

면역혈청학적 방법 등에 의하여 K88ab, K88ac, K99 및 987P pilus 생성능이 확인되어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Bordetella bronchiseptica 및 *Pasteurella multocida*은 TSA배지, TA배지 및 TSB배지를,

Erysipelothrix rhusiopathiae 는 10% 송아지 혈청이 첨가된 brain heart infusion(BHI)broth나 말육즙 배지를,

*Escherichia coli*는 혈액 한천배지 TSB배지 및 Minca medium(부기2)을 각각 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

*Bordetella bronchiseptica*는 보존된 균주를 TSA배지에 이식하여 37℃에서 24시간 배양 후 집락을 선정하여 TSB배지에 이식하여 24시간 배양한 것을, *Pasteurella multocida*은 보존된 3A 및 4D형 균주를 TA배지에 이식하여 37℃에서 18~20시간 배양하고 집락을 선발하여 BHI broth에 이식 18~20시간 배양한다.

*Erysipelothrix rhusiopathiae*는 혈액 한천 배지상의 순수집락을 선정하여 0.1% tween 80이 첨가된 TSB배지에 이식하여, 37℃에서 18~20시간 증식한 것을,

*Escherichia coli*는 혈액 한천 배지상의 순수집락을 선정하여 TSB배지에 이식하여 37℃에서 18~24시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

BHI배지를 룩스병 또는 플라스크에 적정량 분병 15Ib 에서 30분간 고압멸균하여 사용한다.

*Bordetella bronchiseptica*균은 각 룩스병에 종균액을 5ml씩 이식하고 37℃에서 48시간 배양,

*Pasteurella multocida*균은 배양된 A 및 D 형 종균액을 룩스병 당 5ml씩 각각 이식하고 37℃에서 18~20시간 진탕배양한다.

*Erysipelothrix rhusiopathiae*균은 종균 배양액을 10% 송아지 혈청이 함유된

BHI broth에 이식 37℃에서 48시간 배양한다. (24시간 배양 시 균수 :10 억/ml 이상),

*Escherichia coli*는 종균 배양액을 TSB배지에 이식하여 37℃에서 18~24시간 Minca medium 에서는 36~48시간을 각각 배양한다.

3.2.3. 집균

*Bordetella bronchiseptica*균 및 *Pasteurella multocida*균은 배양된 룩스병에 적당량의 멸균된 생리적 식염수와 초자구를 함께 넣고 흔들어 완전히 집균한다. 집균된 균액은 120목동망 및 3겹 가제를 통과케 하여 한천편을 제거한 다음 균괴의 세분과 균질화를 위해 초자구를 넣은 용기에서 흔들어 진탕하며, 각 균주별로 집균액의 일부를 채취하여 원액검사에 사용하고 나머지는 항원농도를 조절한 후 불활화 시킨다.

*Erysipelothrix rhusiopathiae*균은 충분히 배양되고 집균 혼입이 없는 균액을 100 목동망으로 여과하여 채균한다.

*Escherichia coli*는 집균의 오염 유무와 pilus 생성 여부를 확인(MRHA 시험)한 후 Minca medium 배양균은 5℃에 보존한다.

3.2.4. 불활화

*Bordetella bronchiseptica*균 및 *Pasteurella multocida*균은 포르말린을 0.3% 가하고 실온에서 3일간 정치(가끔 흔들어줌)하여 불활화 시킨다.

*Erysipelothrix rhusiopathiae*균은 집균액에 포르말린을 0.3%되게 첨가시킨 후 실온에서 24시간 정치하여 불활화 시킨다.

*Escherichia coli*는 TSB배양 집균액의 경우 포르말린을 0.3% 가하여 실온에서 3일간 정치하되 가끔 흔들어 주며 불활화 시킨다.

3.2.5. *Escherichia coli* pilus 분리 및 정제

*Escherichia coli*균은 Minca medium에 배양 집균하여 5℃에 보존된 균체를 각 균주별로 본 배양시 용량의 1/10량 PBS에 부유시켜 60℃에서 20분간 열처리 후 5℃에서 원심분리(17,000xg, 20분)하여 상층액을 수집한 후 이 상층액을 2~5℃로 유지하면서 ammonium sulfate을 포화상태가 될 때까지 magnetic bar를 회전시키며 서서히 가한다. 침전된 pilus를 원심분리(20,000xg, 30분)에 의하여 수집하고 적당량의 PBS로 부유시켜 pH를 7.0~7.2로 조절 후 5℃에 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화한 각 항원액을 각각의 선택배지에 이식하여 37°C에서 2일간 배양하여 균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

3.4.1.1. *Bordetella bronchiseptica*균 및 *Pasteurella multocida*균

불활화 전에 채취한 각 집균액을 10배 단계 희석법으로 희석하여 각 균별 제조용 배지를 사용, 균수를 측정하고 각 균별 기준수에 준하여 불활화 항원액을 원심 침전하여 상층액을 제거한 후 0.3%포르말린을 가한 생리적 식염수로 농도를 조절한다. 각 균별 1두분에 함유되는 균수는 *Bordetella bronchiseptica*균은 $3 \times 10^{10}/(0.5\text{ml})$ 개 이상, *Pasteurella multocida*균은 A 및 D 각각 $7 \times 10^9/(0.5\text{ml})$ 개 이상 되도록 조절한다. *Bordetella bronchiseptica* 및 *Pasteurella multocida* 항원에 첨가되는 수산화 알미늄 겔은 20mg/ml을 가한다.

3.4.1.2. *Erysipelothrix rhusiopathiae*균

불활화된 배양액에 P.B.S.(pH 7.2)로 희석한 수산화 알미늄 겔을 20mg/ml 되도록 첨가하고 완전히 혼합하여 항원이 Gel에 충분히 흡착되게 하고 5~10일간 정치한 후 상층액을 제거하고 전체량이 처음 배양액의 50%되게 한다.

3.4.1.3. *Escherichia coli*균

배양한 균의 불활화 전에 $1 \times 10^{10}/\text{ml}$ 되게 PBS로 농도를 조절하며, 정제된 pilus는 균형별로 K99는 말혈구, K88ab 및 K88ac 는 기니픽 혈구로 MRHA 시험을 하여 혈구 응집가가 각각 512배/50ul 이상이 되게 PBS로 조정하고 987P는 pilus 량이 15mg/ml 되게 PBS로 조절한 다음 균액 pilus의

비율이 6:4 되도록 혼합한 것을 대장균 항원으로 사용한다. 단, TSA 배양균은 불활화 전에 MRHA 시험을 실시하여 혈구응집 역가가 32배 이상인 것을 항원으로 사용한다.

3.4.2. 정제

각 항원 물질중 생체에 대한 과민성 물질을 제거코자 *Bordetella bronchiseptica* 및 *Pasteurella multocida* 의 항원과 수산화알미늄 겔(20mg/ml) 혼합액을 5°C에 정치하여 침전된 내용물과 한계가 분명한 상층액으로 분리되었을 때 상층액을 조용히 제거하고 0.3% 포르말린을 가한 생리적 식염수를 가하여 원래의 양과 동일하게 한다.

3.4.3. 항원 혼합

1두분(3ml)을 기준으로 하여 *Bordetella bronchiseptica* 항원과의 수산화알미늄 겔 첨가액 0.5ml (3×10^{10}), *Pasteurella multocida* 항원과 수산화알미늄 겔 첨가액 1.0ml (3A 및 4D 각 0.5ml 각 형별로 7×10^9), *Erysipelothrix rhusiopathiae* 항원과 수산화알미늄 겔첨가액 0.5ml *Escherichia coli* 항원 1ml(K88ab, K88ac, K99 및 987P 각각 균체와 pilus 혼합 항원 0.25ml)비율로 혼합하고 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색 또는 황갈색의 혼탁한 부유액이며 정치하면 검사품 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 용기별 내용물의 성상이 균일하고 이물이 없어야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하 이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 5마리는 0.5ml을 복강에, 5마리는 0.5ml을 피하에 접종하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 근육 및 피하에 검사품을 각 2마리씩 1ml씩을 접종하고 7일간 관찰하며 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰하고, 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 2마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 이상없이 생존하여야 하며 또한 자돈은 접종 후 1~2시간 내 과민반응이 없어야 하고 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사등의 부작용이 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 보데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)

4.5.1.1. 동물 및 실험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 20마리에는 검사품 10배 희석액을 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후 *Bordetella bronchiseptica* 10MLD₅₀/0.2ml를 각각 복강에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.1.2. 판정

검사품 접종군은 80%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.2. 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*)

4.5.2.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 70마리를 선정하여 검사품 원액, 5배 및 25배 희석액을 각각 20마리에 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강 내에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후에 *Pasteurella multocida* 100MLD₅₀/0.2ml를 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.2.2. 판정

검사품 원액 접종군은 80% 이상, 5배 희석액 접종군은 50% 이상, 25배 희석액 접종군은 20% 이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.3. 돼지단독균(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)

4.5.3.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 20마리에 검사품을 규정량의 1/10을 피하 접종하고 10마리를 대조로 한다. 14일 후 *Erysipelothrix rhusiopathiae* 100MLD₅₀/0.2ml를 각각 피하에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.3.2. 판정

검사품 접종군은 80% 이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.4. 대장균(*Escherichia coli*)

4.5.4.1. 동물 및 시험

체중 300~400g의 건강한 기니픽 15마리를 선정하여 10마리에 검사품 규정량의 1/4로 3주 간격으로 2회 근육 내에 접종하고 5마리는 대조로 한다. 2차 접종 14일 후 대조군과 함께 심장 채혈하여 혈청을 분리, 비동화한 다음 말 및 기니픽 혈구를 사용하여 K99, K88 및 F41에 대한 pilus 항체를 측정한다.

4.5.4.2. 판정

검사품 접종군의 pilus에 대한 HI 항체는 각각 256배 이상이어야 하며 대조군은 4배 이하이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

- 성돈은 1회 3ml씩을 2~3개월 간격으로 2회 접종한다.
- 임신모돈은 분만 전 30일전과 15일에 각각 3ml씩 2회 접종한다.
- 기초면역된 임신모돈은 매 분만 전 30일에 1회 접종한다.
- 자돈은 생후 3주령에 2ml, 5주령에 3ml를 접종하고 그 후에는 성돈 및 임신모돈 접종방법에 따른다.

<별첨1> Mannose-resistant hemagglutination inhibition(MRHI)시험

- 1) Mannose-resistant 혈구응집억제반응(MRHA)에 의한 항원 사용량 측정
 대장균 pilus용 U형 마이크로플레이트에서 50 μ l 용량으로 2배 단계 희석한 후 K99는 동량의 2% 말 혈구, K88, F41은 1% 기니픽 혈구를 넣어 5 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨 후 혈구응집가를 측정한다.
- 2) 혈구응집억제반응(MRHI)
 가검혈청 50 μ l를 U형 마이크로플레이트에서 PBS로 2진 희석한 후 동량의 K99, K88 및 F41 항원(4HA, 별첨 1-1.)을 각각 넣고 37 $^{\circ}$ C 30분 동안 반응시킨 후 K99항원에는 2% 말 혈구, K88, F41에는 1% 기니픽 혈구를 100 μ l씩 각각 가하여 5 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨 후 혈구응집억제가를 판독한다.
- 3) 술식은 아래와 같다.

구분	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청희석배수	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
희석액(0.5% Mannose PBS)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
혈청(A)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
혈청(B)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
4HA K99항원(A')	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
4HA K88, F41항원(B')	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
반응	37 $^{\circ}$ C 30분간											
2% 말 혈구(A'')	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 μ l
1% 기니픽 혈구(B'')	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 μ l
반응	5 $^{\circ}$ C 3시간											
판독	육안으로 혈구응집 억제가 판독											

<별첨2> 0.5% D-mannose PBS (phosphate buffered saline)

NaCl	0.8g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄	2.9g
KCl	0.2g
NaN ₃	0.2g
D.W	1,000ml
D-mannose	5.0g

pH 7.4로 조정한다.

<부 기>

부기1. 돼지 단독균 배지

Beef infusion	82.2%
Liver infusion	3.5%
Peptone	2.0%
Sodium phosphate($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	1.1%
Potassium phosphate ($\text{KH}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	0.1%
Ox-bile	0.1%

상기 조성성분을 혼합 용해하여 pH를 8.0으로 조절하고 15Lb 30분간 고압멸균한 다음 dextrose와 lactose의 최종 농도가 각각 0.5% 함유되도록 또 소 혈청을 10% 함유되도록 첨가한 후 배지의 최종 pH가 7.4~7.6이 되도록 수정하여 사용한다.

부기2. **Minca medium**

KH_2PO_4	1.36g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10.1g
Glucose	1g
Casamino acid	1g
Yeast extrast	1g
Trace salt	1ml
D.W	1000ml

pH 7.5 로 수정하여 15LB 20분 멸균한다.

돼지 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 흉막폐렴 불활화 혼합백신

Porcine *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*
Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 보데텔라 브론키셉티카, 파스튜렐라 멀토시다, 액티노바실러스 플레우로뉴 모니에를 순수배양한 균액을 불활화하여 혼합한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며, 돼지의 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 흉막폐렴의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Bordetella bronchiseptica P4주의 1상균, *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형 균주 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 혈청형 S-2 및 혈청형 S-5형의 균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. *Bordetella bronchiseptica* P4주의 1상균

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합 백신의 2.2.1에 따른다.

2.2.2. *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형 균주

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합 백신의 2.2.2에 따른다.

2.2.3. *Actinobacillus pleuropneumoniae* S-2 및 S-5형의 균주

Actinobacillus pleuropneumoniae S-2 및 S-5형의 균주는 PPLO agar에 V-factor(NAD; Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide)를 3~5 μ g/ml 첨가한 배지상에서 37 $^{\circ}$ C에서 16~18시간 배양하여 전형적인 단독집락을 선택하여 tryptic soy broth(V-factor 첨가)에 이식, 16~18시간 배양한 균액을 -80 $^{\circ}$ C이하에 동결보존 또는 동결

1-2-1-04

건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. *Bordetella bronchiseptica* P4주 I 상균

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합 백신의 2.3.1에 따른다.

2.3.2. *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형 균

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합 백신의 2.3.2에 따른다.

2.3.3. *Actinobacillus pleuropneumonia* S-2 및 S-5형의 균주

Actinobacillus pleuropneumonia S-2 및 S-5형의 균주는 초코렛 한천 배지상에서 Pin point의 집락을 나타내고 혈액배지상에서 용혈을 나타내며 협막을 형성한다. 이들 균은 그람 음성 구간균으로 마우스에 접종 시 24~48시간 내에 폐사되고 기니픽 피내에 접종했을 때 심한 괴사를 형성한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Bordetella bronchiseptica P4주는 tryptic soy agar 배지를, *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형 균주는 tryptose agar배지를, *Actinobacillus pleuropneumonia* S-2 및 S-5형 균주는 PPLO agar(V-factor 첨가배지)를 각각 룩스병 또는 플라스크에 적정량 분병 15LB에서 30분간 고압멸균하여 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

*Bordetella bronchiseptica*는 보존된 균주를 TSA배지에 이식하여 37℃에서 24시간 배양 후 집락을 선정하여 TSB배지에 이식하여 24시간 배양한 것을, *Pasteurella multocida*은 보존된 3A 및 4D형 균주를 T.A.배지에 이식하여 37℃에서 18~20시간 배양하고 집락을 선발하여 B.H.I. broth에 이식 18~20시간 배양한 것을, *Actinobacillus pleuropneumonia*균주를 PPLO agar (V-factor 첨가)에 이식하여 37℃에 16~18시간 배양하고 집락을 선택하여 tryptic soy broth (V-factor 첨가)에 이식 16~18시간 증식 배양한다.

3.2.2. 본배양

*Bordetella bronchiseptica*균은 각 룩스병에 종균액을 5ml씩 이식하고 37℃에서

48시간 배양, *Pasteurella multocida*균은 배양된 A 및 D 형 종균액을 룩스병 당 5ml씩 각각 이식하고 37℃에서 18~20시간 배양,

*Actinobacillus pleuropneumonia*균은 배양된 S-2, S-5 종균액을 룩스병에 각 5ml씩 이식하고 37℃에서 16~18시간 각각 배양한다.

3.2.3. 집균

각각의 균이 배양된 룩스병에 적당량의 멸균된 생리식염수와 초자구를 함께 넣고 흔들어 완전히 집균한다. 집균된 균액은 120목 동망 및 3겹 가제를 통과케하여 한천편을 제거한 후 균괴의 세분과 균질화를 위해 초자구를 넣은 용기에서 흔들어 진탕한다. 각 균주별로 집균액의 일부를 원액검사에 사용하고 나머지는 집균액은 항원농도를 조절한 후 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

각각의 집균된 균액 별로 포르말린을 0.3% 가하고 37℃에 3일간 정치하되 1일 3회이상 흔들어 주며 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화한 각 항원액을 각각의 선택배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

각 균별 1두분에 함유되는 균수는 *Bordetella bronchiseptica* P4균은 3×10^{10} 개 이상, *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형 균은 각각 7×10^9 개 이상, *Actinobacillus pleuropneumonia* S-2 및 S-5형 균은 각각 4×10^9 개 이상이 되도록 조절한 다음 불활화 전에 취한 각 생균액을 10배 단계 희석법으로 희

1-2-1-04

석하여 각 균별 제조용 배지를 사용, 균수를 측정하고 불활화 한 항원액을 원심 침전하여 상층액을 제거한 후 0.3% 포르말린을 가한 식염수로 농도를 조절한다.

3.4.2. 정제

각 항원물질 중 생체에 대한 과민성물질을 제거코자 상기 혼합 항원액을 5°C에 정치하여 침전된 항원의 내용물과 한계가 분명한 상층액으로 구분되었을 때 과민성 물질이 함유된 상층액을 제거하고, 0.3% 포르말린을 가한 생리식염수를 가하고 원래의 양과 동일하게 조정한다.

3.4.3. 항원혼합

규정량(2ml)를 기준으로하여 *Bordetella bronchiseptica* 16.1%, *Pasteurella multocida*(3A, 4D) 32.2%(A, D형 각각 16.1% 각형별), *Actinobacillus pleuropneumonia*(S-2, S-5) 32.2%(S-2, S-5 각각 16.1%)되게 혼합하고, 수산화알루미늄 겔을 16.1% (30mg) 첨가하여 완전한 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색 또는 황갈색의 혼탁한 부유액이며 정치하면 백신 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 용기별 내용물의 성상이 균일하고 이물이 없어야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.3%이하여야 하고, 지메로살 함유량은 0.01% 이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 5마리는 0.5ml을 복강내에 5마리는 0.5ml을 피하에 접종하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 근육 및 피하에 검사품을 각 2마리씩

1ml씩을 접종하고 7일간 관찰하고, 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 2마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종하여 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 이상이 없이 생존하여야 하며 또한 자돈은 접종 후 1~2시간 내 과민반응이 없어야 하고 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사등의 부작용이 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 보데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)

4.5.1.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 사용한다. 마우스 20마리에는 검사품 10배 희석액을 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차접종 10일 후에 *Bordetella bronchiseptica* 10LD₅₀/0.2ml을 각각 복강내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.1.2. 판정

검사품 접종군은 80%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.2. 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*)

4.5.2.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 70마리를 선정하여 사용한다. 검사품 원액, 5배 및 25배 희석액을 각각 20마리에 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강 내에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후에 *Pasteurella multocida* 100LD₅₀/0.2ml을 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.2.2. 판정

검사품 원액 접종군은 80% 이상, 5배 희석액 접종군은 50% 이상, 25배 희석액 접종군은 20% 이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사 하여야 한다.

4.5.3. 액티노바실러스 플레우로뉴모니아에 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*)

4.5.3.1. 동물 및 시험

1-2-1-04

*Actinobacillus pleuropneumoniae*에 감염되지 않은 2kg 내외의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 사용한다. 토끼 4마리에 검사품 규정량을 2주 간격으로 2회 근육 내 주사하고 2마리는 대조군으로 한다. 2차접종 14일 후에 각각 채혈하여 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 대한 혈청형별 응집반응에 의하여 항체가를 측정한다.

4.5.3.2. 판정

*Actinobacillus pleuropneumoniae*에 대한 혈청형별 응집항체가는 각각 80배 이상이어야 하며 대조군은 10배 이하이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

- 큰 돼지는 1회 2ml씩 2~3개월 간격으로 근육 내에 주사한다.
- 임신돼지는 분만 전 30일 및 15일에 각각 2ml씩 2회 주사한다. 그 후 복강 내의 접종은 매 분만 전 30일에 2ml를 1회 주사한다.
- 어린 돼지는 3주령에 1차, 5주령에 2차로 각각 1.5ml씩 근육 내에 주사한다.

돼지 대장균 불활화백신

Porcine Escherichia coli Vaccine, Inactivated

1. 정의

병원성대장균(장독소 생산 및 부착인자 보유) 배양액을 불활화한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며 자돈의 대장균감염증의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

돼지유래의 병원성대장균(K88ab, K88ac, K99 및 K987주)으로 알려진 장독소의 생산 또는 부착인자를 보유하는 균주(F41) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

동정시험과 병원성시험에서 확인된 *E. coli* 균주를 MacConkey agar등 대장균 선택배지에 이식하여 37℃에서 12~16시간 배양, *E. coli*의 전형적인 단독 집락을 선택하여 TSB(tryptic soy broth)등 증균배지에 6~8시간 계대 배양한 균액을 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

그람(gram)음성의 간균으로서 indole(+), methyl red(+) 및 Voges-Proskauer(-)의 특성이 있다. 종균에 대한 병원성 검사로서 기니픽의 피하, 근육 및 피내에 접종하여 병원성 및 독소생성을 확인한다. 또한 실험실적으로 장관독소인 LT(heat-labile toxin) 또는 ST(heat-stable toxin) 생성 유무를 확인하거나 부착인자인 섬모항원(filus antigens)을 확인하여 병원성을 검사하여야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

TSB배지에 yeast extract 0.5%, sucrose 0.5%, dextrose 0.5%를 가하여 배양액을 이용하거나 이에 준하는 증균배양액을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 증균배양

보존된 균주를 MacConkey agar 등 대장균 선택배지에 각각 균주별로 이식하여 37℃에서 12~16시간 배양 후 *E. coli*의 전형적인 단독집락을 선택하여 TSB 등 증균 배지에서 이식하여 37℃에서 6~8시간 각각 배양한다.

3.2.2. 본배양

각종 *E. coli* 증균배양액을 TSB배지에 이식하여 37℃에서 18~20시간 동안 각각 배양한다.

3.2.3. 집균

증균을 접종한 후 18~20시간 fermentor 내에서 각각 배양한 후 배양액 일부를 채취하여 원액검사에 사용하고 나머지는 항원농도 조절 후 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

집균액은 항원농도를 조절한 후 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 포르말린을 0.3%가 되게 가하여 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 한 각 항원액을 각각의 선택배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

배양이 끝난 각 균주별 배양액을 각각 10배 단계 희석하여 MacConkey agar 등 대장균 선택배지에 각 희석액별로 접종하여 균수 함량을 측정한다. 각종 *E. coli* 배양액의 균수(100억/ml개 이상)를 확인한 후 불활화 한 배양액을 필요에 따라 농축기 등을 이용, 농축 등의 과정을 통하여 균 농도를 조절한다.

3.4.2. 항원혼합

각각의 조절된 항원혼합액의 80%와 적당한 보호제(수산화알루미늄 겔 10mg/ml) 20%를 가해 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색 또는 회백색의 부유액으로서 이물질 또는 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말표본 및 배양검사 에서 대장균 성상을 가진 균 이외의 세균이 있어서는 아니된다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에서 포르말린은 0.3%이하, 지메로살은 0.01%이하, 페놀은 0.5%이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

건강하고 병원성 대장균에 감수성이 있는 체중(300~400g)의 기니픽 6마리를 선정하여 검사품 2마리는 근육에, 2마리는 피하에 각각 1ml씩 접종하여 7일간 관찰하고, 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종한 후 7일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 기니픽은 이상없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 300~400g의 건강한 기니픽 15마리를 선정하여 10마리는 접종군으로 5마리는 대조군으로 한다. 접종군 기니픽에 검사품을 규정량의 1/4를 3주간격으로 2회 근육접종하고, 2차접종 2주후 채혈하여 검사품에 사용한 균주별로 항체가를 시험관응집반응으로 측정한다. 혈중항체가 측정은 2진 희석법으로 하며 최초 희석배수를 10배로 한다.

4.5.2. 판정

검사품 접종군이 대조군에 비하여 응집항체가가 6단계 이상 차이가 있어야

1-2-1-05

한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

- 건강한 돼지의 이근부 근육에 2.0ml씩을 접종한다.
- 초임 돼지 및 처음 실시하는 모돈은 종부 3주전 늦어도 분만 6주전까지 1차 접종하고 분만 2주전에 2차 접종한다.
- 기초 면역에 된 모돈은 매 분만 2주전에 1회 접종한다.

돼지 대장균 필러스, 클로스트리듐 독소이드 불활화 혼합백신

Porcine *Escherichia coli* Pilus, *Clostridium* Toxoid Combined
Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지유래 병원성대장균(*Escherichia coli* : K88, K99, 987P 및 F41주) 및 클로스트리듐(*Clostridium perfringens* type C, β -toxoid)의 배양액을 불활화하여 혼합한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며 돼지의 대장균성 및 클로스트리듐 장염의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

대장균(*Escherichia coli*)은 돼지유래의 병원성대장균으로 알려진 각 혈청형별 *Escherichia coli* K88, K99, 987P 및 F41의 부착인자를 보유하는 균주, 클로스트리듐(*Clostridium*)균은 클로스트리듐 퍼프린젠스 type C으로 확인된 균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 대장균

동정시험과 병원성시험에서 확인된 *Escherichia coli* 균주를 MacConkey agar등 대장균 선택배지에 이식하여 37℃에서 12~16시간 배양, *Escherichia coli*의 전형적인 단독 집락을 선택하여 TSB(Tryptic soy broth)등 증균 배지에 6~8시간 계대 배양한 균액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 클로스트리듐(*Clostridium*)

동정시험으로 확인된 *Clostridium perfringens* type C의 균주를 blood agar 등에 이식하여 37℃에서 18~24시간 혐기성 배양하여 전형적인 단독 집락을 선택하여 cooked meat medium등의 선택배지에 다시 37℃에서 18~24시간

혐기성 배양한 균액을 -80°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에서 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. 대장균

그람(Gram)음성의 간균으로서 indole(+), methyl red(+) 및 voges-proskauer(-)의 특성이 있다. 종균에 대한 병원성 검사로서 기니픽의 피하, 근육 및 피내에 접종하여 병원성을 확인한다. 또한 실험실적으로 부착인자인 각각의 섬모항원을 확인함으로써 병원성을 검사할 수 있다.

2.3.2. 클로스트리듐(*Clostridium*)

그람 양성의 운동성이 없는 혐기성 아포형성 간균이며, *Clostridium perfringens* Type C의 경우 알파(alpha) 및 베타(beta) 독신을 생성한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

3.1.1. 대장균

Minca broth 배지 등 섬모항원을 활성화할 수 있는 증균배지를 사용한다.

3.1.2. 클로스트리듐(*Clostridium*)

클로스트리듐균을 선택적으로 증균할 수 있는 cooked meat medium 등의 증균 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균 배양

대장균의 각종 균주를 MacConkey agar 등 대장균 선택배지에 각각 균주별로 이식하여 37°C 에서 12~16시간 배양, *Escherichia coli*의 전형적인 단독집락을 선택하여 37°C 에서 6~8시간 Minca broth 등 증균 배지에서 계대배양하며 클로스트리듐(*Clostridium*)균은 *Clostridium perfringens* type C의 균주를 blood agar 등에 이식하여 37°C 에서 18~24시간 혐기성 배양하여 전형적인 단독 집락을 선택하여 cooked meat medium 등의 선택배지에 다시 37°C 에서 18~24시간 혐기성 배양한다.

3.2.2. 본배양

대장균은 각종 균종별로 Minca broth 배지에 종균을 접종하여 37°C 에서 18~20시간 동안 각각 배양하며 클로스트리듐(*Clostridium*)균은 cooked

meat medium 종균을 접종하여 37℃에서 18~20시간 동안 혐기적으로 배양한다.

3.2.3. 집균

각각의 종균을 접종한 후 18~20시간 fermentor내에서 각각 배양한 후 배양액을 무균적으로 집균하여 각 균주별로 집균액의 일부를 채취하여 원액검사에 사용하고 나머지는 항원 농도를 조절한 후 불활화 시킨다. 각각의 대장균은 MRHA시험(부기1,2)으로 pilus 생성 유무를 확인한 후 5℃에서 원심 분리하여 (17,000×g에서 20분간) 상층액을 버리고 균체만 집균한다.

3.2.3.1. 대장균 Pilus 분리 및 수집

수집된 균체를 본 배양 용량의 1/10(PBS, pH7.5)로 부유시켜 60℃ 20분간 열처리하여 균체로 부터 pilus를 분리시키고 이를 원심분리(17,000xg, 20분)하여 상층액만 수집한다. 수집된 상층액을 2~5℃로 유지하면서 유산암모늄(ammonium sulfate)이 포화상태가 될 때까지 magnetic bar를 회전시키면서 서서히 가한다. 침전된 pilus를 원심분리(20,000xg, 20분)하여 수집하고 적당량의 PBS로 부유시켜 7.0~7.2조절 후 5℃에 보존한다.

3.2.4. 불활화

농도조절된 각각의 배양액에 포르말린을 0.3%가 되게 가하여 실온에서 24시간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 각 항원액을 각각의 선태배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육유무를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

불활화 전에 채취한 집균액을 각각 10배 단계 희석하여 대장균 및 클로스트리듐 각각의 선택배지에 각 희석액별로 접종하여 균수 함량을 측정한다. 배양액의 균수(각종 *Escherichia coli*균은 100억개/ml이상, 클로스트리듐 toxoid 10,000IU)를 확인한 후 불활화 한 배양액을 필요에 따라 농축기 등을 이용, 농축 등의 과정을 통하여 각 항원별 농도를 조절한다. 정제된 pilus K88등은 말혈구, F41은 기니픽 혈구를 사용 MRHA 시험을 하여 MRHA가 각 256배/50ul이상 되도록 PBS에 희석하여 농도를 조절한다.

3.4.2. 항원혼합

조절된 각 항원을 동량씩 혼합한 후 항원량 40%와 적당한 보조제 60%를 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 제품 고유의 색으로 이물 또는 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량이 0.2% 이하이고, 치메로살 함유량이 0.01% 이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 5마리는 0.5ml를 복강에, 5마리는 0.5ml를 피하에 접종하여 7일간 관찰하며 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 2마리는 근육 내에, 2마리는 피하에 각각 1ml씩 접종하여 7일간 관찰하고, 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종한 후 7일간 관찰하고 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 3마리에 검사품을 규정량의

2배를 근육 내에 접종하여 1~2시간 이내에 과민 반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 이상없이 생존하여야 하며 자돈은 접종후 1~2시간 이내에 과민반응이 없어야 하며 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용이 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 300~400g의 건강한 기니픽 15마리를 선정하여 검사품을 10마리는 접종군으로 5마리는 대조군으로 한다. 접종군 기니픽에 검사품 규정량의 1/4를 3주간격으로 2회 근육접종하고, 2차접종 2주후 대조군과 함께 심장채혈하여 혈청을 분리, 비동화한 다음 말 및 기니픽 혈구를 사용하여 혈구응집 억제반응(HI test)으로 대장균 K88, K99, 987P 및 F41에 대한 pilus 항체가를 측정한다. <별첨> 그리고 체중 15~20g의 건강한 마우스 15마리를 선정하여 검사품을 10마리는 시험군으로, 5마리는 대조군으로 하고 클로스트리듐 항체음성의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 백신 규정량의 1/2를 3주 간격으로 근육접종하고 2차접종후 2주후 채혈한다. 검사품으로 면역된 토끼혈청과 클로스트리듐 퍼프린젠스 type C, β -toxoid 10Lo와 생리식염수를 동량혼합하여 실온에 1시간 잠작후 마우스 미정맥에 0.2ml씩 접종하여 24시간 후 판정한다.

4.5.2. 판정

검사품 접종군의 대장균 HI항체가는 각각 256배 이상이어야하며 대조군은 4배 이하이어야 한다. 그리고 클로스트리듐 독소이드에 대한 마우스와 토끼에 대한 시험군은 80%이상 생존하여야하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

24개월간 유효하다.

6. 사용방법

건강한 동물에만 접종하고 백신은 사용 전에 충분히 흔들어 내용액을 균일하게 하여 용법·용량에 따라 사용한다.

<별첨> 혈구응집억제반응 (mannose-resistant haemagglutination-inhibition test ; MRHI)

1) 혈구응집반응(MRHA)검사에 의한 항원사용량 측정

대장균 pilus을 U형 마이크로플레이트에서 50 μ l 용량으로 2배 단계 희석한 후 K99는 동량의 2% 말혈구, K88, F41은 1%기니픽 혈구를 넣고 5 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨후 혈구응집가를 측정한다.

2) 혈구응집억제반응(MRHI)

가검혈청 50 μ l를 U형 마이크로플레이트에서 PBS로 2배 단계 희석한 후 동량의 K99, K88 및 F41항원(4HA)를 각각 가하고, 37 $^{\circ}$ C 30분 동안 반응시킨 후 K99항원에는 2% 말혈구, K88, F41에는 1% 기니픽 혈구를 100 μ l씩 각각 넣어 5 $^{\circ}$ C에서 3시간 반응시킨 후 혈구응집억제가 판독한다.

3) 혈구응집억제가 판독 술식

구 분 \ 홀번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
혈청희석배수	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
희석액 (0.5%mannose PBS)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
혈 청(A)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
혈 청(B)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
4HA K99항원(A')	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
4HA K88 항원(B')	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50 μ l
반 응						37 $^{\circ}$ C	30 분간					
2%말 혈구(A'')	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 μ l
1%기니픽혈구(B'')	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 μ l
반 응	5 $^{\circ}$ C 3시간											
판 독	육안으로 혈구응집 억제가 판독											

<부 기>

부기1. MRHA test

배양균액을 1회 PBS로 원심 세척 후 u형 microplate에서 0.5% D-mannose 함유한 PBS 50ul와 항원 50 μ l를 2진 희석한 후 K99는 동량의 1% 말혈구, F41은 동량의 기니픽혈구를 가하고 5℃에서 3시간 반응시킨 후 혈구응집가를 측정한다.

부기2. HI Test

U형 microplate에서 0.5% D-mannose 함유된 PBS 50ul와 가검혈청 50를 2진 희석한 후 동량의 K99 및 F41 Pilus 항원(4HA)을 각각 가하고 37℃에서 30분간 감작시킨 후 K99항원에는 1% 말혈구, F41은 1% 기니픽혈구를 100ul씩 가하여 5℃에서 3시간 반응시킨 후 혈구응집 억제가를 측정한다.

돼지 마이코플라스마 폐렴 불활화백신

Porcine *Mycoplasma hyopneumoniae* Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 마이코플라스마 하이오뉴모니아 배양 균액을 불활화하여 만든 백신이며 돼지의 유행성 폐렴예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Mycoplasma hyopneumoniae J/101주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Mycoplasma 배지(부기1)에 3~5일간 단계별로 계대배양한 배양액을 -80℃ 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Friis 한천배지에 균을 접종하여 37℃에서 2주동안 배양하면서 집락형태 및 그람 염색을 실시하여 성상을 확인한다. 이 균의 집락은 mycoplasma 특유의 성상 (fried egg)을 나타내지 않고, 표면에 추상(구름모양)또는 포상의 구조를 가진 비전형적인 형상을 나타낸다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Mycoplasma 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균 배양

보존된 균주를 멸균식염수에 용해하여 mycoplasma 배지에 3~5일간 배양한 배양액을 종균으로 사용한다.

3.2.2. 본배양

배양한 종균액을 단계별로 계대배양하여 본배양배지에 접종하고 37℃에서 3~5일간 배양한다.

3.2.3. 집균

배양이 끝난 균액을 12,000g, 40분간 원심분리하여 집균하고 0.85% 멸균 생리식염수로 3회 세척한 후 원심분리한 균체를 0.85% 멸균생리식염수로 0.2~0.5 wet mg/ml되게 희석하고 -70℃에서 급속히 얼린 뒤 실온에서 녹이는 과정을 3회 반복하여 freeze-thaw 항원을 제조한다. 이 freeze-thaw 항원의 단백질농도를 측정하여 2mg/ml되게 조절한다.

3.2.4. 불활화

단백질 농도를 조절한 집균액에 0.3% formalin을 가하여 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 한 각 항원액을 선택배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

조정된 항원액과 유화제를 동량 가하며 유제액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 유성액체로서 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

1-2-1-07

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2% 이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 15마리를 선정하여 검사품을 10마리는 규정량의 1/10을 피하에 접종하고 5마리는 대조로 하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 근육 및 피하에 각 2마리씩 1ml를 접종하고, 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰하고, 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 2마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종하여 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 관찰기간동안 이상없이 생존하여야 하며 또한 자돈은 접종 후 1~2시간 내 과민반응이 없어야 하고 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용이 없이 생존해야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 항원역가시험

4.5.1.1. 재료 및 시험

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)법에 따라 표준품의 항원 역가와 비교하여 검사품의 항원역가를 검사<별첨1,2,4>한다.

4.5.1.2. 판정

검사품의 항원역가처리는 EIA/RIA immunofit ver. 3.0 software 또는 이와 동등한 프로그램을 이용하여 통계처리하며 검사품의 항원역가가 8,000RU/dose 이상이거나 RP(relative potency)가 1이상이어야 한다.

4.5.2. 항체가 시험

4.5.2.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 7일 후 검사품의 접종군과 대조군 마우스 15마리를 채혈하여 ELISA 항체가를 검사<별첨3,4>한다.

4.5.2.2. 판정

대조군의 ELISA 항체가는 10배 이하이어야 하며, 접종군은 512배 이상

이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

큰 돼지는 분만 5주전과 2주전에 각각 2ml을 근육 내에 접종하며,
어린 돼지는 생후 2령과 3주령에 각각 2ml을 근육 내에 접종한다.

1-2-1-07

**<별첨1> Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)
method for antigen detection**

- 1) Vaccine (standard, unknown, negative) 14ml를 -70℃에서 24시간 얼린 뒤 37℃에서 30분 동안 녹인다.
- 2) 1~3분간 sonication 시킨다.
- 3) Centrifuge tube(SW-41T)에 vaccine 12~12.5ml을 채운 뒤 30,000rpm으로 6시간 원심시킨다.
- 4) 원심 후 오일층을 제거하고 침전된 항원을 PBS 1.2ml에 부유시킨 뒤 4℃에서 overnight 시킨다.
- 5) 준비된 항원을 coating buffer로 2배 단계 희석하여 ELISA plate 3개의 well에 항원 희석배수 1:8부터 단계별로 100 μ l씩 분주한다. (negative 항원은 1:16 희석하여 분주하고 blank well에는 PBS 100 μ l씩 분주한다.)

술식은 다음과 같다.

구분 \ 홀번호	1	2	3	4	5
Blank (PBS)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Negative(PBS 1:16)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
항원희석배수	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128
Standard	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Sample	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l

- 6) 준비된 plate를 37℃에서 1시간 항원을 흡착시킨 후 PBS로 1~2회 세척한다.

- 7) Blocking buffer을 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 둔 뒤 washing buffer로 3~4회 세척한다.
- 8) *Mycoplasma hyopneumoniae* monoclonal antibody 또는 특이 항혈청을 blocking buffer로 1:1,000으로 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
- 9) Washing buffer로 3~5회 씻어내고 적당하게 blocking buffer로 희석한 conjugate를 각 well에 100 μ l씩 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C에 1시간 둔다.
- 10) Washing buffer로 3~5회 씻어낸 뒤 100 μ l substrate를 각 well에 분주하고 실온에서 30분간 정치시키고 stopping buffer로 반응을 중지시킨 뒤 흡광도(OD)를 측정한다.
- 11) 측정된 OD값을 EIA/RIA immunofit ver. 1.0 software로 통계처리하여 항원 역가가 8,000RU/dose 이상이어야 한다.

<별첨2> Capture ELISA method for antigen detection

- 1) Vaccine (standard, unknown, negative) 0.3ml를 -70 $^{\circ}$ C에서 24시간 얼린 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 녹인다.
- 2) 여기에 0.3ml PBS -0.25% triton X-100을 넣고 25 $^{\circ}$ C에서 16~18시간동안 혼합한다.
- 3) 처리된 검사품 0.5ml에 0.5ml Blocking buffer을 넣고 1~3분간 sonication 시켜 항원을 준비한다. (항원희석배수 1:4)
- 4) 정제된 *Mycoplasma hyopneumoniae* anti-rabbit serum(IgG)을 coating buffer로 1:5000 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주한다.
- 5) Plate를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 항체를 흡착시킨 후 PBS로 1~3회 세척한다.
- 6) Blocking buffer을 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 둔 뒤 washing buffer로 3~4회 세척한다.
- 7) 준비된 항원을 blocking buffer로 2진 희석하여 ELISA plate 3개의 well에 희석 단계별로 100 μ l씩 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 1~2시간 반응시킨다. (negative 항원은 1:16 희석하여 분주하고 blank well에는 blocking buffer 100 μ l씩 분주한다.)

술식은 다음과 같다.

1-2-1-07

구분 \ 홀번호	1	2	3	4	5	6
Blank(Blocking buffer)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Negative (1 : 16)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
항원희석배수	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	1 : 128
Standard (Reference)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
Sample(공시백신)	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l

- 8) Washing buffer로 3~5회 씻어내고 100 μ l *Mycoplasma hyopneumoniae* anti-rabbit HRP Conjugate를 Blocking Buffer로 1:500 희석하여 각 well에 분주한 뒤 37°C에 1시간 둔다.
- 9) Washing buffer로 3~5회 씻어낸 뒤 100 μ l Substrate를 각 well에 분주하고 실온에서 30분간 정치시키고 Stopping Buffer로 반응을 정지시킨 후 흡광도(OD)를 측정한다.
- 10) 측정된 OD값을 USDA Rel Po ver. 3.0 software로 통계 처리하여 항원역가가 RP(relative potency) 1 이상이어야 한다.

<별첨3> ELISA method for antibody detection

- 1) *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA용 항원을 Coating Buffer에 희석하여 100 μ l씩 ELISA plate에 분주한 뒤 37°C에서 30분간 흡착시킨 뒤 4°C에서 overnight 시킨다.
- 2) 항원이 흡착된 ELISA plate를 실온에 30분 둔 뒤 PBS로 3회 씻어낸다.
- 3) 100 μ l씩 blocking buffer를 모든 well에 분주한 뒤 37°C 1시간 둔다.
- 4) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 5) PBS로 100 μ l를 각 plate well에 분주한 뒤 A well은 blank well, B와 C의 첫 well에 음성혈청과 양성혈청을 100 μ l씩 분주하여 2배에서 1024배까지 2진 희석하고 D well부터는 sample 혈청을 같은 방법으로 2배에서 1024배까지 2진 희석한다.

- 6) ELISA plate를 125rpm/1~3분 shaking 시킨 뒤 37℃에서 1시간 둔다.
- 7) Washing buffer로 3회 씻어내고 blocking buffer로 100배 희석된 anti-mouse IgG conjugate를 100 μ l씩 분주한 뒤 37℃에 1시간 둔다.
- 8) Washing buffer로 3회 씻어낸 뒤 100 μ l substrate을 각 well에 분주하여 실온에서 30분 정도 정치시킨후 stopping buffer로 반응을 중지시키고 각 well의 OD를 측정한다.

<별첨4> Buffer

- 1) Phosphate buffered saline : PBS (pH 7.4)

NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	2.9g
KCl	0.2g
NaN ₃	0.2g
D.W	1,000ml
- 2) Washing buffer : PBS-tween 20 (pH 7.4)

Tween 20	500ml
PBS	1,000ml
- 3) Coating buffer : 0.1M carbonate buffer (pH 9.6)

1M NaHCO ₃	50.9ml
1M Na ₂ CO ₃ , 10H ₂ O	16.3ml
D.W	933ml
- 4) Blocking buffer : PBS + 1~2% BSA

Bovine serum albumin(BSA)	1~2g
PBS	100ml
- 5) Conjugate : peroxidase 또는 alkaline phosphatase
 시험에 적합한 conjugate을 알맞게 희석하여 사용한다.
- 6) Substrate : OPD(492nm), ABTS(405nm) 또는 diethanolamine(405nm)
 시험에 적합한 substrate을 각각 용법에 맞게 제조하여 사용한다.
- 7) Stoppong buffer : 2.5M H₂SO₄, 1M HCl 또는 3M NaOH

<부 기>

부기1. Mycoplasma 배지

Hank's balanced buffered saline, 10X	50ml
Brain heart infusion broth	8.2g
PPLO broth	8.7g
Lactalbumin hydrolysate	2.0g
Yeast extract	4.5g
Phenol red(0.2%)	10ml
D.W	1,200ml
pH 7.8로 조정하여 고압멸균한 후	
무균적으로 다음 supplement를 첨가한다.	
Fresh yeast extract(Baker's yeast type II, 25%)	60ml
Glucose(25%)	7.5g
Thallium acetate(1%)	25ml
Calf thymus DNA(1%)	15ml
Equine serum	100ml
Porcine serum	100ml

돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신

Porcine Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida type D,
Pasteurella multocida type D Toxoid Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 보데텔라 브론키셉티카, 파스튜렐라 멀토시다 균을 순수배양하여 얻은 균액을 불활화하고 파스튜렐라독소이드를 혼합한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며, 돼지의 위축성 비염 및 파스튜렐라 페렴의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Bordetella bronchiseptica P4주의 1상균, *Pasteurella multocida* 4D형 균주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. *Bordetella bronchiseptica* P4주의 1상균

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합백신의 2.2.1에 따른다.

2.2.2. *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형균주

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합백신의 2.2.2에 따른다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. *Bordetella bronchiseptica* P4주의 1상균

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합백신의 2.3.1에 따른다.

2.3.2. *Pasteurella multocida* 4D형의 균주

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합백신의 2.3.2에 따른다.

3. 제조방법

1-2-1-08

3.1. 제조용 배지

Bordetella bronchiseptica 및 *Pasteurella multocida*균은 BGBA배지, tryptose broth(TB)배지, TA배지 및 TSB배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

*Bordetella bronchiseptica*균주는 bordot gengou blood agar(BGBA, 5% sheep blood)배지에 이식하여 37℃에서 18~24시간 배양하여 *Bordetella bronchiseptica*균의 전형적인 단독집락을 선택하여 TB배지에 계대 배양하며, *Pasteurella multocida*균주는 TA배지에 이식한 후 37℃에서 18~24시간 배양하여 *Pasteurella multocida*균의 전형적인 단독집락을 선택하여 Tryptose TB배지에 이식하고 37℃에서 18~24시간 계대 배양한다.

3.2.2. 본배양

Bordetella bronchiseptica 종균을 TB배지에 yeast extract 0.5%, sucrose 0.5%를 가한 배지에 배지량의 2.5%를 접종하여 37℃에서 150rpm으로 교반하면서 12~15시간 fermenter내에서 배양한다.

*Bordetella bronchiseptica*종균은 TB에서 yeast extract 0.5%, sucrose 5%를 가한 배지에 배지량의 2.5%를 접종하여 37℃에서 150 rpm으로 교반하면서 8~10시간 fermenter내에서 배양한다.

3.2.3. 집균

각각의 배양된 균액은 일부를 원액 검사에 사용하고 나머지는 항원농도를 조절한 후 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

각각의 집균된 균별로 포르말린을 0.3%되게 가하여 실온에서 24시간 불활화한다.

3.2.5. *Pasteurella multocida*균의 cDNT제조

3.2.5.1. cDNT의 분리

배양 집균된 *Pasteurella multocida*균의 균체를 적당량 PBS로 부유시켜 190watts로 3분동작, 1분 cooling하면서 15분간 초음파 처리한다.(Fisher Scientific Co. Model Sonic Dismembrator 550) 처리된 *Pasteurella*

multocida 균액을 8,000rpm에서 25분간 원심하여 상층액을 cDNT를 함유한 항원 원액으로 한다.

3.2.5.2. cDNT 단백질량 측정

Bradford assay를 이용해 처리된 단백질(toxin)의 OMP(outer membrane protein)의량은 $30\mu\text{g}/\text{ml}$, cDNT의량은 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 되게 한다.

3.2.5.3. cDNT의 불활화

원심분리한 상층액의 toxin 불활화는 포르말린을 0.3%되게 첨가하여 37°C에서 3일간 흔들면서 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 각 항원액을 각각의 선택배지에 각 균주별로 이식하여 37°C에서 2일간 배양하여 균의 발육유무를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니 된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

1두분(2ml)를 기준으로 *Bordetella bronchiseptica* 사균체는 $5.22 \times 10^9 \text{cfu}$, (항원 OD@1.2 410nm)

Pasteurella multocida 사균체는 $1.6 \times 10^9 \text{cfu}$, (항원 OD@1.2 410nm),
Pasteurella multocida D형 toxoid, 175 RU ($250\mu\text{g}$) 이상 되게 각 항원의 농도를 조절한다.

3.4.2. 항원혼합

조절된 항원을 규정 항원량이 되게 혼합한 후, 보호제(수산화 알루미늄겔

20mg/ml)를 적당량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 회백색의 부유액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.3% 이하이어야 하며, thimerosal은 0.02% 이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 5마리는 0.3ml를 복강 내에, 5마리는 0.3ml를 피하에 각각 접종하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 근육 및 피하에 각각 2마리에 1ml씩을 접종하고, 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰하고 또한 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 2마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종하여 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 이상없이 생존하여야하며 또한 어린 돼지는 과민반응이 없어야 하고 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용이 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. *Bordetella bronchiseptica*

4.5.1.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 사용한다. 마우스 20마리는 검사품 10배 희석액을 규정량의 1/10로 하여 2주 간격으로 2회 복강 내에

접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일후 *Bordetella bronchiseptica* 10LD₅₀/0.2ml을 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.1.2. 판정

검사품 접종군은 80%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.2. *Pasteurella multocida* type D

4.5.2.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 70마리를 선정하여 검사품 원액, 5배 및 25배 희석액을 각각 20마리에 규정량의 1/10로 2주간격으로 2회 복강내에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후에 *Pasteurella multocida* D type 을 100LD₅₀/0.2ml을 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.2.2. 판정

검사품의 원액 접종군은 80%이상, 5배 희석액 접종군은 50%이상, 25배 희석액 접종군은 20%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.3. *Pasteurella multocida*

4.5.3.1. 동물 및 시험

*Pasteurella multocida*에 대한 항체 음성인 2kg의 건강한 토끼 10마리를 사용한다. 토끼는 2주 간격으로 검사품을 규정량의 1/2을 근육으로 2회 접종하며 2차 접종 2주 후에 채혈하여 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법으로 항체가를 측정한다.

4.5.3.2. 판정

검사품의 접종전 *Pasteurella multocida* toxoid에 대한 토끼의 ELISA 항체가는 8배 이하이며 검사품 접종 후는 토끼의 ELISA 항체가는 128배 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

18개월간 유효하다.

6. 사용방법

- 기초접종은 6개월령 이상의 건강한 임신돼지에 분만 6주전과 2주전에 2ml씩을 근육 내에 접종한다.
- 재접종은 분만 2주전에 2ml씩을 근육 내에 접종한다.

<부 기>

부기1. *Bordetella bronchseptica* 증식용 배지

Yeast extract	15g
Sodium L-glutamate	20g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	30~40g
Riboflavin	0.02g
Soluble starch	2g
D.W	1,000ml

pH 7.3~7.5로 수정하여 고압멸균한다.

부기2. *Pasteurella multocida* 증식용 배지

Brean heart infusion	18.5g
Tryptose phosphate broth	14.8g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	19.1g
KH ₂ HPO ₄	0.18g
D.W	1,000ml

pH 7.0~7.2로 수정하여 고압멸균한다.

돼지 위축성비염, 위축성비염 독소이드, 파스튜렐라페렴, 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신

Porcine Bordetella bronchiseptica, Bordetella bronchiseptica
Toxoid, Pasteurella multocida type D, Pasteurella multocida
type D Toxoid Combined Vaccine, Inactivate

1. 정의

돼지 보데텔라 브론키셉티카 및 파스튜렐라 멀토시다 균을 순수배양하여 얻은 균액을 불활화하고 위축성비염 독소이드, 파스튜렐라 독소이드 혼합한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며, 돼지의 위축성비염 및 파스튜렐라 페렴의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

1-2-1-08의 돼지 위축성비염 · 파스튜렐라페렴 · 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.1에 따른다.

2.2. 계대 및 보존

1-2-1-08의 돼지 위축성비염 · 파스튜렐라페렴 · 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.2에 따른다.

2.3. 성상 및 독력

2.3.1. *Bordetella bronchiseptica*

1-2-1-08의 돼지 위축성비염 · 파스튜렐라페렴 · 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.3.1에 따른다.

2.3.2. *Pasteurella multocida*

1-2-1-08의 돼지 위축성비염 · 파스튜렐라페렴 · 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.3.2에 따른다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

1-2-1-09

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 3.1에 따른다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.2. 본배양

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.2.2에 따른다.

3.2.3. 집균

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.2.3에 따른다.

3.2.4. 불활화

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.2.4에 따른다.

3.2.5. *Bordetella bronchiseptica* 및 *Pasteurella multocida*균의 cDNT제조

3.2.5.1. cDNT분리

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 3.2.5.1에 따른다.

3.2.5.2. cDNT 단백질량 측정

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 3.2.5.2에 따른다.

3.2.5.3. cDNT의 불활화

1-2-1-08의 돼지 위축성비염·파스튜렐라페염·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 3.2.5.3에 따른다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 각 항원액을 각각의 선태배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육유무를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

균체 및 독소이드의 농도는 1ml중에 *Bordetella bronchiseptica* 사균체와 *Pasteurella multocida* D type 사균체 항원은 각각 410nm에서 흡광도 1.2로 조정하며, *Bordetella bronchiseptica* cDNT(Crude dermonecrotic toxin)와 *Pasteurella multocida* D type cDNT는 각각 250 μ g되게 첨가한다.

3.4.2. 항원혼합

조절된 항원을 규정항원량이 되게 혼합하고 1ml당 thimerosal은 2mg이하, formalin은 0.03ml이하로 첨가하고 Al(OH)₃Gel을 100mg, ISA 25를 0.3ml 첨가하여 3시간이상 잘 흔들어서 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따라 회백색의 부유액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2% 이하이어야 하며, thimerosal은 0.02% 이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 5마리는 0.3ml를 복강 내에, 5마리는 0.3ml를 피하에 접종하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 근육 및 피하에 각각 2마리씩 1ml씩을 접종하고, 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰하고 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 2마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종하여 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 이상없이 생존하여야 하며 또한 어린 돼지는 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응이 없어야 하고 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사등의 부작용이 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. *Bordetella bronchiseptica*

4.5.1.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 사용한다.

마우스 20마리는 검사품의 10배 희석액을 규정량의 1/10로 하여 2주간격으로 2회 복강 내에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차접종 10일후 *Bordetella bronchiseptica* 10LD₅₀/0.2ml을 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.1.2. 판정

검사품의 접종군은 80%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.2. *Pasteurella multocida* type D

4.5.2.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 70마리를 선정하여 사용한다. 검사품의 원액, 5배 및 25배 희석액을 각각 20마리에 규정량의 1/10로 2주간격으로 2회 복강 내에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차접종 10일 후에 *Pasteurella multocida* D type을 100LD₅₀/0.2ml을 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.2.2. 판정

검사품의 원액 접종군은 80%이상, 5배 희석액 접종군은 50%이상, 25배 희석액 접종군은 20%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야

한다.

4.5.3. 보데텔라 독소이드, 파스튜렐라 독소이드

4.5.3.1. 동물 및 시험

*Bordetella bronchiseptica*와 *Pasteurella multocida*에 대한 항체 음성인 2kg의 토끼 10마리를 선정하여 2주 간격으로 검사품을 규정량의 1/2을 근육 내에 2회 접종하며 2차접종 2주 후에 채혈하여 ELISA(enzyme linked immunosorbent assay)법으로 항체가를 측정한다.

4.5.3.2. 판정

검사품의 접종전 *Bordetella bronchiseptica* toxoid와 *Pasteurella multocida* toxoid에 대한 ELISA항체가는 8배이하이며 검사품의 접종후는 ELISA항체가가 *Bordetella bronchiseptica* toxoid는 256배, *Pasteurella multocida* toxoid는 128배 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

- 어린돼지는 생후 3주에 1.5ml, 5주에 1.5ml를 근육내에 접종하며 그 후에는 숫 돼지 후보돼지의 접종방법에 따른다.
- 후보돼지는 분만 4~5주 및 2~3주전에 2ml씩 2회 근육 내에 접종한다. 경산돼지는 매 분만 3~4주전에 2ml씩 추가접종한다.
- 숫 돼지는 선발직후 1회 2ml씩 2주 간격으로 2회 근육 내에 접종하고 6개월마다 추가 접종한다.

**돼지 위축성비염, 위축성비염 독소이드,
파스튜렐라 폐렴, 파스튜렐라 독소이드,
홍막폐렴, 홍막폐렴 독소이드, 헤모필루스 폐렴,
마이코플라스마 폐렴 불활화 혼합백신**

Porcine Atrophic Rhinitis, Atrophic Rinitis Toxoid, Pasteurella pneumoniae, Pasteurella Toxoid, Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus pleuropneumoniae Toxoid, Haemophilus pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 유래 보데텔라 브론키셉티카 (*Bordetella bronchiseptica*), 파스튜렐라 멀토시다 (*Pasteurella multocida*), 액티노바실러스 플레우로뉴모니아 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*), 헤모필루스 파라수이스 (*Haemophilus parasuis*), 마이코플라스마 하이오뉴모니아 (*Mycoplasma hyopneumoniae*)균을 순수배양하여 얻은 균액을 불활화하고 위축성비염 독소이드, 파스튜렐라 독소이드, 홍막폐렴 독소이드를 혼합한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며 돼지의 위축성비염, 파스튜렐라 폐렴, 홍막폐렴, 헤모필루스 폐렴, 마이코플라스마 폐렴의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Bordetella bronchiseptica P4주, *Pasteurella multocida* type A, type D, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2, serotype 5, *Haemophilus parasuis* serotype 4, serotype 5, *Mycoplasma hyopneumoniae*균 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 면역원성을 가졌다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. *Bordetella bronchiseptica*

1-2-1-08 돼지 위축성비염 · 파스튜렐라폐렴 · 파스튜렐라 독소이드 불활화 혼

합백신의 2.2에 따른다.

2.2.2. *Pasteurella multocida* type A, type D

1-2-1-08 돼지 위축성비염·파스튜렐라페렴·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.2에 따른다.

2.2.3. *Actinobacillus pleuropneumoniae* S-2 및 S-5형의 균주

1-2-1-04 돼지 위축성비염, 파스튜렐라페렴, 흉막페렴 불활화 혼합백신의 2.2.3에 따른다.

2.2.4. *Haemophilus parasuis*

Haemophilus parasuis serotype 4, serotype 5는 PPLO agar에서 V factor (NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, Merck) 3~5 ug/ml 첨가한 배지 또는 이와 동등한 배지상에서 *Haemophilus parasuis* 전형적인 단독 집락을 선택하여 V factor (NAD: nicotinamide adenine dinucleotide) 3~5 ug/ml 첨가한 tryptic soy broth (TSB) 배지 또는 이와 동등한 배지에 계대 배양한 배양액을 -80℃ 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.2.5. *Mycoplasma hyopneumoniae*

1-2-1-07 돼지 마이코플라스마성 폐렴 불활화 백신의 2.2에 따른다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. *Bordetella bronchiseptica*

1-2-1-08 돼지 위축성비염·파스튜렐라페렴·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.3.2에 따른다.

2.3.2. *Pasteurella multocida* type A, type D

1-2-1-08 돼지 위축성비염·파스튜렐라페렴·파스튜렐라 독소이드 불활화 혼합백신의 2.3.2에 따른다

2.3.3. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

1-2-1-04 돼지 위축성비염·파스튜렐라 페렴·흉막페렴 불활화 혼합백신의 2.3.2에 따른다

2.3.4. *Haemophilus parasuis*

운동성이 있으며 카타라제(catalase)양성, 옥시다제(oxidase)음성, glucose에서

1-2-1-10

산을 생산하며 질산염 환원성(nitrate reduction)을 가지며 chocolate agar에서 잘 자라나 MacConkey agar에서는 잘 자라지 않는다. 배양시 V factor(nicotinamide adenine dinucleotide: NAD)를 요구하며 *Staphylococcus species*가 존재 시 그 주위를 중심으로 별모양(Srellitism)으로 자라는 것이 특징이다.

2.3.5. *Mycoplasma hyopneumoniae*

1-2-1-07 돼지 마이코플라스마성 폐렴 불활화 백신의2.3에 따른다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Bordetella bronchiseptica, *Pasteurella multocida* type A, type D는 tryptose agar, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*는 PPLO agar에서 V factor (NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, Merck) 3~5 ug/ml 첨가한 배지, *Mycoplasma hyopneumoniae*는 FF medium 또는 이와 동등한 배지를 각각 제조용 배지로 사용한다. 균의 배양에 사용하는 배지에는 돼지에 고도의 알러지 현상을 일으킬 우려가 있는 것을 사용하여서는 아니된다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 균주를 *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* type A, type D는 tryptose agar, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*는 PPLO agar에서 V factor (NAD: nicotinamide adenine dinucleotide)3~5ug/ml 첨가한 배지, *Mycoplasma hyopneumoniae*는 FF medium 또는 이와 동등한 배지에 이식하여 37℃에서 18~20시간 배양하고 집락을 선별하여 *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* type A, type D는 Brain Heart infusion broth, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*는 PPLO broth에서 V factor (NAD: nicotinamide adenine dinucleotide) 3~5ug/ml 첨가한 배지, *Mycoplasma hyopneumoniae*는 FF medium 또는 이와 동등한 배지에 이식하여 18~20시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

본 배양용 배지는 각 해당균 별로 제조용 배지를 이용하여 37℃에서 18~20시간 배양한다.

3.2.3. 집균

각각의 배양액을 원심 침전하여 배양된 균을 수집한다. 집균액의 일부를 채취하여 원액검사에 사용하며, 나머지는 항원농도조절 후 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

집균된 원액을 항원농도 조절 후 포르말린을 0.3% 가하고 37°C에서 3일간 정치하되 1일 3회 이상 잘 흔들어주며 불활화 시킨다.

3.2.5. *Bordetella bronchiseptica* toxoid, *Pasteurella multocida* toxoid 및 *Actinobacillus pleuropneumonia* toxoid제조

각각의 균주를 혈액배지에 37°C, 24시간 배양한다. 배양된 집락을 BHI broth 10ml씩을 6부 시험관에 접종하여 37°C, 24시간 진탕배양 후 이를 1 liter 0.5% yeast extract 첨가된 BHI broth에 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양한 후, 멸균된 0.1M PBS(pH 7.2)로 원심하여(16Ti로 10,000 rpm, 30분, 4°C)균을 수집한다. 수집된 균체를 초음파분쇄기(Sonic & Material Inc.)를 이용하여 50 mHz로 10분간 처리하여 균체를 분쇄한다. 분쇄액을 초원심분리기를 이용하여 28Ti로 20,000rpm에서 60분간 처리한 후 상층액을 추출한 다음, BCA protein assay kit (Pierce BCA kit No. 23209)로 단백질량을 측정 한 후 마우스 또는 기니픽을 이용하여 독신(crude dermonecrotic toxin)의 활성을 확인한다. 독소이드화는 준비된 독신액에 포르말린이 0.3%되게 처리하여 37°C 항온실에서 96시간 반응시켜 마우스와 기니픽 접종시험을 통하여 독소이드화를 확인한 후 항원으로 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.5.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 각 항원액을 혈액배지에 이식하여 37°C에서 3일간 배양하여 균의 발육유무를 확인한다.

3.5.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.4. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법에 IV-7에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

각 균별 불활화 항원액을 원심침전하여 상층액을 제거하고, 0.3% 포르말린가 식염수로 규정량(1두분)기준으로 불활화된 *Bordetella bronchiseptica* 균체항원 OD 1.2(410nm), 1.5×10^{10} 개, *Pasteurella multocida* D type 균체항원 OD 1.2(410nm), 1.5×10^{10} 개, *Pasteurella multocida* A type 균체항원 OD 1.2(410nm), 1.5×10^{10} 개, *Bordetella bronchiseptica* 독소이드 항원, 500 μ g, *Pasteurella multocida* D type 독소이드 항원, 500 μ g, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2 type 균체항원, OD 1.2(410nm), 1.0×10^{10} 개, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 5 type 균체항원, OD 1.2(410nm), 1.0×10^{10} 개, *Actinobacillus pleuropneumoniae* 2,5 type 독소이드 항원, 10 μ g, *Haemophilus parasuis* 4 type 균체항원, OD 0.5(410nm), 4.0×10^9 개, *Haemophilus parasuis* 5 type 균체항원, OD 0.5(410nm), 4.0×10^9 개, *Mycoplasma hyopneumoniae* 균체항원, OD 0.1(410nm), 2.0×10^8 개가 되게 각각 항원 농도를 조정한다.

3.4.2. 정제

항원 물질 중 생체에 대한 과민성 물질을 제거하고자 상기 혼합백신을 5℃에 정치하여 침전된 백신 내용물과 한계가 분명한 상층액으로 구분되었을 때, 과민성 물질이 함유된 상층액을 조용히 제거하고 0.3% 포르말린과 생리적 식염수를 가하여 원래의 양과 동일하게 조정한다.

3.4.3. 항원혼합

조정된 각각의 항원을 규정량이 되게 혼합하고 수산화알루미늄젤을 18%되게 첨가하여 완전한 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 회백색의 부유액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.3% 이하이어야 하며, thimerosal은 0.01% 이하이어야 한다.

4.4. 안전 시험

4.4.1. 동물 및 실험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 5마리는 0.5ml를 복강에 5마리는 0.5ml를 피하에 접종하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 근육 및 피하에 각 2마리씩 1ml를 접종하여 7일간 관찰하며 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰하고 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 3마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종하여 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 이상 없이 생존하여야 하며 또한 자돈은 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응이 없어야하고 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용 없이 생존하여야한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. *Bordetella bronchiseptica*

4.5.1.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 20마리에는 검사품 10배 희석액을 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강 내에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후 *Bordetella bronchiseptica* 10MLD₅₀/0.2ml를 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.1.2. 판정

검사품 접종군은 80%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.2. *Pasteurella multocida*

4.5.2.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 70마리를 선정하여 검사품 원액, 5배 및 25배 희석액을 각각 20마리에 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강 내에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후에 *Pasteurella multocida* 100MLD₅₀/0.2ml를 각각 복강 내에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.2.2. 판정

검사품 원액 접종군은 80% 이상, 5배 희석액 접종군은 50% 이상, 25배 희석액 접종군은 20% 이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.3. *Bordetella bronchiseptica* toxoid, *Pasteurella multocida* toxoid

4.5.3.1. 동물 및 시험

Bordetella bronchiseptica, *Pasteurella multocida*에 대해 항체 음성인 2kg의 토끼 10마리를 선정하여 2주 간격으로 검사품을 돼지 1두분 용량의 1/2을 근육 내에 2회 접종하고 2차 접종 2주후에 채혈하여 ELISA법<별첨 1,2,6 >에 의하여 *Bordetella bronchiseptica* toxoid와 *Pasteurella multocida* toxoid에 대한 항체가를 측정한다.

4.5.3.2. 판정

검사품 접종 전 *Bordetella bronchiseptica* toxoid와 *Pasteurella multocida* toxoid에 대한 ELISA 항체가는 8배 이하이어야 하고 검사품 접종 후 ELISA 항체가가 *Bordetella bronchiseptica* toxoid는 256배, *Pasteurella multocida* toxoid는 128배 이상이어야 한다.

4.5.4. *Actinobacillus pleuropneumoniae* bacterin 및 toxoid

4.5.4.1. 동물 및 시험

*Actinobacillus pleuropneumoniae*에 감염되지 않은 2 kg의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 4마리에 검사품을 돼지 1두분 용량을 2주 간격으로 2회 근육 내에 접종하고 2마리는 대조군으로 한다. 2차접종 2주후에 각각 채혈하여 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 대한 혈청혈 별 항체가를 응집반응에 의하여 측정하고 독소이드에 대한 항체가는 ELISA<별첨 3,6>법으로 측정한다.

4.5.4.2. 판정

각 혈청혈별 응집항체가는 80배 이상이어야 하며, 대조군은 10배이하이어야 한다. 특소이드에 대한 ELISA 항체가는 각각 320배 이상이어야 하며, 대조군은 10배 이하이어야 한다.

4.5.5. *Haemophilus parasuis*

4.5.5.1. 동물 및 시험

Haemophilus parasuis 음성인 체중 300~400 g의 건강한 기니픽 15마리를 선정하여 기니픽 10마리에 검사품을 돼지 1두분 용량의 1/4를 2주 간격으로 2회 피하 접종하고 기니픽 5마리는 대조로 두며 2차 접종 2주 후에 채혈하여 ELISA법<별첨 4, 6>으로 항체가를 측정한다.

4.5.5.2. 판정

Rel Pot 3.0 Software(NVSL relative potency calculation program SAM318)를 이용하여 통계처리하며 표준품(reference bacterin)에 대한 검사품의 RP(relative potency)값이 1.0 이상이어야 한다.

4.5.6. *Mycoplasma hyopneumoniae*

4.5.6.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 마우스 15마리를 선정하여 마우스 10마리는 검사품을 돼지 1두분 용량의 1/10을 피하에 접종하고 5마리는 대조로 두며 2주 후에 채혈하여 ELISA 항체가<별첨 5, 6 참조>를 검사한다.

4.5.6.2. 판정

대조군의 ELISA 항체가는 10배 이하이어야 하며 접종군은 512배 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

24개월간 유효하다.

6. 사용방법

자돈은 3~4주령에 1.5ml 근육접종, 2주 후에 2.0 ml을 보강접종한다.

기초 면역된 모돈은 분만 4~5주 전 1차 접종, 분만 2~3주전 2차 접종하고 기초면역이 되지 않은 모돈은 분만 전 30일과 15일에 접종하며, 이근부 근육 내에 2.0ml를 접종한다.

<별첨 1> ELISA for *Bordetella bronchiseptica* toxoid antibody detection

- 1) *Bordetella bronchiseptica* toxin 항원을 coating buffer에 100ng/ml로 희석하여 100 μ l씩 ELISA plate에 분주하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 흡착시킨 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨다.
- 2) 항원이 흡착된 ELISA plate를 실온에 30분 둔 뒤 PBS로 3회 씻어낸다.
- 3) 100 μ l씩 blocking buffer를 모든 well에 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C 1시간 둔다.
- 4) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 5) PBS로 100 μ l를 각 plate well에 분주한 뒤 A well은 blank well, B와 C의 첫 well에 음성혈청과 양성혈청을 100 μ l씩 분주하여 2배에서 1,024배까지 2진 희석하고 D well부터는 sample혈청을 같은 방법으로 2배에서 1,024배까지 2진 희석한다.
- 6) ELISA plate를 125rpm/1~3분 shaking시킨 뒤 37 $^{\circ}$ C에 1시간 둔다.
- 7) washing buffer로 3회 씻어내고 blocking buffer로 적당히 희석된 anti-rabbit IgG HRP conjugate를 100 μ l씩 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C에 30분간 둔다.
- 8) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 9) 100 μ l OPD substrate를 각 well에 분주하여 실온에서 15분 정치시킨다.
- 10) 50 μ l의 stopping buffer로 반응을 중지시키고 각 well의 흡광도(OD)를 492nm에서 측정한다.

<별첨 2> ELISA for *Pasteurella multocida* toxoid antibody detection

- 1) *Pasteurella multocida*(type D) toxin 항원을 coating buffer에 100ng/ml로 희석하여 100 μ l씩 ELISA plate에 분주하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 흡착시킨 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨다.
- 2) 항원이 흡착된 ELISA plate를 실온에 30분 둔 뒤 PBS로 3회 씻어낸다.
- 3) 100 μ l씩 blocking buffer를 모든 well에 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C 1시간 둔다.
- 4) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 5) PBS로 100 μ l를 각 plate well에 분주한 뒤 A well은 blank well, B와 C의 첫 well에 음성혈청과 양성혈청을 100 μ l씩 분주하여 2배에서 1024배까지 2진 희석하고 D well부터는 sample혈청을 같은 방법으로 2배에서 1024배까지 2진 희석한다.
- 6) ELISA plate를 125rpm/1~3분 shaking시킨 뒤 37 $^{\circ}$ C에 1시간 둔다.

- 7) Washing buffer로 3회 씻어내고 blocking buffer로 적당히 희석된 anti-rabbit IgG HRP conjugate를 100 μ l씩 분주한 뒤 37°C에 30분간 둔다.
- 8) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 9) 100 μ l OPD substrate를 각 well에 분주하여 실온에서 15분 정치시킨다.
- 10) 50 μ l의 stopping buffer로 반응을 중지시키고 각 well의 흡광도(OD)를 492nm에서 측정한다.

<별첨 3> ELISA for *Actinobacillus pleuropneumoniae* toxoid antibody detection

- 1) *Actinobacillus pleuropneumoniae* toxin 항원을 coating buffer에 100ng/ml로 희석하여 100 μ l씩 ELISA plate에 분주하고, 37°C에서 30분간 흡착시킨 뒤 4°C에서 overnight 시킨다.
- 2) 항원이 흡착된 ELISA plate를 실온에 30분 둔 뒤 PBS로 3회 씻어낸다.
- 3) 100 μ l씩 blocking buffer를 모든 well에 분주한 뒤 37°C 1시간 둔다.
- 4) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 5) PBS로 100 μ l를 각 plate well에 분주한 뒤 A well은 blank well, B와 C의 첫 well에 음성혈청과 양성혈청을 100 μ l씩 분주하여 2배에서 1024배까지 2진 희석하고 D well부터는 sample혈청을 같은 방법으로 2배에서 1024배까지 2진 희석한다.
- 6) ELISA plate를 125rpm/1~3분 shaking시킨 뒤 37°C에 1시간 둔다.
- 7) Washing buffer로 3회 씻어내고 blocking buffer로 적당히 희석된 anti-rabbit IgG HRP conjugate를 100 μ l씩 분주한 뒤 37°C에 30분간 둔다.
- 8) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 9) 100 μ l OPD substrate를 각 well에 분주하여 실온에서 15분 정치시킨다.
- 10) 50 μ l의 stopping buffer로 반응을 중지시키고 각 well의 흡광도(OD)를 492nm에서 측정한다.

<별첨 4> ELISA for *Haemophilus parasuis* antibody detection

가) 시험방법

- 1) Coating buffer에 *Haemophilus parasuis* antigen을 희석하여 100 μ l씩 ELISA plate에 분주한 뒤 4°C에서 48시간 흡착시킨다.
- 2) ELISA plate를 30분간 실온에 둔 뒤 washing buffer로 2~3회 세척한다.
- 3) Blocking buffer를 plate 각 well에 100 μ l씩 넣고 각군의 혈청(접종군 혈청, 대조군 혈청 및 표준품 혈청)을 첫 well에 100 μ l 넣은 후에 100 μ l씩 2진 희석한

1-2-1-10

다. 단, column 11, 12는 blocking buffer로 16배 희석된 표준양성혈청과 표준음성혈청을 100 μ l씩 넣는다.

- 4) ELISA plate를 실온에서 1시간 둔 뒤 washing buffer로 3~4회 세척한다.
 - 5) Anti-guinea pig IgG HRP conjugate를 blocking buffer로 적당히 희석하여 100 μ l를 모든 well에 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 둔 뒤 washing buffer로 3~4회 세척한다.
 - 6) OPD substrate 100 μ l를 모든 well에 분주하고 실온에 15분간 정치시킨 후 모든 well에 50 μ l stopping buffer로 반응을 정지시킨 다음 흡광도(OD)를 492nm에서 측정한다.
 - 7) 측정된 OD값을 Rel Pot 3.0 software로 통계처리하여 RP(relative potency)값을 구한다.
- 나) 시험결과의 유효조건
- 1) 표준음성혈청의 OD값은 0.1이하이어야 하며 표준양성혈청 OD값과 0.5이상 차이가 나야한다.
 - 2) Rel Pot 3.0 software로 통계처리 시 slope ratio는 0.8이상이어야 한다.

<별첨 5> ELISA for *Mycoplasma hyopneumoniae* antibody detection

- 1) *Mycoplasma hyopneumoniae* ELISA용 항원을 coating buffer에 희석하여 100 μ l씩 ELISA plate에 분주하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 흡착시킨 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 시킨다.
- 2) 항원이 흡착된 ELISA plate를 실온에 30분 둔 뒤 PBS로 3회 씻어낸다.
- 3) 100 μ l씩 blocking buffer를 모든 well에 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C 1시간 둔다.
- 4) Washing buffer로 3회 씻어낸다.
- 5) PBS로 100 μ l를 각 plate well에 분주한 뒤 A well은 blank well, B와 C의 첫 well에 음성혈청과 양성혈청을 100 μ l씩 분주하여 2배에서 1024배까지 2진 희석하고 D well부터는 sample혈청을 같은 방법으로 2배에서 1024배까지 2진 희석한다.
- 6) ELISA plate를 125rpm/1~3분 shaking시킨 뒤 37 $^{\circ}$ C에 1시간 둔다.
- 7) Washing buffer로 3회 씻어내고 blocking buffer로 2000배 희석된 anti-mouse IgG HRP conjugate를 100 μ l씩 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C에 30분간 둔다.
- 8) Washing buffer로 3회 씻어낸 뒤 100 μ l OPD substrate를 각 well에 분주하여 실온에서 15분 정도 정치시킨 뒤 50 μ l의 stopping buffer로 반응을 중지시키고 각 well의 흡광도(OD)를 492nm에서 측정한다.

<별첨 6> 완충액 (Buffers)

- 1) Phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)
 - NaCl 8.5g
 - NaH₂PO₄, anhydrous 0.57g
 - Na₂HPO₄, anhydrous 1.67g
 - D.W. 1,000ml
- 2) Coating buffer(0.1M bicarbonate buffer, pH 9.6)
 - Na₂CO₃ 4.24g
 - NaHCO₃ 5.04g
 - D.W. 1,000ml
- 3) Washing buffer(0.05% PBST)
 - Tween 20 0.5ml
 - PBS(pH 7.4) 1,000ml
- 4) Blocking buffer
 - Skim milk 또는 bovine serum albumin 1g
 - PBS(pH 7.4) 100ml
- 5) Conjugate : 시험에 적합한 Horseradish peroxidase (HRP) conjugate를 적정농도 (일반적으로 1:2,000)로 희석하여 사용한다.
- 6) 기질용액(substrate solution)
 - 가) Citrate-phosphate buffer, pH5.0
 - 48.5 ml 0.1M citric acid*(citric acid 19.2 g/D.W. 1L)
 - 51.5 ml 0.2M Na₂HPO₄*(Na₂HPO₄ 28.4 g/D.W. 1L)
 - * 냉장보관
 - 나) O-phenylenediamine(OPD) 40 mg
 - 다) Hydrogen peroxide(H₂O₂) 40 μ l
- 7) Stopping buffer(2.0M H₂SO₄)
 - H₂SO₄ 196.14ml
 - D.W 1,000ml

돼지 파스튜렐라폐렴, 흉막폐렴 불활화 혼합백신

Porcine *Pasteurella pneumonia*, *Actinobacillus pleuropneumonia*
Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 유래 파스튜렐라 멀토시다(*Pasteurella multocida*)와 액티노바실러스 플레우로뉴모니아(*Actinobacillus pleuropneumoniae*)를 순수배양하여 얻은 균액을 불활화하여 혼합한 후 보호제를 가하여 만든 백신이며 돼지 파스튜렐라폐렴과 흉막폐렴의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Pasteurella multocida type A와 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2, 5 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. *Pasteurella multocida*

1-2-1-03 돼지 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 돼지단독, 대장균 불활화 혼합백신의 2.2.2에 따른다.

2.2.2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

1-2-1-04 돼지 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 흉막폐렴 불활화 혼합백신의 2.2.3에 따른다.

2.3. 성장 및 독력

1-2-1-04 돼지 위축성비염, 파스튜렐라폐렴, 흉막폐렴 불활화 혼합백신의 2.3.3에 따른다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

*Pasteurella multocida*는 tryptose agar, 또는 이와 동등한 배지 그리고, *Actinobacillus pleuropneumoniae*는 PPLO agar, PPLO broth(V factor 첨가) 또는 이와 동등한 배지를 각각 제조용 배지로 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

*Pasteurella multocida*는 보존된 균주를 TA 또는 이와 동등한 배지에 이식하여 37°C에서 18~20시간 배양하고 집락을 선별하여 brain heart infusion broth 또는 이와 동등한 배지에 이식하여 18~20시간 배양한 것을, *Actinobacillus pleuropneumoniae*는 보존된 균주를 PPLO agar (V factor 첨가) 또는 이와 동등한 배지에 이식하여 37°C에서 16~18시간 배양하고 집락을 선별하여 PPLO broth(V factor 첨가) 또는 이와 동등한 배지에 이식하고 16~18시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

본 배양용 배지는 각 해당균별로 제조용 배지를 룩스병 (1,000 ml) 1개당 200 ml씩 분병, 15 lb에서 30분간 고압멸균하여 사용한다.

*Pasteurella multocida*는 배양된 종균액을 룩스병당 5 ml씩 이식하고 37°C에서 18~20시간 배양하며 *Actinobacillus pleuropneumoniae*는 배양된 종균액을 룩스병당 각 5 ml씩 이식하고 37°C에서 16~18시간 배양한다.

3.2.3. 집균

집균을 위하여 각각의 균이 배양된 룩스병에 적당량의 멸균된 생리식염수와 초자구를 함께 넣고 흔들어 완전히 집균한다. 집균된 균액은 120목 동망 및 3겹 가아제를 통과시켜 한천면을 제거한 다음 균괴의 세분과 균질화를 위하여 초자구를 넣은 용기에서 흔들어 진탕한다. 각 균주별로 집균액의 일부를 채취하여 원액 검사를 사용하고 나머지는 항원농도를 조절한 후 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

각각의 집균된 균액별로 조절한 후 포르말린을 0.3% 가하고 37°C에서 1일 3회 이상 흔들어 주며 3일간 불활화한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 각 항원액을 각각의 선택배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육유무를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

불활화 전에 취한 각 생균액을 10배 단계 희석법으로 희석하여 각 균별제조용 배지를 사용, 균수를 측정하고 다음과 같은 각 균별 기준수에 준하여 불활화 항원액을 원심 침전하여 상층액을 제거하고 0.3% 포르말린을 가한 식염수로 농도를 조절한다. *Pasteurella multocida* 3A 및 4D형 균은 각각 7×10^9 /ml 개 이상, *Actinobacillus pleuropneumonia* S-2 및 S-5형 균은 각각 4×10^9 /ml 개 이상이 되도록 조절한다.

3.4.2. 정제

각 항원물질 중 생체에 대한 과민성물질을 제거코자 상기 혼합 항원액을 5℃에 정치하여 침전된 항원의 내용물과 한계가 분명한 상층액으로 구분되었을 때 과민성 물질이 함유된 상층액을 제거하고, 0.3% 포르말린을 가한 생리식염수를 가하고 원래의 양과 동일하게 조정한다.

3.4.3. 항원혼합

Pasteurella multocida(3A, 4D) 45%(A, D형 각각 22.5%), *Actinobacillus pleuropneumonia*(S-2, S-5) 45%(S-2, S-5 각각 22.5%)되게 혼합하고, 수산화알루미늄 겔을 10% 첨가하여 완전한 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉진한다.

4. 검사방법

4.1. 특성 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색 또는 황갈색의 혼탁한 부유액이며 정치하면 백신 내용물의 침전이 생기나 흔들면 쉽게 균등액이 되며 소분된 용기별 내용물의 성상이 균일하고 이물이 없어야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법Ⅳ-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하이어야 하고, 지메로살 함유량은 0.01% 이하이어야 한다.

4.4. 안전 시험

4.4.1. 마우스 안전 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 복강 및 피하에 각각 5마리씩 0.5ml를 접종하여 7일간 관찰하며, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 근육 및 피하에 각 2마리씩 1ml를 접종하여 7일간 관찰하고 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰하고, 그리고 생후 1~2개월령의 건강한 자돈 3마리에 검사품을 규정량의 2배를 근육 내에 접종하여 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응을 관찰하며 그 후 10일간 계속 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스와 기니픽은 모두 이상없이 생존하여야 하며 또한 자돈은 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응이 없어야 하고 관찰기간동안 주사부위에 화농 및 괴사 등의 부작용 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. *Pasteurella multocida*

4.5.1.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 70마리를 선정하여 검사품 원액, 5배 및 25배 희석액을 각각 20마리에 규정량의 1/10로 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고 10마리는 대조로 둔다. 2차접종 10일 후에 *Pasteurella multocida* 100LD₅₀/0.2ml 각각 복강에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.1.2. 판정

검사품 원액 접종군은 80% 이상, 5배 희석액 접종군은 50% 이상, 25배 희석액 접종군은 20% 이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

4.5.2.1. 동물 및 시험

1-2-1-11

*A. pleuropneumoniae*에 감염되지 않은 2kg의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 검사품의 규정량을 2주 간격으로 2회 근육 내에 접종하고 2차 접종 2주 후에 각각 채혈하여 응집 항체가를 측정한다.

4.5.2.2. 판정

각 혈청형 별 응집 항체가는 80배 이상이어야 하며 대조군은 10배 이하이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

18개월간 유효하다.

6. 사용방법

- 모돈은 1회 2.0ml씩을 2~3주간씩 근육 내에 2회 접종하여 기초 면역 후 분만에정 30일전에 재접종하며 기초면역이 않된 임신돈은 분만 전 30일과 15일에 각각2.0ml씩 2회 접종한다.
- 어린 돼지는 생후 4~5주 내에 근육내에 1.0ml를 1차 접종하고 1~2주 후에 2.0ml를 2차 접종한다.
- 자돈은 3주령에 1차 1.0ml를 근육 내에 접종하고 2주 후에 1.0ml를 보강 접종한다.
- 모돈은 분만 30일전에 1.0ml를 근육 내에 접종하고 15일 후에 보강 접종한다.

돼지콜레라(열병) 생백신

Classical Swine Fever Vaccine, Live

1. 정의

약독 돼지콜레라 바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 이 바이러스액을 동결건조한 생백신이며 돼지 콜레라의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

조직배양순화 돼지콜레라 약독 바이러스 LOM-850주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

소 태아 신장조직배양세포(부기1)에 종독 배양원액 1/10량을 접종하고 37℃ 부란기내에서 약 5일간 회전배양하여 감염극기에 감염배양액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

소태아 신장 조직배양 세포에 종독을 접종하였을 때 잘 감염되며 접종 5일 뒤에도 세포변성효과가 일어나지 않는다.

건강한 돼지 근육 내에 종독을 접종하였을 때 경미한 발열 이외에 하등의 이상이 인정되지 않고 강력한 면역이 형성된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

건강한 송아지 또는 소 태아 신장세포(부기1)를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기2), 세포유지용 배지(부기3)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

송아지신장세포(부기1) 를 세포 배양병에 분주하여 37℃에서 4~6일간

1-2-2-01

세포증식용 배지(부기2)에 배양한다.

3.2.2. 바이러스배양

배양세포의 단층이 형성 되었을 때 증식용 배지(부기2)를 제거하고 증독바이러스 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 각 병에 접종하여 세포유지용 배지(부기3)를 가하여 37℃에서 4~6일간 회전배양한다.

3.2.3. 바이러스수확

바이러스 배양 후 바이러스의 감염극기에 배양액을 무균적으로 수집하여 80 mash망으로 여과하여 배양액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 따른다.

3.3.2. 미립바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 약의 사용량으로 희석하고 여기에 돼지 콜레라 고도 면역혈청을 동량 혼합하여 37℃에서 1시간 감작한 후 돼지 고환배양세포에 0.1ml씩을 접종하고 37℃에서 5일간 회전배양하면서 세포를 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과(CPE) 및 배양 상층액에서 돼지혈구 및 닭혈구의 응집성이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3 바이러스 함량시험

3.3.3.1 재료 및 시험

END법, FA법 또는 PLA법<별첨1,2,3>에 의하여 바이러스 함량을 측정한다.

3.3.3.2 판정

바이러스 함량은 1두분 당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액 50%와 적당량의 항생제와 보호제(부기4)를 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결

건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 색조를 띤 건조괴이며 용해액으로 용해하여 흔들면 균일한 현탁액이 되어야 하며 이물, 이취 및 조대립자가 없고 소분용기간에 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 흡습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따라 흡습도가 4% 이하이어야 한다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량시험

4.6.1. 재료 및 시험

3.4.3에 의한 검사에 따른다.

4.6.2. 판정

바이러스 함량은 돼지 1마리당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리와 체중 300~500g 건강한 기니픽 4마리, 돼지 콜레라 바이러스 항체 음성의 35~40kg 건강한 돼지 4마리를 선정 사용하여 검사품을 마우스 5마리는 0.03ml씩을 뇌 내에, 마우스 5마리는 0.5ml씩을 복강에, 기니픽 4마리는 0.5ml씩 근육 내에 접종하여 7일간 관찰하고 돼지 2마리는 1두분을 근육 내에 접종하고 2마리는 대조로 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

1-2-2-01

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 돼지 4마리를 채혈하여 중화항체를 측정한다.

4.8.2. 판정

시험 돼지의 중화항체는 4배 이상이어야 하고 대조 돼지는 항체 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

연령에 관계없이 대퇴부 근육 또는 이근부에 1ml씩 주사한다. 자돈은 1차 40일령(5~6주령), 2차 60일령(8~9주령)에 접종하며 번식돈(모돈, 웅돈)은 매년 1회 접종한다.

<별첨1> END법

- 1) α -MEM 배지를 사용하여 검사품을 10배 단계 희석하여 원액에서 10^{-5} 까지 희석한다.
- 2) 희석액 0.1ml씩을 10개 이상의 시험관에 넣는다.
- 3) 여기에 돼지 고환세포 부유액 0.5ml씩 넣는다.
- 4) 37°C에서 4일간 정치배양 한다.
- 5) 배양 4일째 각 시험관에 배양액을 제거한 후 $10^{4.0}$ PFU(plaque forming unit)의 뉴캐슬 바이러스(미야데라주)를 함유하는 배양액 0.5ml씩을 넣고 37°C에서 4일간 배양 관찰한다.
- 6) 특이한 세포변성효과(CPE)가 나타난 것을 감염가로 하여 TCID₅₀을 산출한다.

<별첨2> FA(fluorescent antibody)법

- 1) PK-15 세포주를 cover glass에 2~3일간 배양한다.
- 2) 80~90% 단층 형성된 cover glass를 2~3회 PBS로 세척한다.
- 3) α -MEM 배지를 사용하여 공시백신을 10진법에 의하여 원액에서 10^{-5} 까지 희석한다.
- 4) 세척한 2번항의 cover glass에 희석액 100 μ l씩 넣어 37°C, 1시간(5% CO₂) 동안 감작한다.
- 5) 증식용 배지를 넣은 후 2일간 37°C(5% CO₂)에 배양한다.
- 6) PBS로 2~3회 세척한다.
- 7) 80% cold acetone으로 -20°C에서 10분간 고정한다.
- 8) 고정액을 버린 후 PBS로 1회 세척한다.
- 9) HCV 단크론성 항체를 넣어 37°C, 1시간 감작한다.
- 10) PBS로 세척한다.
- 11) D.W로 세척 후 건조시킨다.
- 12) Rabbit anti-mouse FITC conjugate로 37°C, 1시간 감작한다.
- 13) cover glass를 덮은 후 형광현미경으로 특이한 형광을 관찰한다.

<별첨3> PLA(Peroxidase-linked assay)법

- 1) 공시품을 α -MEM 배지로 원액에서 10^{-5} 까지 10진 희석하여 well 당 100 μ l씩

1-2-2-01

넣는다.

- 2) PK-15 cell(20만개/ml)를 100 μ l/well 씩 sgj고 2일간 37 $^{\circ}$ C(5% CO₂)에 배양한다.
- 3) 배양상층액을 버리고 PBS로 1회 세척한 후 Microplate를 완전히 건조시킨다.
- 4) 80% cold acetone를 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 고정한다.
- 5) 고정액을 완전히 버리고 PBS로 1회 세척한다.
- 6) PBS로 3~4회 세척한다.
- 7) Biotinylated anti-mouse IgG용액(Kit solution)를 100 μ l/well씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 40~60분간 반응시킨다.

<Biotinylated anti-mouse IgG용액 제조법>

PBS 9.9ml
말혈청 0.1ml
biotinylated anti-mouse IgG 1 drop

- 8) 동시에 다음 단계의 시약을 제조하여 실시한다.

<AB solution 제조법>

PBS-T(0.05% Tween20) 10ml
A solution(Avidin PH) 2drop
B solution(Biotinylated HRP) 2drop

- 9) PBS로 4회 세척한다.
- 10) AB solution을 100 μ l/well씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 40~60분간 반응시킨다.
- 11) PBS-T로 3회 세척한 후, 1회 PBS로 세척한다.
- 12) 물기를 완전히 제거한다.
- 13) Substrate DAB(10X, 60mg DAB/9ml DW)을 100 μ l/well씩 넣는다.

<Working solution(1X)>

PBS 9ml
30% H₂O₂ 10 μ l
DAB solution(10X) 1ml

- 14) 증류수로 세척한 후 판독한다.

<부 기>

부기1. 송아지 신장세포

송아지 또는 소 태아 신장의 상피세포를 트립신(trypsin)으로 소화하고 세포 증식용배지(부기2)로 1,000rpm 10분간 원심, 침전세포의 1% 부유액을 만들고 소 시험관이나 배양병에 분주하여 37℃에서 4~7일간 배양한 세포(조독배양용) 또는 세포 부유액(제조시 세포 부유액분주와 동시에 중독접종 배양함)을 사용한다. Trypsin용액은 trypsin(1:250Difco) 2.5g를 100ml TBS(Tris buffer solution) 1000ml에 용해하여 멸균 후 사용시 0.1%용액으로 희석하여 사용한다.

부기2. 세포 증식용배지

Eagle's MEM 용해액.....	100ml
Lactabumin hydrolysate.....	0.5%
Tryptose phosphate broth.....	5%
Fetal bovine serum.....	10%
7.5% sodium bicarbonate.....	2%
Fungizone.....	0.025 μ l/ml
Penicillin G-Na.....	200unit/ml
Streptomycin.....	100 μ l/ml

부기3. 세포 유지용배지

Eagle's MEM 용해액.....	100ml
Lactabumin hydrolysate.....	0.5%
Tryptose phosphate broth.....	5%
Fetal bovine serum.....	5%
7.5% sodium bicarbonate.....	2%
Fungizone.....	0.025 μ l/ml
Penicillin G-Na.....	200unit/ml
Streptomycin.....	100 μ l/ml

1-2-2-01

부기4. 보호제 LPGG(lactose, phosphate, glutamate, gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

부기5. 돼지 고환세포

건강한 새끼돼지의 고환세포를 trypsin으로 소화하고 세포 증식용배지로 1,000rpm 10분간 원심 침전하고 세포의 수가 ml당 250만개가 되도록 부유액을 만들고 소 시험관에 분주한다.

돼지콜레라(열병) 이.엔.디. 음성(END⁻) 생백신

Classical Swine Fever END⁻ Vaccine, Live

1. 정의

약독 돼지콜레라 이엔디 음성 바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 이 바이러스액을 동결건조한 생 백신이며 돼지콜레라의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

조직배양순화 돼지콜레라 약독 바이러스 이엔디 음성(END⁻)주인 수리주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

소 태아 신장조직배양세포(부기1)에 종독 배양원액 1/10량을 접종하고 37℃에서 약 5일간 회전배양하여 감염극기에 바이러스 배양액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

소태아 신장 조직배양 세포에 종독을 접종하였을 때 잘 감염되며 접종5일 뒤에도 세포변성효과가 일어나서는 아니되며 계대시 마다 END음성, 건강한 돼지 근육 내에 종독을 접종하였을 때 경미한 발열 이외에 하등의 이상이 인정되지 않고 강력한 면역이 성립되어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

건강한 송아지 또는 소태아 신장세포(부기1)를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기2), 세포유지용 배지(부기3)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

세포증식용 배지(부기2)에 부유시킨 소태아 신장세포 부유액(부기1)을 세포

배양병에 분주하고 37℃에서 4~6일간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 세포 유지용 배지(부기3)에 증독 바이러스 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 접종한 후 37℃에서 4~6일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 바이러스의 감염극기에 배양액을 무균적으로 수집하여 80 Mash망으로 여과하여 배양액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 돼지 콜레라 바이러스의 고도 면역혈청을 동량 혼합하여 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 각 10개의 돼지 고환배양세포(부기5) 및 돼지 신장배양세포에 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 7일간 배양 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과(CPE) 및 혈구 응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지 고환세포(부기5)를 이용하여 WEE 간접법에 의하여 바이러스 감염가를 측정한다. 검사품을 바이러스 증식용 배지로 10^{-5} 까지 10배 단계 희석한 후 각 희석액 0.1ml씩을 10개의 시험관에 분주한 후 돼지 고환세포 부유액 0.5ml씩을 가하여 혼합하고 37℃에서 4일간 정치배양한다. 4일간 정치배양한 후 각 시험관의 배양액을 제거하고 100TCID₅₀/ml 서부마뇌척수염 바이러스를 함유하는 배양액 0.5ml씩을 가하고 37℃에서 2~3일간 회전배양한다. 이 결과 세포변성효과(CPE)가 억제된 것을 감염된 것으로 하여 TCID₅₀를 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액 80%와 적당량의 보호제(부기4)를 가하여 잘 흔들어서 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 색조를 띤 건조괴이며 용해액으로 용해하여 흔들면 균일한 현탁액이 되어야 하며 이물, 이취 및 조대립자가 없고 소분용기간에 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따라 함습도가 4% 이하이어야 한다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 따른다.

4.5. 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량시험

4.6.1. WEE 간섭법

4.6.1.1. 재료 및 시험

3.3.3.1에 의한 검사에 따른다.

4.6.1.2. 판정

바이러스 함량은 1마리당 $10^{3.0}$ TCID₃₀ 이상이어야 한다.

4.6.2. 형광항체법

4.6.2.1. 재료 및 시험

1-2-2-02

PK15세포를 cover glass에 80~90% 단층세포상태로 형성시킨 다음 각 바이러스 희석액을 100 μ l씩 접종한다. 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 감작한 후 증식용 배지를 첨가한 후 3일간 배양한다. 상층액을 버린 후 cover glass에 자란 세포를 80% cold acetone으로 실온에서 10분간 고정한다. 고정액을 버린 후 anti-CSFV 단클론성항체를 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응한다. PBS로 3회 세척 후 anti-mouse FITC conjugate로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후 PBS로 3회 세척한다. cover glass로 덮은 후 형광현미경으로 바이러스 plaque를 관찰한다.

4.6.2.2. 판정

그 결과 plaque가 관찰되면 돼지 콜레라 바이러스가 증식된 것으로 판정하며 바이러스 함량이 바렌스 켈바(Berhrens Kärber)법에 의하여 1마리 당 10^{3.0}TCID₅₀이상이어야 한다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리와 체중 300~350g 건강한 기니픽 4마리, 돼지 콜레라 바이러스 항체 음성의 35~40kg 건강한 돼지 4마리를 선정 사용하여 검사품을 마우스 5마리는 0.03ml씩을 뇌 내에, 마우스 5마리는 0.5ml씩을 복강에, 기니픽 4마리는 0.5ml씩을 근육 내에 접종하여 7일간 관찰하고 돼지 2마리는 1두분을 근육 내에 접종하고 2마리는 대조로 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 돼지 4마리를 체혈하여 중화항체가를 측정한다.

4.8.2. 판정

시험 돼지의 중화항체는 4배 이상이어야 하고 대조 돼지는 항체 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

어린돼지는 1차 40일령(5~6주령)에 2차 60일령(8~9주령)에 각각 1.0ml씩 모돈에 매년 1회 1.0ml씩 피하 또는 근육 내에 접종한다.

<부 기>

부기1. 소 신장 배양세포

송아지 또는 소태아 신장의 상피세포를 트립신(trypsin)으로 소화하고 세포중식용 배지(부기2)으로 1,000rpm 10분간의 원심 침전세포의 1% 부유액을 만들고 소시험관이나 배양병에 분주하여 37℃에서 4~7일간 배양한 세포(종독배양용) 또는 세포부유액(제조시 세포부유액 분주와 동시에 종독접종 배양함)을 사용한다. Trypsin용액은 trypsin(1:250Difco) 2.5g를 100ml TBS(Tris buffer solution) 1000ml에 용해하여 멸균후 사용시 0.1%용액으로 희석사용한다.

부기2. 세포중식용 배지

Eagle MEM용해액	100ml
Lactabumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ l/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ l/ml

부기3. 세포유지용 배지

Eagle MEM용해액	100ml
Lactabumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ l/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ l/ml

부기4. 보호제 LPGG(lactose, phosphate, glutamate, gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

부기5. 돼지고환세포

건강한 새끼돼지의 고환세포를 trypsin으로 소화하고 세포증식용 배지(부기2)로 1,000rpm 10분간 원심 침전하고 세포의 수가 ml당 250만개가 되도록 부유액을 만들고 소 시험관에 분주한다.

돼지 전염성위장염 생백신

Transmissible Gastroenteritis Vaccine, Live

1. 정의

약독 돼지 위장염 바이러스를 조직 배양세포에 증식시켜 이 바이러스액을 동결건조한 생 백신이며 돼지전염성위장염의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

국내에서 TGE(transmissible gastroenteritis, TGE) 발생농장의 돼지에서 분리하여 돼지 신장세포와 돼지 고환세포에서 40대를 연속 계대하여 약독화시킨 바이러스 평택-40주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 초대 신장세포(porcine kidney primary cell, PK Cell)와 돼지 고환세포(swine testicle Cell, ST Cell)에서 40대 연속 계대하여 약독화된 바이러스 배양액을 -80°C 이하에 동결 보존 또는 동결 건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

돼지 신장세포와 돼지 고환세포에서 20대를 계대했을 때부터 독력을 상실하여 3일령의 돼지 전염성위장염 항체 음성 자돈에 $10^{6.0}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 바이러스를 5~10ml 까지 경구투여한 실험에서도 아무런 임상증상이 없으며, 경구투여 후 3주 후에 64~256배의 중화항체가를 나타낸다. 또한, 돼지 전염성위장염 항체 음성 임신돈에 분만 5주와 2주전에 $10^{4.0}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 의 바이러스를 근육 내에 2차례 접종한 결과 그 모돈에서 출생한 자돈들은 64~256배의 중화 항체가를 보여야한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

돼지 전염성위장염 항체 음성인 돼지(30-90일령 자돈)와, 돼지 초대 신장세포(PK primary cell)와 돼지 고환세포(ST cell)를 사용한다.

3.1.2. 배지

배지는 세포증식용 배지(부기1), 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

초대인 PK 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 1ml중 약 10^5 개가 되도록 부유시켜서 세포 배양병에 분주하여 37°C에서 4~5일간 단층 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 CPE가 인정되어서는 아니 된다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양 세포의 단층이 형성되었을 때 세포 증식용 배지를 제거하고 종독 바이러스를 약 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml접종한 후 37°C에서 1시간 감작 후 세포유지용 배지(부기2)를 분주하고 37°C에서 2일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 70%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수집하여 1,000rpm으로 30분간 원심분리하고 200nm의 멤브레인 필터로 여과하여 배양액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 돼지 전염성위장염 바이러스의 고도 면역 혈청을 동량 가하여 37°C에서 1시간 감작하여 중화된 것을 돼지 신장 배양세포 시험관10개에 각각 0.1ml씩 분주하여 7일간 배양관찰하여 이기간 중 세포변성효과, 7일령의 닭적혈구(0.1v/v %)를 흡착하거나 응집시키는 미입 바이러스의 혼입여부를 검사한다. 그리고 돼지콜레라 바이러스에 대해서 검사품 0.1ml씩을 시험관에 넣고 돼지 고환세포 부유액 0.5ml씩을 가하여 37°C에서 4일간 정지배양 한다. 4일째 각 시험관에 배양액을 제거하고 $10^{4.0}$ PFU의 뉴캐슬 바이러스(미야데라주)를 함유하는 배양액 0.5ml씩을 가하고 37°C에서 3일간 배양한다. 이 결과 공격에 사용된 뉴캐슬병 바이러스에 의하여 세포변성효과(CPE)가 나타난 것을 감염한 것으로 하여 TCID₅₀을 산출한다.

3.3.2.2. 판정

1-2-2-03

세포변성효과 또는 혈구응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 10배 단계적으로 10^{-5} 까지 희석하고 각 희석액의 0.1ml씩을 4~5일 배양한 돼지 고환 또는 돼지 신장 배양세포 시험관 10개 이상에 접종하고, 37°C에서 4일 이상 배양한 후 세포변성효과(CPE)를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기3)를 동량 가하고 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 대황회백색의 건조괴이며 희석액을 넣어 흔들면 쉽게 균등한 현탁액이 되며, 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 약 300~350g의 건강한 기니픽 4마리, 체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리 및 체중15kg(생후 2개월)의 돼지전염성 위장염 항체 음성의 건강한 돼지 6마리를 사용한다. 검사품을 돼지 2마리는 10두분을, 다른 2마리에는 1두분을 각 근육 내에 접종하고 2마리는 무처리 대조로하여 각각 3주간 관찰한다. 기니픽 4마리는 복강에 4ml, 마우스 5마리는 뇌내에 0.03ml, 5마리는 0.4ml를 복강에 각각 접종하고 7일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상없이 생존하여야 하며, 돼지는 백신에 기인하는 이상이 인정되지 않으며, 40℃이상의 발열이 3일 이상 계속되지 아니하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험에 1두분을 접종한 돼지 2마리 및 대조돼지를 사용한다. 1두분을 접종한 돼지는 안전시험이 끝난 날 다시 1두분을 각각 근육 내에 접종하고, 2주후에 채혈한 혼합혈청 및 대조 돼지 혈청을 사용하여 중화항체가를 측정한다.

4.8.2. 판정

1두분을 접종한 돼지는 중화항체가가 128배 이상이며, 대조돼지는 항체 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

1차 접종은 분만 5~6주전에 2ml씩을 2차 접종은 분만 2~3주전에 2ml를 근육 내에 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM 용해액(0.5% 락토 알부민 수해물 함유)	900ml
Fetal bovine serum	100ml
Penicillin	200IU/ml
Streptomycin	200 μ g/ml
Kanamycin	2 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

상기 배양액 중 우태아 혈청만 50ml로 줄인다.

부기3. 보호제 LPGG(lactose, phosphate, gelatin and glucose)

Lactose	74.62g
Sodium L glutamate	20g
Gelatin	20g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	1.254g
D.W	1,000ml

돼지 전염성위장염, 로타바이러스 생 혼합백신

Transmissible Gastroenteritis, Rotavirus Combined Vaccine, Live

1. 정의

돼지 전염성위장염바이러스와 돼지 로타바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 이 바이러스 액을 혼합한 후 동결건조한 생 백신이며 돼지 전염성 위장염과 돼지 로타바이러스 설사병의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

2.1.1. 돼지 전염성위장염(transmissible gastroenteritis, TGE)바이러스

국내 야외 발생 돼지로부터 분리한 돼지 전염성 위장염 바이러스(평택)주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.1.2. 돼지 로타바이러스(Rotavirus)

국내 야외 발병돼지로 부터 분리한 돼지 로타바이러스 A주를 녹색원숭이 신장세포(CV-1 cell)에서 11대 연속 계대하여 약독화시킨 바이러스주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 돼지 전염성 위장염 바이러스

동정시험과 면역원성시험에서 확인된 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 이상의 TGE 원종독바이러스를 돼지 태아신장초대세포 또는 계대배양 신장세포(porcine kidney cell, PK cell)에 접종하고 37℃에서 33~48시간 배양한 후 바이러스 배양액을 -80℃이하에 동결 보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다. 원종독은 3대이상 계대하지 아니한다.

2.2.2. 돼지 로타바이러스

동정시험 및 면역원성 시험에서 확인된 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml이상의 원종독을 원숭이 신장유래세포(CV-1 또는 MA104 세포)에 접종하여 무혈청배지 (부기3)로 일정시간 배양한 후 배양액을 -80℃ 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다. 원종독은 3대이상 계대하지 아니한다.

2.3. 성상 및 독력

2.3.1. 돼지 전염성위장염 바이러스

돼지 신장세포와 돼지 고환세포(swine testicle cell, ST cell)에서 20대를 계대했을 때부터 독력을 상실하여 3일령의 돼지 전염성위장염 항체 음성 자돈에 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml의 바이러스를 5 - 10ml까지 경구 투여한 실험에서도 아무런 임상증상이 없으며, 경구투여 후 3주 후에 64~256배의 중화항체를 나타내어야 한다. 또한, 돼지 전염성위장염 항체 음성 임신돈에 분만 5주와 2주전에 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml의 바이러스를 근육 내에 2차례 접종한 결과 그 모돈에서 출생한 자돈들은 64~256배의 중화항체를 나타내어야 한다.

2.3.2. 돼지 로타바이러스

CV-1 세포에서 11대 연속 계대하여 약독화시킨 후 3일령의 돼지 로타바이러스 항체 음성인 자돈에 5~10ml까지 경구 투여한 실험에서 아무런 임상증상이 없으며, 경구 투여 후 3주 후에 128~512배의 중화항체를 나타내어야 한다. 또한 돼지 로타바이러스 항체 음성인 임신돈에 분만 5주와 3주전, 1주전에 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml의 바이러스를 경구 투여한 결과 그 모돈에서 출생한 자돈들은 1,024배의 중화항체를 나타내어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 돼지 전염성 위장염 바이러스

3.1.1.1. 세포

돼지 전염성위장염 항체 음성인 돼지를 사용하며 세포주는 돼지 초대신장 세포(primary PK cell)와 돼지 고환세포(ST cell)를 사용한다.

3.1.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기3)을 사용한다.

3.1.2. 돼지 로타바이러스

3.1.2.1. 세포

세포는 녹색원숭이 신장세포 (CV-1 cell) 또는 아프리카 원숭이 신장세포 (MA 104 cell)을 사용한다.

3.1.2.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기3)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 돼지 전염성 위장염 바이러스

3.2.1.1. 세포배양

초대 PK세포를 세포증식용 배지 (부기1)에 1ml중 약 10^5 개가 되게 부유시켜 세포배양병에 분주하고 37℃에서 4~5일간 단층 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.2.1.2. 바이러스 배양

단층이 형성된 배양세포의 배지를 제거한 다음 세포유지용 배지로 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml으로 희석된 종독을 세포에 접종한 후 37℃에서 3~4일간 회전배양한다.

3.2.1.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 바이러스의 감염극기에 배양액을 무균적으로 수집하여 10,000rpm에서 30분간 원심분리하고 이어 450nm와 200nm의 멤브레인 필터로 여과하여 세균과 세포편을 제거한 후 바이러스액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.2. 돼지 로타바이러스

3.2.2.1. 세포배양

CV-1 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 1ml중 10^5 개가 되게 부유시켜 세포배양병에 분주하여 37℃에서 3~4일간 배양한다.

3.2.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 후 세포유지용 배지에 종독 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml을 접종한 세포는 37℃에 3~4일간 회전배양한다.

3.2.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 바이러스의 감염극기에 배양액을 무균적으로 수집하여 10,000rpm에서 30분간 원심분리하고 이것을 450nm와 200nm의 멤브레인 필터로 여과하여 세균과 세포편을 제거한 후 바이러스배양액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 돼지 전염성위장염바이러스 및 돼지 로타바이러스의 고도 면역 혈청을 동량혼합하고 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 시험재료로 한다. 세포변성효과 및 혈구흡착 및 응집성에 대하여는, 돼지 신장배양세포 시험관에 각각 10개에 검사품을 0.1ml씩을 접종하여 7일간 관찰한다.

3.3.2.2. 돼지콜레라 바이러스에 대해서 END법 또는 FA법으로 한다.

3.3.2.2.1. END법

검사품 0.1ml씩을 시험관에 넣고 돼지 고환세포 부유액 0.5ml씩을 가하여 37℃에서 4일간 정치배양 한다. 4일째 각 시험관에 배양액을 제거하고 $10^{4.0}$ PFU의 뉴캐슬 바이러스(미야데라주)를 함유하는 배양액 0.5ml씩을 가하고 37℃에서 3일간 배양한다.

3.3.2.2.2. FA법

- 1) PK-15 세포주를 cover glass에 2~3일간 배양한다.
- 2) 80~90% 단층 형성된 cover glass를 2~3회 PBS로 세척한다.
- 3) MEM배지를 사용하여 시험백신을 10진법에 의하여 원액에서 10^{-5} 까지 희석한다.
- 4) 세척한 2번항의 cover glass에 희석액 100 μ l씩 넣어 37℃, 1시간(5% CO₂)동안 감작한다.
- 5) 증식용 배지를 넣은 후 2일간 37℃(5% CO₂)에 배양한다.
- 6) PBS로 2~3회 세척한다.
- 7) 80% cold acetone으로 -20℃에서 10분간 고정한다.
- 8) 고정액을 버린후 PBS로 1회 세척한다.
- 9) HCV 단클론성 항체를 넣어 37℃, 1시간 감작한다.
- 10) PBS로 세척한다.
- 11) D.W로 세척 후 건조시킨다.
- 12) Rabbit anti-mouse FITC conjugate로 37℃, 1시간 감작한다.
- 13) Cover glass를 덮은 후 형광현미경으로 특이한 형광을 관찰한다.

3.3.2.3. 판정

세포변성효과 또는 혈구응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 돼지 전염성위장염바이러스는 돼지 로타바이러스의 고도 면역혈청으로, 돼지 로타바이러스는 돼지 전염성위장염 바이러스의 고도 면역혈청으로 각각 중화한 다음 각 희석액의 0.1ml씩을 돼지(신장 또는 고환) 또는 원숭이 신장 유래 단층 배양세포의 시험관 10개 이상에 각각 접종하고, 37℃에서 4일 이상 배양한 후 세포변성효과(CPE)를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

1두분당 바이러스 함량이 돼지 전염성 위장염 바이러스는 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 하며 돼지 로타바이러스는 $10^{6.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

각각의 바이러스 함량을 조정한 돼지 전염성 위장염 바이러스 원액을 30%, 돼지 로타바이러스 원액 20%의 비율로 혼합하고 이를 50% 비율의 보호제 (부기4)를 첨가하여 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 대황회백색의 건조물이어야 한다. 용해한 것을 대등 담도색의 투명한 액체 이어야하며, 이물 또는 이취를 나타내서는 아니 된다. 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.4. 흡습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

검사품을 체중 15g의 건강한 마우스 15마리 중 5마리는 뇌 내에 0.03ml씩 접종하고, 10마리에는 0.5ml씩 피하 및 복강에 각각 5마리씩 접종한다. 350g의 건강한 기니픽 5마리에는 5.0ml씩 복강에 접종하고, 또한 돼지 전염성위장염 항체음성 및 돼지 로타바이러스 항체음성인 생후 60일령 자돈 6마리를 사용한다. 자돈 2마리는 근육 내에 2ml(1두분)를 접종하고, 2마리는 경구로 20ml(10 두분)를 접종하며, 나머지 2마리는 음수로 20ml을 투여한다. 모든 동물을 3주간 사육하면서 관찰한다.

4.7.2. 판정

관찰기간중 모든 동물에 임상상 어떠한 이상증상도 나타나지 않고 내과생존 하여야한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험에 사용한 1두분을 접종한 돼지 2마리 및 대조 돼지를 사용한다. 1두분을 접종한 돼지는 안전시험이 끝난 날 다시 1두분을 각각 근육 내에 접종하고 2주 후에 채혈한 혼합혈청 및 대조 혈청을 사용하여 중화항체를 측정한다.

4.8.2. 판정

1두분을 접종한 돼지의 중화항체는 로타바이러스 및 돼지 전염성 위장염 바이러스 각각 128배 이상이어야 하고, 대조 돼지는 항체음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

초임돼지는 분만 5~6주전 및 분만 3주전에 각각 2ml씩 경구투여 한 후 분만 1주전에 2ml를 근육접종 한다.

경산돼지는 분만 2~3주전에 경구투여와 근육내 접종을 각각 2ml씩 동시에 실시한다. 자돈은 이유 후 1주 이내에 2ml를 경구투여 한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM	900ml
Foetal calf serum	100ml
Penicillin	100IU/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Kanamycin	100 μ g/ml
NaHCO ₃	0.075%

부기2. 세포유지용 배지(돼지신장세포)

Eagle's MEM	950ml
Foetal calf serum	50ml
Penicillin	100IU/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Kanamycin	100 μ g/ml
NaHCO ₃	0.075%

부기3. 세포유지용 배지 (원숭이신장유래세포)

Eagle's MEM	1,000ml
Crystal trypsin (bovine typeIII, sigma)	0.5 μ g/ml
Penicillin	100IU/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Kanamycin	100 μ g/ml
NaHCO ₃	0.075%

부기4. LPGG (lactose, phosphate, gelatin and glucose)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	1.254g

1-2-2-04

L-glutamate	10g
Gelatin	7.5g
D.W	1,000ml

부기5. TV 액

EDTA	2g
Glucose	1g
KCl	0.4g
NaCl	8g
Phenol red	0.2ml
NaHCO ₃	0.58g
Trypsin (1:250)	5g
D.W	1,000ml

돼지 일본뇌염 생백신

Japanese Encephalitis Vaccine, Live

1. 정의

약독 돼지 일본뇌염 바이러스를 조직배양 세포에 증식시켜 동결건조한 생백신이며 돼지 일본뇌염 바이러스에 의한 유사산의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

1969년 안양 근교 신생자돈의 비장에서 돼지 일본뇌염 바이러스 야외주를 분리하여 계태아 섬유아 세포에 300대 연속 계대하여 고정시킨 조직배양 순화약독 돼지 일본뇌염 바이러스 안양주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스 주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~11일령 SPF 발육계란의 계태아 섬유아 세포에 돼지 일본뇌염 바이러스 $10^{4.0} \sim 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하고 37°C에서 3~4일간 배양하여 감염극기에 배양액을 -80°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

$10^{6.0}$ PFU/ml의 바이러스를 포유마우스의 피하에 0.03ml를 주사해도 병원성(폐사 혹은 신경증상)이 인정되지 않으며 또한 일본 뇌염바이러스에 감수성이 있는 돼지 및 말에 병원성이 없으며, 중화항체가와 혈구응집억제항체를 생산케 된다. 그리고 거위 적혈구응집능을 가진다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

9~11일령 SPF 발육계란의 계태아 섬유아세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

1-2-2-05

세포증식용 배지에 계태아 섬유아세포를 1ml중 약 10^5 개가 되도록 부유시켜서 배양병에 분주하여 37°C에서 4-5일간 단층배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 종독바이러스를 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml 접종한 후 37°C에서 4~5일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 바이러스의 감염극기에 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 회석액으로 용해하여 돼지 일본뇌염 바이러스에 대한 고도 면역 혈청을 동량 혼합하여 37°C에 1시간 중화한 후 각 바이러스 회석액 0.1ml씩을 20개의 시험관에 주입한 후 돼지 신장 및 계태아 섬유아세포액을 0.5ml씩을 가하여 혼합하고 37°C에서 정치 배양한다.

3.3.2.2. 판정

이들 세포에 대하여 현미경 검사 결과 세포변성이 없어야 하며 배양 상층액에 거위 혈구 또는 닭(초생추)혈구를 응집시키는 미입바이러스가 혼입되지 않아야 한다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 조직배양액으로 10배 단계 희석하여 BGK세포 또는 돼지 신장유래세포에 0.1ml씩을 접종하고, 7일간 관찰한다. 젓먹이 마우스의 뇌내 접종법에 의하여 바이러스 함량을 측정한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 1두분당 $10^{5.0}$ TCID(LD)₅₀ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기3) 20%를 가하고 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 연한 황백색의 건조 피이며 희석액을 넣고 흔들면 균등한 연한 적색이 되며, 이물 및 이취가 없고, 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 흡습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 마우스 10마리, 체중 300~350g의 기니픽 4마리 및 항체 음성의 생후 2개월령의 자돈 6마리를 사용한다. 검사품을 기니픽의 피하에 2ml, 마우스는 0.2ml를 각각 5마리씩 피하와 복강에 접종한 후 14일간 관찰한다. 새끼 돼지 각각 2마리에 10두분 및 1두분을 접종하고 2마리는 무처리 대조로 하여 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

4.8. 역가시험

1-2-2-05

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 1두분 접종돼지의 혼합혈청과 대조혈청을 사용하여 중화항체가 또는 혈구응집억제 항체가(HI)를 측정한다.

4.8.2. 판정

시험돈의 항체가는 20배 이상을 나타내고 대조돈은 10배 이하의 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

돼지의 피하 또는 근육 내에 1두분을 3~4주 간격으로 2회 주사한다.

<부 기>**부기1. 세포증식용 부기**

Eagle's MEM	
Lactalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200 Unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM	
Lactalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200 Unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W 1,000ml	

돼지 유행성설사 생백신

Porcine Epidemic Diarrhea Vaccine, Live

1. 정의

약독 돼지 유행성설사 바이러스를 조직배양 세포에 증식시켜 이 바이러스액을 동결건조한 생 백신이며 돼지 유행성설사 바이러스에 의한 자돈의 설사병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

국내에서 분리한 돼지 유행성 설사바이러스(PEDV)를 Vero 세포에서 90대 연속 계대하여 순화시킨 바이러스 KPED-9주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

KPED-9주를 Vero 세포에서 90대 연속계대, 배양하여 약독화된 바이러스액을 -70°C 에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존하며 95대 이상은 계대하여서는 아니된다.

2.3. 성상 및 독력

PEDV 항혈청과 중화되어야 하고 돼지 유행성 설사 바이러스 항체음성 이유 자돈에 KPED-9 바이러스 ($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml)를 1ml를 접종하였을 때 설사 등의 임상 증상이 없어야 하며, 또한 임신 모돈에 접종했을 때 모돈에서 어떠한 임상증상이 없어야 한다. 그리고 그 분만 자돈에서도 설사 등의 임상증상이 없어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

Vero 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

Vero 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 1ml 중 약 10^5 개가 되도록 부유시켜 배양병에 분주하여 37℃에서 4~5일간 단층 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 세포변성효과(CPE)가 인정되어서는 아니 된다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 90%이상 형성 되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 PBS(phosphate buffered saline) 로 3회 세척한 다음 종독바이러스를 0.1~1 M.O.I(multiplicity of infection)가 되도록 접종하고, 1시간 흡착시킨 후 PBS로 세척하고, 세포유지용 배지(부기2)를 분주하고 37℃에서 3~5일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수집하여 10,000rpm에서 30분간 원심분리하고 450nm와 200nm의 멤브레인 필터로 여과하여 세균과 세포편을 제거한 바이러스액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 희석액으로 용해하여, PEDV에 대한 고도 면역혈청을 가한 후 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 검사품으로 한다. 세포변성효과, 혈구흡착 및 혈구응집성에 대하여는 Vero세포, 돼지 신장세포에 검사품 0.1ml씩 분주하여 7일간 배양한 후 검사한다. 세포변성효과는 Vero세포, 돼지 신장세포에서 관찰하고 혈구흡착반응은 기니픽 혈구를 사용하며 혈구응집성은 돼지 혈구를 사용한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과, 혈구흡착 및 혈구응집성이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

바이러스 함량시험은 세포를 이용한 세포변성효과, 간접형광항체법 또는 효소표식면역법으로 검사한다.

3.3.3.1. 세포변성효과 검사법

희석액으로 용해시킨 검사품을 10배 단계 희석하고 단계별 희석액 0.1ml 씩을 단층이 형성된 Vero세포에 접종한 다음 증식용 배양액에 trypsin을 적당량(0.5ug ~ 1ug/ml) 첨가하여 배양한 후 세포변성효과를 7일간 관찰하여 바이러스 감염가를 계산한다.

3.3.3.2. 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test)

- 1) 검사품을 10배단계 희석하여 단층이 형성된 Vero세포에 접종한다.
- 2) 37°C에서 3일간 배양한다.
- 3) PBS로 1회 세척한 다음 100% acetone으로 10분간 고정시킨다.
- 4) PEDV antiserum으로 30분간 반응시킨다.
- 5) PBS로 3회 세척 후 FITC-conjugate를 적당량 희석하여 37°C에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 6) PBS로 세척한 다음 형광현미경으로 검사한다.

3.3.3.3. 효소표식면역항체법

- 1) 검사품을 carbonate coating buffer로 계단 희석하여 ELISA용 Plate에 100 μ l씩 각 well에 넣은 다음 37°C에서 2시간 또는 4°C에서 overnight 시킨다.
- 2) PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 washing한다.
- 3) 1% skim milk가 함유된 PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 37°C에서 30분간 Blocking 시킨다.
- 4) PBS-T 200 μ l를 각 Well에 넣어 3회 washing한다.
- 5) PEDV antiserum을 PBS-T로 적당량 희석하여 200 μ l를 각 well에 넣어 37°C에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 6) PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 washing한다.
- 7) Conjugate는 PBS-T로 적당히 희석하여 각 well당 100 μ l씩 넣어 37°C에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 8) PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 washing한다.
- 9) Citrate buffer에 30% H₂O₂와 substrate를 잘 섞은 50 μ l를 각 well에 넣어 반응시킨다.
- 10) 발색정지제 50 μ l를 각 well에 넣어 발색을 정지시킨 후 흡광도를 측

정한다.

3.3.3.4. 판정

1두분 당 바이러스 함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액에 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin) (부기3)를 동량 가하고 동결건조 후 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 회백색의 건조괴이며 희석액을 넣어 흔들면 쉽게 균등한 투명액이 되며 굵은 입자나 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 재료 및 시험

체중 약 300~350g의 기니픽 4마리, 체중 13~15g의 마우스 10마리 및 생후 4~5주령의 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 항체 음성의 자돈 4마리를 사용한다. 기니픽 4마리는 복강에 2ml를 접종하고 마우스 5마리는 뇌내에 0.03ml, 5마리는 복강에 0.5ml를 각각 접종하고 7일간 관찰한다. 검사품을

1-2-2-06

규정량 희석한 후 돼지 2마리는 10두분을 근육 내에 접종하고 2마리는 무처치 대조로 하여 각각 2주간 관찰한다.

4.7.2. 판정

시험동물은 관찰기간 동안 이상 없이 생존하여야 하며, 시험돼지는 검사품에 기인하는 이상이 인정되지 않아야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 재료 및 시험

생후 4~5주령의 돼지 유행성설사 바이러스에 대한 항체 음성의 자돈 5마리를 사용하여 자돈 3마리에 2주 간격으로 2회 1두분을 근육내 접종한 후 2주 후에 각각 채혈하고 나머지 자돈 2마리는 대조군으로 사용하며 ELISA<별첨>로 검사한다.

4.8.2. 판정

가검혈청을 200배 희석한 접종군과 대조군의 반응이 1.5배 이상 차이가 나야한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

규정된 희석용액으로 용해한 후 1두당 2ml씩 근육 내에 접종한다.

<별첨> 효소표식 면역항체법(enzyme-linked immunosorbent assay)

- 1) 검사품을 carbonate coating buffer로 단계 희석하여 ELISA용 plate에 100 μ l씩 각 well에 넣은 다음 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 또는 4 $^{\circ}$ C에서 overnight시킨다.
- 2) PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 washing한다.
- 3) 1% skim milk가 함유된 PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 blocking시킨다.
- 4) PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 washing한다.
- 5) PEDV antiserum을 PBS-T로 적당량 희석하여 100 μ l를 각 well에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 6) PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 washing한다.
- 7) Conjugate는 PBS-T로 적당히 희석하여 각 well당 100 μ l씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 8) PBS-T 200 μ l를 각 well에 넣어 3회 washing한다.
- 9) Citrate buffer에 30% H₂O₂와 substrate를 잘 섞은 50 μ l를 각 well에 넣어 반응시킨다.
- 10) 발색정지제 50 μ l를 각 well에 넣어 발색을 정지시킨 후 흡광도를 측정한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

α-MEM media	
FBS	5~10 %
Penicillin	100 Unit/ml
Streptomycin	1000 μ l/ml
Amphotericin B	0.0250 μ l/ml

부기2. 세포유지용 배지

α-MEM media	
Penicillin	100 Unit/ml
Streptomycin	100 μ l/ml
Amphotericin B	0.025 μ l/ml
Trypsin(Bovine type III)	1.5~2 μ l/ml
Yeast extract	0.02%
Tryptose phosphate broth	0.3%

부기3. LPGG

Lactose	74.62g
Sodium L glutamate	20g
Gelatin	20g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	1.254g
D.W	적 량

돼지 파보바이러스 불활화백신

Porcine Parvovirus Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 파보 바이러스를 조직 배양세포에 증식시켜 이 바이러스액을 불활화하여 만든 백신이며 돼지 파보바이러스병의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

국내야외의 양돈장으로부터 미이라를 주증으로 이상 분만한 돼지 태아 가검물에서 분리한 PPV-9주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 신장세포 (porcine kidney cell, PK cell)에서 3대 연속 계대한 것을 원종독으로 사용한다. 50%정도 단층을 형성한 3일령 돼지 신장세포에 돼지 파보바이러스를 접종하고 37℃에서 6~7일간 배양하면서 혈구응집(HA)능이 512배/0.05ml 이상이 되었을 때 배양한 바이러스를 3대 연속 계대 배양한 후 바이러스 배양액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

PK 세포에서 배양했을 때 뚜렷한 CPE를 나타내지 않으나 3대 계대후에는 기니 피 혈구응집 역가가 최고 4,096배까지 도달하며, 감염 세포를 염색했을 때 돼지 파보바이러스 특유의 핵내 봉입체를 관찰할 수 있어야한다. 그 외 물리화학적 성상 검사와 전자현미경검사 및 다른 파보바이러스와의 교차 혈구응집억제 반응검사에서 돼지 파보바이러스임을 증명되어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

돼지 파보바이러스의 항체 음성인 15일령 이하의 돼지 신장세포(PK Cell) 및 돼지 고환세포(swine testicle cell)를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

15일령 이하의 돼지의 PK 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 부유시켜서 세포 배양병에 분주하여 37℃에서 50% 정도 단층을 형성할 때까지 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 CPE가 인정되어서는 아니 된다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포가 50%정도의 단층을 형성하였을 때 세포증식용 배지를 제거하고 돼지 파보바이러스 종독을 접종하여 37℃에서 6~7일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 바이러스의 감염배양액의 혈구응집능이 512배/0.05ml 이상에 달할 때 배양액을 수집하여 동결 및 용해과정을 3회 반복시킨 후 각각 10,000rpm에서 30분간 원심 분리하고 이것을 450nm와 200nm의 멤브레인 필터로 여과하여 세균과 세포편을 제거한 후 바이러스 배양액을 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액 검사에 사용하고 나머지는 바이러스 포르말린을 0.5%가되게 가하고 실온(25℃)에서 5일간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적 제제의 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

불활화 전 검사품을 돼지 파보 바이러스의 고도면역 혈청을 동량혼합하고 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 시험재료로 한다. 돼지 신장배양세포 시험관에 각각 10개에 검사품을 0.1ml씩을 접종하여 7일간 배양 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과(CPE) 및 혈구 응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니 된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 전 검사품을 10배 단계 희석하여 각 희석액을 돼지 신장배양세포에 0.1ml씩을 접종하고 37℃에서 7일간 배양한 후 세포 변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{6.5}$ TCID₅₀이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 원심 후 100배 이상 인산완충식염수로 희석시켜 4℃에서 하룻밤 투석한 후 불활화제를 제거하여 시험재료로 한다. 건강한 1~3개월령 돼지 신장세포를 4~7일간 배양한 시험관 또는 조직배양용 plate에서 배양액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩을 10개 이상의 시험관 또는 조직배양용 plate에 접종하고 약 1시간 실온에서 정치한 후 세포유지용 배양액을 가하여 37℃에서 10일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

돼지 신장 배양세포에 세포변성효과(CPE) 및 혈구응집(HA)이 인정되어서는 아니 된다.

3.4. 최종원액

불활화된 바이러스 원액에 수산화 알루미늄겔(Al(OH)₃ gel 10mg/ml)을 10%가 되게 첨가하여 완전한 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제의 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 액체로서 정치하면 상층액은 적황색을 띄나 진탕하면 용이하게 균등한 액이 된다. 이물 또는 이취를 나타내서는 아니 되며, 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 0.2%, thimerosal 0.01%이하이어야 한다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH6.4~7.4 이어야한다.

4.5. 불활화 확인 시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 안전시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 15마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 7마리를 선정하여 사용한다. 돼지는 체중 15~20kg의 건강한 자돈 2마리를 사용한다. 검사품을 마우스는 10마리에는 0.5ml를 복강에, 기니픽 5마리는 2ml를 피하에 접종하고 2마리는 대조로하여 7일간 관찰한다. 시험돼지 2마리에 검사품 5두분씩을 각각 근육 내에 접종하고 4주간 관찰한다.

4.6.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

4.7. 역가시험

4.7.1. 동물 및 시험

안전시험에 사용한 기니픽에 대해 접종 4주 후 접종군 5마리와 대조군 2마리의 혈청에 대하여 HI항체가를 측정한다.

4.7.2. 판정

시험 기니픽에 대한 HI항체가는 80배 이상이어야 하며 대조군은 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

초산돼지는 종부 2~4주 전에 5 ml씩 근육 내에 주사한다.

경산돼지도 이유시에 2ml씩 보강접종 한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Hank's BSS	900ml
Lactalbumin hydrolysate	5g
Penicillin	200IU/ml
Streptomycin	0.2mg/ml
Kanamycin	0.02mg/ml
소혈청	100ml

부기2. 세포 유지용 배지

상기 세포증식용 배지 중 소혈청 대신 우태아 혈청을 2%가 되게 한다.

돼지 뇌심근염 불활화백신

Porcine Encephalomyocarditis Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 뇌심근염 바이러스를 조직배양 세포에 증식시켜 이 바이러스 액을 불활화하여 만든 백신이며 임신 돼지의 뇌심근염 바이러스 감염에 의한 유사산의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

돼지 뇌심근염 바이러스 K3주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정된 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 뇌심근염 바이러스 K3주를 단층이 형성된 BHK-21주화세포(Hamster kidney-21cell)에 접종하고 37℃에서 2~3일 배양한 후 세포변성효과가 약 80% 일어났을 때 바이러스 감염배양액을 -80℃에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

세포증식용 배지(부기1)에 바이러스를 접종하여 37℃에 배양 했을때 세포변성 효과가 일어나며 기니픽, 양 및 사람 “O” 형 혈구에 대해 응집능을 가지며, 포유 마우스뇌내 접종시 2일 내에 폐사한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

햄스터 신장세포(BHK-21)를 사용한다.

3.1.2. 배지

배지는 세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

세포증식용배지(부기1)에 BHK-21세포(hamster kidney-21 cell)를 37℃에서 2~3일 배양후 배양세포의 단층이 형성되었을 때 돼지 뇌심근염 바이러스를 접종하여

37℃에서 2~3일간 배양하면서 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)가 약 80%이상 일어났을 때 수확하여 생산용 종독으로 사용한다.

3.2.1. 세포배양

BHK-21세포를 세포증식용 배지에 부유시켜서 세포 배양병에 분주하여 37℃에서 단층이 형성할 때까지 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 CPE가 인정되어서는 아니 된다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 종독 바이러스를 ml당 $10^{8.0}$ TCID₅₀을 단층세포에 접종한 후 37℃에서 3~4일 회전 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 약 80%이상 출현하였을 때 배양병을 동결 및 용해과정을 3회 반복해서 후 배양액을 무균적으로 수집하여 1,500rpm에 10분간 원심하여 세포편을 제거한 후 상층액을 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 포르말린의 최종농도가 0.2%가 되도록 가한 후 실온에 3시간 진탕하면서 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

불활화 전 검사품을 돼지 뇌심근염 바이러스의 고도면역 혈청을 동량혼합하고 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 시험재료로 한다. 돼지 신장 배양세포 시험관에 각각 10개에 검사품을 0.1ml씩을 접종하여 7일간 배양 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과(CPE) 및 혈구 응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

원액을 10배 단계 희석한 후 BHK-21세포(20만개/ml)에 원액의 희석액별 100 μ l를 96well plate에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2~4일간 배양하면서 CPE를 관찰하여 TCID₅₀을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량이 10^{8.0}TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 동물 및 시험

불활화 한 검사품을 원심하여 인산완충 식염수로 100배이상 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 투석한 후 불활화제를 제거하여 시험재료로 한다. BHK-21 주화 세포를 시험관에 배양하여 단층이 형성되면 배양액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상의 시험관에 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 방치한 다음 세포 유지용 배양배지를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 5일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

BHK-21 배양세포에서 세포변성효과 및 혈구응집성이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화한 바이러스원액에 수산화알루미늄겔 (Al(OH)₃ gel)을 30%가 되게 첨가하여 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주한 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법의 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 액체로서 정치 하면 약간의 침전층이 생기나 진탕하면 용이하게 균등한 액이 된다. 이물 또는 이취를 나타내서는 아니 되며, 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량이 0.2%

이하 이어야 한다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH 6.4~7.4 이어야한다.

4.5. 불활화확인 시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 안전시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 4마리를 선정하여 사용한다. 돼지는 돼지 뇌심근염바이러스에 대한 항체음성의 생후 3개월령(체중 30~40kg) 건강한 자돈 6마리를 사용한다. 검사품을 마우스 5마리에는 피하에 0.5ml씩, 5마리는 복강에 0.5ml씩 각각 접종하고, 기니픽 4마리에는 2.0ml씩을 피하에 접종하여 7일간 관찰한다. 시험돼지 2마리에는 검사품 3두분을, 시험돼지 2마리에는 1두분을 각각 이근부 근육 내에 접종하고, 시험돼지 2마리에는 무처치 대조 돼지로 하여 2주간 관찰한다.

4.6.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

4.7. 역가시험

4.7.1. 동물 및 시험

안전시험에 사용한 1두분 접종돼지와 대조돼지를 사용한다. 안전시험 완료일에 1두분 접종돼지 2마리에 1두분씩 이근부 근육 내에 재접종하고 2주후에 무처치 대조돈 2마리와 함께 채혈하여 혈청을 분리한 후 56℃, 30분간 비동화한다. 비동화한 가검혈청을 α -MEM배지로 2진 희석한 후(200TCID₅₀/0.1ml) 돼지 뇌심근염 바이러스로 각각 동량혼합하여 37℃에서 60분이상 중화시킨후 BHK-21세포 또는 적합한 세포에 접종하여 5일간 세포변성 여부를 관찰한 후 혈청중화항체가를 측정한다. 혈청중화 항체가는 세포변성효과가 억제된 최고 희석배수의 역수를 말한다.

4.7.2. 판정

혈청 중화 항체가는 접종돼지는 64배 이상 이어야하며 대조돼지는 10배 이하의 음성이어야 한다.

1-2-2-08

5. 저장법 및 유효기간

18개월간 유효하다.

6. 사용방법

초산돼지에는 종부2~3주전까지 2주간격으로 2회에 걸쳐 이근부 근육 내에 2.0ml씩 기초백신이 접종된 경산돼지에는 매종부 2주전에 2.0ml씩 주사한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM용해액	100ml
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% Sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM용해액	100ml
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

돼지 파보바이러스 유전자재조합 불활화백신

Porcine Parvovirus Recombinant Subunit Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 파보바이러스의 VP2 단백질을 baculovirus 발현 system을 이용하여 대량생산 한 후 배양액을 불활화하여 만든 subunit 백신이며 돼지파보바이러스 감염증의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

Recombinant baculovirus VP2-BV주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대방법 및 보존

Sf 9(*Spodoptera frugiperda*)세포를 세포증식용 배지(부기1)로 부유시켜 배양 용기에 분주한 다음 27°C에서 4~5일간 배양한다. 배양세포가 단층이 형성 되었을 때 cell scraper를 이용하여 바닥에 부착한 세포를 수집하여 원심분리한다. 상층 액을 버리고 subculture(약 10^6 cell/ml)를 한 다음 1시간 정도 정치배양하여 세포를 부착시킨다. 배양액을 제거하고 세포가 완전히 덮힐 정도로 종독 바이러스를 접종하고 27°C에서 1시간 동안 흡착시킨 다음 새로운 세포증식용 배지를 첨가하여 27°C에서 4~6일간 정치배양하면서 세포변성 효과(cytopathic effect, CPE)가 90%이상 출현하였을 때 감염 배양액(배양 상층액)을 -80°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 정상 및 독력

Sf 9 세포에 종독을 접종하였을 때 재조합 바이러스 특유의 CPE가 나타나야 하며 감염세포의 초음파 파쇄액(또는 동결용해액)은 기니픽 적혈구에 대하여 높은 혈구응집능을 나타내야한다. 그러나 야생형 baculovirus 감염 시와 같은 감염세포 내에 대형의 inclusion body가 출현해서는 아니된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

Sf 9세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

배지는 세포증식용 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

세포증식용 배지에 Sf 9세포를 배양한 후 3~5일 간격으로 계대 배양하여 사용한다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양 세포의 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 제조용 virus 를 cell이 충분히 덮힐 정도의 양(0.1M.O.I , $\text{TCID}_{50}/\text{ml} \times 0.69 = \text{PFU}/\text{ml}$)으로 접종한 후 27°C 에서 1시간 흡착시킨 다음, 접종액을 제거하고 세포증식용 배지를 첨가하여 27°C 에서 4~6일간 정치배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80~90% 이상 출현하였을 때 배양 flask를 가볍게 손바닥으로 두드려 세포를 유리시킨 다음 $2,500\text{rpm}$ 으로 15분간 원심분리하여 감염된 세포를 무균적으로 수확한다. 침전된 세포를 최초 감염 배양액의 1/10되게 PBS(부기2)로 부유한 후 동결 및 용해과정을 3회 반복 실시한다. 이 세포 동결 용해액을 $2,500\text{rpm}$ 에서 15분간 원심분리하여 상층액을 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 기니픽 적혈구를 이용하여 혈구응집시험(haemagglutination test: HA test)를 실시하여 혈구 응집 역가가 5,000 HA unit 이상이 되도록 PBS로 조절한 후 포르말린의 최종농도가 0.2%되게 첨가하고 실온에서 24시간 동안 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 불활화 확인시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 원심하여 100배 이상의 인산완충 식염수로 희석하여 4°C 에서 하룻밤 투석한 후 불활화제를 제거하여 시험재료로 한다. 이 재료를 sf 9 세포

1-2-2-09

또는 재조합 baculovirus에 감수성이 있는 단층이 형성된 곤충세포에 접종하여 27℃에서 7일간 배양한다.

3.3.2.2. 판정

sf 9 배양세포에서 세포변성효과가(CPE) 및 혈구응집이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. VP2 단백질 정량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

수확한 VP2 단백질 용액을 96well plate에 PBS로 2진 희석하여 0.6% 기니픽 적혈구를 동량 가하여 혈구응집 반응시험을 실시하여 역가를 산출한다.

3.3.3.2. 판정

혈구응집역가가 5,000HA unit 이상이 되어야 한다.

3.4. 최종원액

불활화 한 원액에 수산화 알루미늄 겔을 20%되게(겔의 최종농도가 10mg/ml)첨가하여 5시간 이상 완전히 균등액이 되게 잘 흔들어서 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 흔들면 균등한 회백색 액체가 되어야 하며 이물 및 이취가 없고 소분된 병마다 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린의 함량이 0.2% 이하이어야 한다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH6.4~7.4 이어야한다.

4.5. 불활화 확인시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 안전시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 13~15 g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350 g의 건강한 기니픽 11마리를 선정하여 사용한다. 돼지는 15~20kg의 건강한 자돈 2마리를 사용한다. 검사품을 마우스 10마리에는 0.5 두분을 복강에, 기니픽 4마리에는 2두분을 피하에, 5마리에는 1두분을 피하에 각각 접종하고 2마리는 대조로 하여 7일간 관찰한다. 시험돼지 2마리에는 검사품 5두분씩을 각각 근육 내에 접종하고 4주간 관찰한다.

4.6.2. 판정

시험동물은 모두 관찰기간 중 이상없이 생존하여야 한다.

4.7. 역가시험

4.7.1. 동물 및 시험

안전시험에서 1두분을 피하에 접종한 5두 및 대조 2두의 기니픽에 대해 접종 4주 후 혈청을 채취하여 기니픽 적혈구를 이용하여 혈구응집 억제항체를 측정한다.

4.7.2. 판정

시험군 기니픽에 대한 혈구응집억제항체는 160배 이상이어야 하며, 대조군은 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

임신후보돼지는 종부 4주전 및 2주전에 2차에 걸쳐 1두분씩 근육내 접종하며, 경산돼지는 종부 2주전에 1두분을 1회 근육내 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지(1,000ml)

Grace's insect cell culture medium	900ml
Fetal bovine serum	100ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Penicillin	200IU/ml
Kanamycin	100 μ g/ml
Fungizone	2.5 μ g/ml

부기2. PBS(phosphate-buffered saline solution)

NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄ anhydrous	0.2g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ anhydrous	1.15g
D.W	1,000ml

돼지 엔테로바이러스 불활화백신

Porcine Enterovirus Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 엔테로바이러스를 조직 배양세포에 증식시켜 이 바이러스액을 불활화하여 만든 백신이며 돼지 엔테로바이러스 감염증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

국내 야외발생 돼지로부터 분리한 돼지 엔테로바이러스주 (수도, 밀양, 아주, 소신 및 순천주) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

동정시험과 면역원성시험에서 확인된 바이러스를 돼지 신장세포 (PK cell) 또는 재래 흑산양 신장세포 유래 주세포(BGK cell)에서 3~5일간 배양한 후 세포 변성효과(cytopathic effect, CPE)가 약 80% 출현하였을 때 감염조직배양액을 -80℃ 이하에 동결 보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다. 이때 바이러스의 역가는 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 하며 종독의 한계 계대수는 3대이며 3대 이상 계대하여 사용하지 않는다.

2.3. 성상 및 독력

돼지 엔테로바이러스주를 기니픽 및 자돈의 근육 내에 접종하였을 때 기니픽의 경우는 후구가 마비되어 뒷다리를 절면서 움직이는 신경증상이 관찰되며 자돈의 경우는 발열 및 설사 등의 임상증상을 나타내며 질병이 발병하는 것을 관찰할 수 있고 부검시 심한 복막염을 나타내는 것을 볼 수 있다. 또한 이들 enterovirus와 돼지 콜레라 백신바이러스를 동시에 접종하면 예외 없이 발열 및 설사 등의 임상증상을 나타내면서 질병이 발병된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

돼지 enterovirus 항체 음성인 돼지 신장세포 (porcine kidney cell, PK cell)

1-2-2-10

또는 재래 흑산양 신장세포 유래주세포 (Black goat kidney cell, BGK cell)를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

PK 세포 또는 BGK 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 부유시켜서 배양병에 분주하여 37℃에서 2~3일 배양하면서 배양세포의 단층이 형성할 때까지 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 CPE가 인정되어서는 아니 된다.

3.2.2. 바이러스 배양

세포 배양의 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 세포유지용 배지에 1/100량의 돼지 엔테로바이러스를 접종한 후 37℃에서 3~5일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 약 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수집하여 10,000rpm에서 30분간 원심분리하고 이것을 450nm와 200nm의 멤브레인 필터로 여과하여 세균과 세포편을 제거한 후 바이러스 배양액을 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 포르말린의 최종농도를 0.2%가 되게 가하고 37℃에서 48시간 진탕하면서 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입 바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

불활화 전 검사품을 돼지 엔테로바이러스의 고도면역 혈청을 동량혼합하고 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 시험재료로 한다. 돼지 신장배양세포 시험관에 각각 10개에 검사품을 0.1ml씩을 접종하여 7일간 배양 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포변성효과(CPE) 및 혈구 응집성 바이러스의 미입이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 전 검사품을 10배 단계 희석하여 각 희석액을 돼지 신장배양세포에 0.1ml씩을 접종하고 37°C에서 7일간 배양한 후 세포 변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{5.3} \sim 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 원심 후 100배 이상의 인산완충 식염수를 희석시켜 4°C에서 하룻밤 투석한 후 불활화제를 제거하여 시험재료로 한다. 건강한 1~3개월령 돼지 신장세포를 4~7일간 배양한 시험관에서 배양액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩을 10개 이상의 시험관에 접종하고 약 1시간 실온에서 정치한 후 세포유지용 배양액을 가하여 37°C에서 10일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

돼지 신장 배양세포에 세포변성효과(CPE) 및 혈구응집(HA)이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화 된 바이러스 원액에 수산화 알루미늄 겔(Al(OH)₃ gel)을 10%가 되게 가하여 완전히 균등액이 되게 잘 흔들어서 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주한 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 액체로서 정치하면 상층액은 적황색을 띠나 진탕하면 용이하게 균등한 액이 된다. 이물 또는 이취를 나타내서는 아니 되며, 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

1-2-2-10

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 기준의 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 0.2%, thimerosal 0.01%이하이어야 한다.

4.5. 불활화 확인시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 안전시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 마우스 10마리, 체중 300~350g의 기니픽 4마리와 특정 장내 바이러스균에 대한 항체 음성의 2개월령(체중 15kg)자돈 6마리를 사용한다. 검사품을 기니픽 4마리에는 0.5ml씩을 근육 내에 접종하고 마우스 5마리는 뇌내에 0.03ml, 5마리는 0.5ml를 복강에 접종하고 7일간 관찰한다. 자돈 2마리에는 2두분씩을, 2두에는 1두분씩을 각각 근육 내에 접종하고 나머지 2마리는 무처치 대조군으로 하여 14일간 관찰한다.

4.6.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상이 인정되어서는 아니된다.

4.7. 역가시험

4.7.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 기니픽 4마리와 1두분 접종돼지 2마리 및 대조돼지 2마리를 사용한다. 기니픽에는 안전시험이 끝난 7일 후에 검사품 0.5ml씩을 2회 접종하고 7일 후에 체혈한 혈청을 사용하고, 안전시험이 완료한 1두분 접종한 자돈의 혼합혈청과 대조돼지 2마리의 혈청을 사용하여 각각 중화항체가 시험을 실시한다.

4.7.2. 판정

기니픽에 있어서는 중화항체가 2배 이상이 80%에 달하여야 하고 접종돼지의 항체는 10배 이상이어야 하며 대조돼지는 10배 이하의 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

7개월간 유효하다.

6. 사용방법

자돈 및 성돈 공히 4주일 간격으로 2ml(1두분)씩 2회 근육 내에 주사한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM	
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM	
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

돼지 오제스키병 불활화백신

Aujeszky's Disease Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 오제스키바이러스를 유전자재조합하여 작출한 gE 유전자 결손 바이러스를 조직배양 세포에 증식시켜 이 바이러스액을 불활화하여 만든 백신이며 돼지의 오제스키병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

국내에서 분리 작출한 돼지 오제스키 바이러스의 유전자를 재조합하여 작출한 gE유전자 결손 바이러스주(양산 gE음성 주) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

동정시험과 면역원성시험에서 확인된 돼지 오제스키 바이러스를 양산 gE음성주를 돼지 신장유래인 PK15세포(porcine kidney cell, PK 15세포)에 접종하여 후 2~3일간 배양한 후 세포변성효과가 약 80%이상 출현하였을 감염조직배양액을 -80℃ 이하에 동결 보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

백신주는 herpesvirus로서 유전자가 결손되어 있으며, PK15 세포 배양에서 세포 변성 효과(cytopathic effect, CPE)를 나타낸다. 돼지 오제스키 바이러스의 gE음성 확인시험은 gE에 대한 단클론 항체를 이용한 간접효소면역 항체법 시험으로 확인하며 이 때 단클론 항체와는 반응하여서는 아니된다. 돼지에서 병원성이 있을 수 있으니, 돼지등의 감수성 동물에 특별한 주의를 요한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

PK-15(porcine kidney-15 cell)주화세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

1-2-2-11

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

PK15 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 부유시켜서 37℃에서 3~4일간 배양하면서 세포 단층이 형성될 때까지 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포가 세포 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 후 종독을 0.2 M.O.I(multiplicity of infection)접종하고 37℃에서 1시간 흡착한 다음 세포 유지용 배지(부기2)를 넣고 37℃에서 48~72시간 회전배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 감염 세포배양액을 동결 및 용해과정을 3회 반복시킨 후 배양액을 무균적으로 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 37℃에서 하룻밤동안 0.01M BEI (binaryethylenimine)로 불활화 시키고 남아있는 BEI는 멸균 sodium thiosulfate 용액을 첨가하여 중화시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미립바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

불활화 전 검사품을 돼지 오제스키병 바이러스의 고도면역 혈청을 동량 혼합하고 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 시험재료로 한다. 돼지 신장배양세포 시험관에 각각 10개에 검사품을 0.1ml씩을 접종하여 5일간 배양 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

세포 변성효과 및 닭, 돼지 적혈구 응집반응 또는 흡착반응이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 전 검사품을 α -MEM 배지에 10배 단계 희석하여 단층이 형성된 PK15 세포 또는 이와 동등한 감수성이 있는 세포에 37°C에서 5일간 배양하여 CPE를 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함유량은 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 동물 및 시험

불활화 한 원액 일부를 채취하여 멸균된 투석막에 넣고, 4~5°C 냉실에서 인산완충식염액속에 넣고 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 다음 PK 15 세포 또는 이와 동등한 감수성 있는 세포를 37°C에 5일간 배양하여 세포 변성효과 및 적혈구 흡착시험을 실시한다.

3.3.4.2. 판정

조직배양 세포에서 CPE가 인정되어서는 아니되고, 닭, 돼지 적혈구의 흡착이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화 된 바이러스 원액의 75%와 오일부형제(oil adjuvant) (부기3) 25%를오일 혼합 탱크에서 완전히 균등액이 되게 진탕하면서 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주한 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 진탕하면 담홍회백색의 액체로 이물 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2% 이하, 치메로살 함유량은 0.01%이하이어야 한다.

4.4. 불활화 확인시험

1-2-2-11

4.4.1. 동물 및 시험

검사품을 하룻밤 얼린 후 원심하여 보호제를 제거한 후 PK 15세포 또는 이와 동등한 감수성 있는 세포를 37℃에 5일간 배양하여 세포변성효과 및 적혈구 흡착시험을 실시한다.

4.4.2. 판정

조직배양 세포에서 CPE가 인정되어서는 아니되고, 닭, 돼지 적혈구의 흡착이 인정되어서는 아니된다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 15~30g의 건강한 마우스 5마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 4마리, 1.5kg~2.5kg의 건강한 토끼 4마리, 10~40kg의 돼지 오제스키 바이러스에 대한 항체 음성돼지5마리를 사용한다. 검사품을 마우스 5마리는 복강에 0.5ml를, 기니픽 4마리는 피하에 2ml를, 토끼는 피하에 2ml를 각각 접종하고 7일간 관찰한다. 돼지 3마리는 1두분을 근육 내에 접종하고 2마리는 대조로 하여 14일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

모든 시험동물은 관찰기간 중 이상없이 생존하여야 한다.

4.6. gE 항체음성시험

4.6.1. 동물 및 시험

안전시험 완료 7일 후 접종돼지 3마리에 1두분씩 근육 내에 재 접종하고 2주 후에 채혈하고, 혈청을 분리하여 비동화한 후 돼지 오제스키바이러스 당단백 gE항체를 감별할 수 있는 효소결합면역법(ELISA)키트 또는 이와 동등하다고 인정된 것을 사용한다.

4.6.2. 판정

1두분 접종돼지의 혈청에서 돼지 오제스키바이러스 당단백 gE항체가 인정되어서는 아니 되며 대조는 중화항체 음성이어야 한다.

4.7. 역가시험

4.7.1. 동물 및 시험

돼지 오제스키 바이러스 gE항체음성 시험에 사용된 돼지를 사용하여 gE항체 음성시험이 끝나는 날 채혈하여 혈청을 분리한 후 56℃에서 30분간 비동화한

가검혈청을 α -MEM배지로 2배 단계 희석한 후 돼지 오제스키바이러스 (200TCID₅₀/0.1ml)로 동량 혼합하여 37℃에서 12시간 이상 중화시킨 후 PK15 또는 적합한 기타세포에 접종하여 5일간 세포변성여부를 관찰한 후 혈청중화 항체가를 측정한다. 혈청 중화 항체가는 세포변성효과가 억제된 최고 혈청희석배수의 역수를 말한다.

4.7.2. 판정

접종군의 중화 항체가는 각각 1:4 이상 이어야하며, 대조군은 모두 음성이어야한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

돼지 이근부 근육 내에 접종시기에 따라 1마리 당 1.0ml씩 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 부기

Eagle's MEM	80%
Tryptose phosphate broth	10%
Fetal bovine serum	8%
Tylocin(6mg/ml)	0.5%
Penicillin(10,000IU)	1%
Streptomycin(2mg/ml)	0.5%

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM	85%
Lactalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	10%
Fetal bovine serum	3%
Penicillin(10,000IU)	1%
Streptomycin(2mg/ml)	0.5%
Tylocin(6mg/ml)	0.5%

부기3. Oil adjuvant

Mineral oil	93.0%
Span 80	5.7%
Tween 85	1.3%

돼지 콜레라(열병), 돼지단독 생 복합백신

Classical Swine Fever, Swine Erysipelas Compound Vaccine, Live

1. 정의

돼지콜레라 바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 이 바이러스액과 약독 돼지 단독균 배양액을 혼합하여 보호제를 가하여 동결건조한 생 백신이며 돼지 콜레라 및 돼지 단독의 동시예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스 및 균

2.1. 바이러스 및 균주

약독 돼지 콜레라 바이러스 LOM주와 약독 돼지단독균 NL-11주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균독주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 돼지콜레라 바이러스 LOM주

소 태아 신장조직배양세포(부기1)에 종독 배양원액 1/10량을 접종하고 37℃에서 약 5일간 회전배양하여 감염극기에 감염배양액을 -80℃이하에 동결보존 또는 50% 유제액을 동결건조 하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 돼지단독균 NL-11주

균주는 돼지 단독균 배지(부기1)에 접종하여 37℃에서 24~48 시간 배양한 균액을 동결건조하여 4℃이하에 냉암소에 보존하며 1년에 1회 계대배양 한다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. 돼지콜레라 바이러스 LOM주

소 태아 신장 조직배양 세포에 종독을 접종하였을 때 잘 감염되며 접종 5일 뒤에도 세포변성효과가 일어나지 않는다. 건강한 돼지 근육 내에 종독을 접종하였을 때 경미한 발열 이외에 하등의 이상이 인정되지 않고 강력한 면역이 형성된다.

2.3.2. 돼지단독균 NL-11주

돼지 단독균의 일반성상을 가지며 0.02% 아크리프라빈(acriflavine) 배지에서 발육되는 내성균주이며 체중 15g 정도의 마우스와 돼지에 대해서는 병원성 없이 강력한 면역이 형성된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 돼지 콜레라 바이러스

3.1.1.1. 세포

3-2-1-01 돼지 콜레라 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.1.1.2. 배지

3-2-1-01 돼지 콜레라 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.1.1. 돼지 단독균

3.1.2.1. 배지

3-2-1-01 돼지 단독 생백신의 3.1에 따른다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 돼지 콜레라 바이러스

3.2.1.1. 세포배양

3-2-1-01 돼지 콜레라 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.1.2. 바이러스 배양

3-2-1-01 돼지 콜레라 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.1.3. 바이러스 수확

3-2-1-01 돼지 콜레라 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.2.2. 돼지 단독균

3.2.2.1. 종균배양

3-2-1-01 돼지 단독 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.2.2. 본배양

3-2-1-01 돼지 단독 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.3. 집균

3-2-1-01 돼지 단독 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 돼지콜레라 바이러스

3.3.1.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 따른다.

3.3.1.2. 미입바이러스 부정시험

3-2-2-01 돼지 콜레라 생백신의 3.3.3.2에 의한 검사에 따른다.

3.3.1.3. 바이러스함량 시험

3-2-2-01 돼지 콜레라 생백신의 3.3.3.3에 의한 검사에 따른다

3.3.2. 돼지 단독균

3.3.2.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따라 혼합 현탁액의 도말 염색표본에서 돼지 단독균 이외의 균이 검출되어서는 아니된다.

3.3.2.2. 생균수시험

3-2-1-01 돼지 단독 생백신의 3.3.2에 의한 검사에 따른다.

3.3.2.3. 동정시험

3-2-1-01 돼지 단독 생백신의 3.3.3에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액의 35%와 돼지 단독 균수를 조정한 원액 45%에 보호제(부기1)를 20%비율로 가하여 균등액이 되도록 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 회갈색의 건조괴로서 희석액을 넣어 흔들면 균등한 현탁액이 되며 굵은 입자나 이물 이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 균수시험

4.5.1. 재료 및 시험

1-2-2-12

3.3.2.2에 의한 검사에 따른다.

4.5.2. 판정

검사품 1ml중에 함유하는 평균 생균수는 4×10^8 개 이상이어야 한다.

4.6. 미입바이러스 부정시험

3.3.1.2에 의한 검사에 따른다.

4.7. 바이러스 함량시험

3.3.1.3에 의한 검사에 따른다.

4.8. 안전시험

4.8.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리, 기니픽 4마리 및 체중 35~40kg의 돼지콜레라 바이러스 및 돼지단독 항체 음성인 건강한 돼지 4마리를 사용하여, 검사품을 마우스 30마리에 20마리는 돼지 1두분의 1/10 용량씩 피하 접종하고, 10마리는 대조로 하여 14일간 관찰하며 기니픽 4마리에 0.5ml를 복강에 접종하고 7일간, 시험돼지 2마리에 1두분씩을 각각 근육 내에 접종하고 2마리는 대조로 하여 21일간 관찰한다.

4.8.2. 판정

모든 시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

4.9. 역가시험

4.9.1. 돼지콜레라

4.9.1.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 돼지 4마리를 채혈하여 중화항체가를 측정한다.

4.9.1.2. 판정

시험돼지의 중화항체가는 4배 이상이어야 하고 대조돼지는 음성이어야 한다.

4.9.2. 돼지단독

4.9.2.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 마우스의 접종군과 대조군에 *E. rhusiopathiae* 100MLD/0.2ml을 각각 피하에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.9.2.2 판정

시험품 접종군은 80% 이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

규정된 희석액으로 희석하여 1ml씩 이근부 또는 대퇴부 근육내에 접종한다. 1차 접종은 5~6주령, 2차 접종은 8~9주령, 3차 접종은 2차 접종 6개월 후, 보강접종은 매년 1회 실시한다.

1-2-2-12

<부 기>

부기1. 보호제 LPGG

Lactose	74.6g
Monopotassium phosphate	0.51g
Dipotassium phosphate	0.85g
Monosodium L-glutamate	10.0g
Gelatin	7.50g
D.W	1,000ml

돼지 유행성설사, 돼지 전염성위장염 불활화 혼합백신

Porcine Epidemic Diarrhea, Transmissible Gastroenteritis Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

돼지 유행성설사 및 돼지 전염성위장염 바이러스를 각각 조직배양세포에 증식시켜 바이러스를 불활화한 후 유성부형제(oil adjuvant)와 혼합하여 만든 백신이며, 돼지 유행성설사 및 돼지 전염성위장염 바이러스 설사병의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

2.1.1. 돼지 유행성설사 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)

돼지유행성설사바이러스는 SM98P주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.1.2. 돼지전염성위장염바이러스(transmissible gastroenteritis virus, TGEV)

돼지전염성위장염바이러스는 175L주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 돼지 유행성설사 바이러스

PEDV를 단층이 형성된 Vero세포에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양하면서 세포변성효과가 80%이상 출현 하였을 때 세포감염배양액을 수집 원심분리하여 상청액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 돼지전염성위장염바이러스

TGEV를 단층이 형성된 돼지고환세포(swine testicle cell, ST cell)에 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양하면서 세포변성효과가 80%이상 출현 하였을 때 세포감염배양액을 채득 원심분리하여 상청액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. 돼지 유행성설사 바이러스

PEDV는 Vero세포에서 110대 계대한 바이러스로서 강병원성을 유지하고 있으며 항체음성의 자돈에 경구투여시 심한 설사와 폐사를 일으킨다. Vero 세포에 접종할 경우 접종 2일째부터 특이적인 합포체를 형성하며 바이러스의 증식성은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.2. 돼지 전염성위장염바이러스

TGEV는 ST세포에서 34대 계대한 바이러스로서 강병원성을 유지하고 있으며 항체음성의 자돈에 경구투여시 심함 설사와 폐사를 일으킨다. ST 세포에 접종할 경우 접종 2일째부터 특이적인 합포체를 형성하며 바이러스의 증식성은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

PEDV 및 TGEV 배양에는 Vero 세포 및 ST 세포를 각각 사용한다.

3.1.2. 배지

세포 증식용배지(부기1) 및 세포 유지용배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 돼지 유행성설사 바이러스

3.2.1.1. 세포배양

Vero세포를 0.25% trypsin액으로 소화시켜 분산된 조직세포를 세포증식용 배지에 희석하여 3~5일간 37℃에서 배양하여 세포단층이 완전하게 형성될 때까지 배양한다.

3.2.1.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 완전하게 형성되었을 때 세포증식용배지를 제거하고, 세포 증식용배지에 PEDV 0.1 M.O.I(multiplicity of infection) 접종하여 37℃에서 1시간 감작한 후 세포유지용 배지(부기2)를 가하여 37℃에서 3~4일간 배양한다.

3.2.1.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 세포변성효과가 80%이상 출현했을 때 상층액을 무균적으로 수집하여 3,000rpm에 20분간 원심하여 상층액을 수확한다.

3.2.1.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 0.1M BEI(부기3)을 100배 희석하여 최종 농도가 1mM 되도록 하고 37°C에서 약 18시간 동안 magnetic bar로 교반하면서 불활화 시킨 다음, 4°C에서 냉각시킨 후 2M sodium thiosulfate(부기 4)를 최종농도 2mM이 되도록 첨가하여 BEI를 중화시킨다. 이후 1% thimerosal용액의 최종농도가 0.01% 되도록 가하여 2~7°C의 냉실에 보존한다.

3.2.2. 돼지 전염성위장염바이러스

3.2.2.1. 세포배양

ST세포를 0.25% trypsin액으로 소화시켜 분산된 조직세포를 세포증식용 배지에 희석하여 3~5일간 37°C에서 배양하여 세포단층이 완전하게 형성될 때까지 배양한다.

3.2.2.2. 바이러스 배양

세포를 3~5일간 37°C에서 배양하여 세포단층이 완전하게 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 후, TGEV를 0.1 M.O.I 접종하여 37°C에서 1시간 감작 배양한 후 세포유지용 배지(부기2)를 가하여 37°C에서 3~4일간 배양한다.

3.2.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 세포변성효과가 80%이상 출현했을 때 상층액을 무균적으로 수집하여 3,000rpm에 20분간 원심하여 상층액을 수확한다.

3.2.2.4 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 0.1M BEI (부기3)를 100배 희석하여 최종 농도가 1mM 되도록 하고 37°C에서 약 18시간 동안 magnetic bar로 교반하면서 불활화 시킨 다음, 4°C에서 냉각시킨 후 2M sodium thiosulfate (부기 4)를 최종농도 2mM이 되도록 첨가하여 BEI를 중화시킨다. 이후 1% thimerosal용액의 최종농도가 0.01% 되도록 가하여 2~7°C의 냉실에 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미립바이러스 부정시험

3.3.2.1. 돼지 유행성설사 바이러스

3.3.2.1.1. 재료 및 시험

1-2-2-13

검사품을 희석액으로 용해하여 PEDV에 대한 고도 면역혈청을 가한 후 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 시험재료로 한다. 세포변성효과, 혈구흡착 및 혈구응집성에 대하여는 Vero세포, 돼지 신장배양 세포에 0.1ml 씩을 분주하여 7일간 배양한 후 검사한다. 세포변성효과는 Vero세포, 돼지 신장세포에서 관찰하고 혈구흡착반응은 기니픽 혈구를 사용하며 혈구 응집성은 돼지혈구를 사용한다.

3.3.2.1.2. 판정

각각의 바이러스에 의한 세포변성효과가 인정되어서는 아니된다.

3.3.2.2. 돼지 전염성위장염바이러스

3.3.2.2.1. 재료 및 시험

검사품을 용해하고, 돼지 전염성위장염 바이러스에 대한 고도면역혈청을 동량 가하여 37℃에서 1시간 감작하여 중화된 것을 시험재료로 한다. 돼지 신장 배양세포 10개에 검사품 0.1ml씩을 분주하여 7일간 관찰하여 이 기간 중 세포변성효과, 7일령의 닭 혈구(0.1v/v%)를 흡착하거나 응집시키는 미립 미생물의 혼입여부를 검사한다.

3.3.2.2.2. 판정

세포변성효과 또는 혈구응집성 바이러스의 미립이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 돼지 유행성설사 바이러스

3.3.3.1.1. 재료 및 시험

검사품을 세포유지용 배지에 10배 단계적으로 10^{-8} 까지 희석하고 단계별 희석액 0.1ml씩을 단층이 형성된 Vero세포에 접종한 다음 증식용 배양액에 trypsin을 적당량 첨가하여 배양한 후 세포변성효과를 7일간 관찰하여 바이러스 감염가를 계산한다.

3.3.3.1.2 판정

바이러스 함량은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml이상이어야 한다.

3.3.3.2. 돼지 전염성위장염바이러스

3.3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 세포유지용 배지에 10배 단계적으로 10^{-8} 까지 희석하고 각 희석액의 0.1ml씩을 4~5일 배양한 돼지 고환 또는 돼지 신장 배양세포 시험

개 이상에 접종하고, 37℃에서 4일 이상 배양한 후 세포변성효과(CPE)를 관찰하여 바이러스 함량을 계산한다.

3.3.3.2.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품의 일정량을 투석막에 넣고 4℃에서 검사품 용량의 100배 이상의 인산완충식염수(PBS)로 희석하여 하룻밤 투석한 후 불활화제를 제거하여 시험재료로 한다. 시험재료를 Vero세포와 ST세포의 배양세포에 0.1ml씩 각각 접종하고 37℃에서 약 1시간 방치한 후 세포유지용 배지를 가하여 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

각각의 배양세포에서 돼지 유행성설사 바이러스 또는 돼지 전염성위장염 바이러스 및 특이 세포변성효과(CPE)가 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화 된 PEDV원액 25%와 TGEV원액 25%의 비율로 각각 혼합한 다음 동량의 보호제(Montanide IMS 1313 NPR)를 가하여 1,000rpm에서 30분간 혼합한 후 균등액이 되게 진탕하면서 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 정치 시 침전층이 생기지 않거나 또는 약간의 침전층이 생기는 경우 즉시 진탕하면 균질화 되는 유성액체로서 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 치메로살 함유량은 0.01% 이하이어야 한다.

4.4. 불활화 확인시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 재료 및 시험

체중 15~20g의 마우스 10마리, 체중 300~350g의 기니픽 5마리, 돼지 유행성 설사 및 돼지 전염성위장염 바이러스 항체음성인 체중 15~20kg의 돼지 2마리를 사용한다. 검사품을 마우스 8마리는 0.5ml씩 각각 복강에 접종, 기니픽 4마리에는 2.0ml씩 각각 복강에 접종 후 7일간 관찰하고, 돼지 2마리에는 2두분(6.0ml)씩을 이근부 근육 내에 각각 접종하고 14일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

시험동물은 모두 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 300~350g의 기니픽 12마리를 사용한다. 기니픽 10마리에는 검사품을 1.0ml씩 근육 내에 주사하고 3주후에 다시 1.0ml씩 재접종한 후 2주 후에 대조군 2마리와 함께 채혈하여 돼지 유행성설사바이러스 및 돼지 전염성위장염 바이러스 각각에 대한 중화항체를 측정한다. 중화시험에서는 가검혈청을 56°C에서 30분 동안 비동화한 혈청을 사용한다. 비동화된 혈청을 세포증식용배지(단. 소태아혈청 비첨가)로 microplate에서 2배 단계 희석한다. 계단희석된 혈청희석액 0.1ml와 200TCID₅₀/0.1ml가 되도록 희석한 후 PED바이러스 및 TGE바이러스 0.1ml씩을 동량 혼합하여 37°C에서 1시간 감작한다. 세포증식용배지에 20만개/ml로 조정된 세포를 micro-plate well당 0.1ml씩 넣어 7일간 배양한다. 결과는 현미경으로 관찰하여 CPE를 저지한 최고혈청 희석배수를 역가로 나타낸다.

4.6.2. 판정

돼지 유행성설사바이러스 및 돼지 전염성위장염에 대한 중화항체는 접종동물의 80% 이상이 8배 및 64배 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

모돈은 1차 접종을 매 분만 5~7주 전에, 2차 접종은 매 분만 2~3주전에 실시하며, 후보돈은 3주 간격으로 2회 이근부 근육 내에 1두분(3ml)씩 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

α-MEM	880ml
소혈청	100ml
Lactalbumin Hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2 mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200 IU/ml
Kanamycin	0.02 mg/ml
Fungizone	0.025 μg/ml
7.5%중조	20ml
(pH7.0-7.4로 조정)	

부기2. 세포유지용 배지

α-MEM	980ml
Trypsin(1:250 trypsin)	
PEDV 용	10μg/ml
TGEV 용	5μg/ml
Lactalbumin Hydrolysate	5g
Streptomycin 50mg solution	0.2mg/ml
Penicillin 20,000IU solution	200IU/ml
Kanamycin	0.02mg/ml
7.5%중조	20ml
(pH7.0-7.4로 조정)	

부기3. 0.1M BEI 용액

2-Bromoethylamine hydrobromide(BEA, sigma B 9258) 100g을 37℃로 가열한 0.2N NaOH 용액에 0.1M농도가 되도록 BEA를 용해한 후 37℃ 항온수조에 서 1시간 동안 잘 흔든다(BEI 용액).

부기4. 2M sodium thiosulfate 용액

Sodium thiosulfate	31.62g
D.W	100ml

여 백

1-3 답

여 백

닭 마이코플라스마병 불활화 유성백신

Avian Mycoplasmosis Vaccine, Inactivated(Oil)

1. 정의

닭 마이코플라스마 배양 균액을 불활화하고 유성보존제를 첨가하여 만든 백신이며 닭의 마이코플라스마병의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Mycoplasma gallisepticum A5969주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Mycoplasma균을 PPLO 액체배지 또는 Frey's broth(부기1)에 3~5일간 단계별로 계대배양한 배양액을 -80℃에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Frey's 한천배지(부기2)에 균을 접종하여 10%의 CO₂가 함유된 37℃배양기에서 2주 동안 배양하면서 집락형태를 확인한다. 균의 집락은 mycoplasma 특유의 성장(fried egg)을 나타낸다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Frey's 한천배지 및 PPLO 액체배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 균주를 식염수로 용해하여 Frey's 한천배지에 이식하여 10%의 CO₂가 함유된 37℃배양기에서 5-7일간 배양 후 mycoplasma균의 전형적인 단독집락을 선택하여 PPLO broth배지에 이식하여 37℃에서 3일간 배양(배지의 색이 노랗게 변하는 시점)한 배양액을 6일령 발육란의 난황 내에 접종하여 30시간 배양한 후 난황을 채취하여 종균으로 사용한다.

3.2.2. 본배양

본배양은 PPLO broth배지를 배양병(3,000ml)에 병당 2,000ml 분병하여 12

1-3-1-01

1℃에서 15분간 고압멸균한 배양기에 종균배양액을 10ml(종균배양액 5%)씩을 이식하여 37℃에서 24~48시간 배양한다.

3.2.3. 집균

각각 균 배양기의 집균 혼입유무를 확인하고 오염이 없는 배양액을 고속원심기를 이용하여 10,000g에서 30분간 원심하여 집균한다. 집균된 마이코플라스마 항원을 pH 7.2의 인산완충식염수로 20분간 2회 원심세척 한 후, 항원농도조정(1%균 용액 만듦)후 일부를 채취하여 원액검사용으로 사용하고 나머지를 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

항원농도조정 후 pH 7.0~7.5에서 1% β -propiolactone으로 3시간 동안 불활화, 또는 포르말린을 0.3% 되게 하여 37℃에서 3일간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 한 항원액을 선택배지에 이식하고 37℃에서 7일간 배양하여 균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조정

불활화 전 집균된 균액을 각각 10배 단계 희석하여 PPLO agar 배지에 각 희석액별로 접종하여 균수함량을 측정한다. 균수가 7×10^8 /ml 이상 되도록 균액농도를 조정한다.

3.4.2. 항원혼합

균농도를 조정한 후 불활화된 항원 50%와 유성보존제(부기3) 50%를 가하여 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제의 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 있으며 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.1%이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

마이코플라스마 갈리셉티쿰에 감수성이 있는 3~4주령 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 각각 시험계에 검사품 1마리 분량을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 21일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다. 사고계(검사품의 주사와 관계없는 병 또는 장애 등으로 판정이 곤란한 것)가 생겼을 때는 이를 제외하고 판정한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 시험계 및 대조계를 시험동물로 한다. 검사품 접종 21일후에 시험계와 대조계에 공격용 마이코플라스마 갈리셉티쿰 배양액을 안와하동으로 공격접종하고 7일간 이상유무를 관찰한다.

4.5.2. 판정

대조계는 80% 이상이 만성 호흡기병의 증상을 보여야 하며 시험계는 70% 이상이 만성 호흡기병의 증상을 보이지 않아야 한다.

1-3-1-01

5. 저장법 및 유효기간

18개월간 유효하다.

6. 사용방법

5주령 이상의 닭에 0.5ml을 대퇴부 근육 내에 1차 접종하고, 2차 접종은 6-8주 후에 한다.

※ 주의

- 백신 접종 전에 실온에서 잘 흔들어서 사용한다.
- 육용닭에는 사용하지 않으며 건강한 닭에만 접종한다.
- 백신 접종 닭은 3개월 이후에 도계하여야 한다.

<부 기>

부기1. Frey's medium

Mycoplasma broth base	22.5g
Phenol red	0.025g
Dextrose(D-glucose)	3g
Thallium acetate	1g
Penicillin G	100,000 unit
Swine serum	100ml
D.W	900ml
pH 7.8	

부기2. Frey's agar 부기 1에

Bacto agar	15g
15Lb 15분 고압멸균	

부기3. 유성보존제

Tween 85	1.3%
Span 80	5.7%
Mineral oil	93.0%

가금티푸스 불활화백신

Fowl Typhoid Vaccine, Inactivated

1. 정의

살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*) 배양 균액을 불활화하고 수산화 알루미늄 겔을 첨가하여 만든 백신이며 닭의 가금티푸스 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Salmonella gallinarum 야외분리균 92-146주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Tryptic soy agar(TSA)37℃에서 24시간 배양한 후, 단독집락을 선택하여 tryptic soy broth배지에 계대배양하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Salmonella gallinarum 야외분리균 92-146주에 대하여 dulcitol 및 maltose 당분해능과 D-tatrate 이용능에서의 양성반응 및 ornithine 이용능 및 운동성에서 음성반응을 확인한다. 또한 *salmonella serogroup D₁* 표준항혈청과의 평판응집반응에서 강한 응집괴의 형성을 확인한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

TSA 또는 TSB를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 균주를 TSA에 이식하여 37℃에서 24시간 배양 후, 집락을 선정하여 TSB에 이식하고 이를 37℃에서 24시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

제조용 agar배지를 룩스병(1000ml) 1개당 200ml씩 분병하고 121℃에서 고압멸균 후 각 룩스병에 종균배양액을 5ml씩 이식하고 37℃에서 48시간 배양한다.

3.2.3. 집균

집균을 위하여 룩스병에 적당량의 멸균된 인산완충생리식염수(부기 1)와 초자구를 함께 넣고 흔들어서 완전히 집균한다. 집균된 균액은 120목 동망 및 3겹 가제에 통과시켜 한천편을 제거한 다음, 균괴의 세분과 균질화를 위하여 초자구를 넣은 용기에서 흔들어서 진탕하고 집균액의 일부를 취하여 동정 및 균수 측정에 사용하고 나머지를 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

집균된 원액을 항원농도조절 후 포르말린을 0.3%되게 처리하여 37℃에서 3일간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화한 항원액을 선택배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

집균된 액을 각각 10배 단계 희석하여 tryptic soy agar에 각 희석액 별로 접종하여 균수함량을 측정한다. 균수가 5×10^9 개/ml 이상 되도록 농축기 등을 이용하여 균 농도를 조정한다.

3.4.2. 항원혼합

균 농도를 조정한 후 불활화 된 항원 80%와 수산화 알루미늄겔 20%를 가하여 잘 흔들어서 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색 또는 회백색의 부유액으로서 이물질 또는 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에서 포르말린 0.3%이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 마우스 20마리를 선정하여 16마리는 접종군으로, 4마리는 대조군으로 한다. 접종 마우스 16마리 중 8마리는 검사품 0.2ml을 복강에 접종하고 8마리는 검사품 0.2ml을 피하에 접종하여 4마리는 대조군으로하여 14일간 관찰한다. 그리고 살모넬라 갈리나룸에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 10마리를 사용하여 5마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품 2마리분을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 14일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 시험 마우스 및 닭은 시험기간 중 접종반응 없이 생존내과 하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 마우스 30마리를 공시하여 20마리는 접종군으로, 10마리는 대조군으로 한다. 접종군 마우스에 검사품 0.2ml을 복강에 접종하고, 대조군은 무처리하여 2주 후 병원성 살모넬라 갈리나룸 배양균액 0.2ml($10^{8.0}$ MLD 2×10^8 /0.2ml)을 복강에 주사하여 10일간 생존여부를 관찰한다. 그리고 살모넬라 갈리나룸에 감수성 있는 6-8주령 닭 10마리를 사용하여 5마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 1마리분을 근육내에 주사하고 3주후에 대조계와 함께 채혈하여 응집항체를 측정한다.

4.5.2. 판정

검사품 접종 마우스는 70%이상 생존하여야 하며 대조군은 80%이상 폐사하여야 한다. 그리고 시험닭은 마이크로플레이트 방법<별첨>에 준하여 응집항체가를 측정하며 시험계는 2배 이상이 80%, 대조계는 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

18개월간 유효하다.

6. 사용방법

가금티푸스 불활화백신 접종 전 1차접종 목적으로 사용되며, 닭 경부피하 또는 앞가슴 근육내에 0.5ml씩 접종한다.

1-3-1-02

<별첨> 마이크로플레이트 방법

1) 응집시험용 항원제조

살모넬라 갈리나룸균을 순수배양하여 불활화 한 균액을 고속원심기(1,300rpm)으로 집균하고 집균된 균체는 1% 포르말린 첨가 인산완충식염수로 MacFarland scale No. 4가 되게 농도조절을 한다.

2) 응집항체가 측정방법

1) 96well microplate를 사용한다.

2) 인산완충식염수를 50 μ l씩 모든 well에 넣는다.

3) 피검혈청을 50 μ l씩 넣고 2배 계단 희석시킨다.

4) 제조된 응집용 항원을 모든 well에 50 μ l씩 넣는다.

5) 37 $^{\circ}$ C에서 overnight시킨 후 응집반응이 일어나는 혈청응집가를 측정한다.

<부 기>

부기1. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.19g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W	1,000ml
pH 7.2	

가금티푸스 불활화 유성백신

Fowl Typhoid Vaccine, Inactivated(Oil)

1. 정의

살모넬라 갈리나룸 (*Salmonella gallinarum*) 배양 균액을 불활화하고 유성보존제를 가하여 만든 백신이며 닭의 가금티푸스 예방에 사용한다.

2. 사용균

2.1. 균주

Salmonella gallinarum 야외분리균 92-146주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Tryptic soy agar(TSA)배지에 이식하여 37℃에서 24시간 배양한 후, 단독집락을 선택하여 tryptic soy broth(TSB)배지에 계대배양하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Salmonella gallinarum 야외분리균 92-146주는 dulcitol 및 maltose 당분해능과 D-tatrate 이용능에서의 양성반응과 ornithine 이용능 및 운동성에서 음성반응을 확인한다. 또한 *Salmonella* serogroup D1 표준항혈청과의 평판응집반응에서 강한 응집괴의 형성을 확인한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

TSA 또는 TSB를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 균주를 TSA에 이식하여 37℃에서 24시간 배양 후 집락을 선정하여 TSB에 이식하고 이를 37℃에서 24시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

제조용 agar배지를 룩스병(1000ml) 1개당 200ml씩 분병하고 121℃에서 고압 멸균 후 각 룩스병에 종균배양액을 5ml씩 이식하고 37℃에서 48시간 배양한다.

3.2.3. 집균

집균을 위하여 룩스병에 적당량의 멸균된 인산완충생리식염수(부기 1)와 초자구를 함께 넣고 흔들어서 완전히 집균한다. 집균된 균액은 120목 동망 및 3겹 가체에 통과시켜 한천편을 제거한 다음, 균괴의 세분과 균질화를 위하여 초자구를 넣은 용기에서 흔들어서 진탕하고 집균액의 일부를 취하여 동정 및 균수 측정에 사용하고 나머지를 불활화 시킨다.

3.2.4. 불활화

집균된 원액을 항원농도조절 후 포르말린을 0.3%되게 처리하여 37℃에서 3일간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화한 항원액을 선택배지에 이식하여 37℃에서 2일간 배양하여 균의 발육여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. 항원농도조절

집균된 액을 각각 10배 단계 희석하여 tryptic soy agar에 각 희석액별로 접종하여 균수함량을 측정한다. 균수가 1×10^{10} 개/ml 이상 되도록 농축기 등을 이용하여 균농도를 조정한다.

3.4.2. 항원혼합

균농도를 조정한 후 불활화 된 항원 50%와 유성보존제(부기2) 50%를 가하여 잘 흔들어서 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여

불전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색 또는 회백색의 부유액으로서 이물질 또는 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에서 포르말리 0.3%이하, 치메로살은 0.01%이하, 페놀은 0.5%이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 마우스 20마리를 선정하여 16마리는 접종군으로, 4마리는 대조군으로 한다. 접종 마우스 16마리 중 8마리는 검사품 0.2ml을 복강에 접종하고 8마리는 검사품 0.2ml을 피하에 접종하여 4마리는 대조군으로하여 14일간 관찰한다. 그리고 살모넬라 갈리나룸에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 10마리를 사용하여 5마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품 2마리분을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 14일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

관찰기간 중 주사반응이 없이 생존내과하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 마우스 30마리를 공시하여 20마리는 접종군으로, 10마리는 대조군으로 한다. 접종군 마우스에 검사품 0.2ml을 복강에 접종하고, 대조군은 무처리하여 2주 후 병원성 살모넬라 가리나룸 배양균액 0.2ml(10MLD 2×10^8 /0.2ml)을 복강에 주사하여 10일간 생존여부를 관찰한다. 그리고 살모넬라 갈리나룸에 감수성 있는 6-8주령 닭 10마리를 사용하여 5마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 1마리분을 근육내에 주사하고 3주후에 대조계와 함께 채혈하여 응집항체를 측정한다.

4.5.2. 판정

검사품 접종 마우스는 70%이상 생존하여야 하며 대조군은 80%이상 폐사하여야 한다. 그리고 시험닭은 마이크로플레이트 방법<별첨>에 준하여 응집항체가를 측정하며 시험계는 2배 이상이 80%, 대조계는 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

18개월간 유효하다.

6. 사용방법

1차 가금티푸스 불활화 겔(gel)백신 접종 후 보강접종 목적으로 닭 경부피하 또는 앞가슴 근육 내에 0.5ml씩 접종한다.

1-3-1-03

<별첨> 마이크로플레이트 방법

1) 응집시험용 항원제조

불활화가 완전히 끝난 배양균액을 고속원심기(1,300rpm)으로 집균하고 집균된 균체는 1% 포르말린 첨가 인산완충식염수로 MacFarland scale No. 4가 되게 농도조절을 한다.

2) 응집항체가 측정방법

1) 96-well microplate를 사용한다.

2) 인산완충식염수를 50ul씩 모든 well에 넣는다.

3) 피검혈청을 50ul씩 넣고 2배 계단희석시킨다.

4) 제조된 응집용 항원을 모든 well에 50ul씩 넣는다.

5) 37°C에서 overnight시킨 후 응집반응이 일어나는 혈청응집가를 측정한다.

<부 기>

부기1. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.19g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W	1,000ml
pH 7.2	

부기2. 유성보존제

Tween 85	1.3%
Span 80	5.7%
Mineral oil	93.0%

뉴캐슬병 생백신

Newcastle Disease Vaccine, Live

1. 정의

약독 뉴캐슬병 바이러스를 계태아에 증식시켜 감염 계태아 뇨막강액을 동결건조한 생백신이며 뉴캐슬병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 뉴캐슬병 바이러스인 B₁주나 La Sota주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~10 일령의 SPF (specific pathogen free) 발육계란의 뇨막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/ml 희석한 바이러스액 0.2ml를 접종하여 37°C 부란기에서 72시간 배양 후 채취한 뇨막액을 -70°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

제조용 바이러스주에 따라 다소 차이가 있으나 일반적인 뉴캐슬병 바이러스 (B₁ 및 La Sota)주는 9~10일령의 SPF 발육계란에 접종하였을 때 48시간 이내에는 계태아를 죽이지 못한다. 바이러스는 병아리의 뇌 내에 접종 하거나 6주령의 병아리 정맥 내에 접종하였을 경우에도 병원성이 없다. 발육계란에 배양된 바이러스는 닭적혈구를 응집할 수 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

보존된 중독바이러스를 PBS(부기1)로 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/ml되게 희석하여 9~10일령의 SPF 발육계란의 뇨막강(allantoic cavity)내에 0.1ml씩 접종한다. 바이러스 접종 역가는 제조용 바이러스주에 따라 다를 수 있다.

3.2.2. 바이러스 배양

접종한 발육계란은 37~38℃ 부란기에서 3~4일간 배양한다. 접종 후 24시간 후에 검란하여 죽은 부화란은 버린다.

3.2.3. 바이러스 수확

배양한 후 검란하여 살아있는 발육계란을 4℃의 냉장실에서 12시간 이상 냉각한 후 바이러스 감염 뇨막액을 혈액이 혼입되지 않도록 주의하면서 무균적으로 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

뉴캐슬병 바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 검사품의 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 검사품 0.2ml에 10마리분의 용량이 되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모뇨막과 뇨막강 및 6일령 발육계란의 난황 내에 각각 0.2ml씩 접종한다. 용모뇨막 및 뇨막강 접종란은 5일간, 난황 내 접종란은 8일간 37℃에서 배양한 후 계태아의 병변 및 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 단, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외한다.

3.3.2.2. 판정

계태아는 모두 정상 발육하고 뇨막강액의 적혈구 응집성과 용모뇨막상에 포크형성이 없어야 한다.

3.3.3. 바이러스함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10배 단계 희석한다. 이 각각의 희석액을 5개 이상의 9~11일령 SPF 발육계란의 뇨막강 내에 0.1ml씩 접종한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 뉴캐슬병 바이러스에 의한 폐사임을 확인하고 5일 후에 생존한 것에 대하여는 뇨막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 닭 적혈구를 응집하는 것을 양성으로 인정하여 EID₅₀을 산출한다.

1-3-2-01

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{5.0}$ EID₅₀ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기2)를 적당량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조피로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 흡습도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 미립바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다. 단 검사품은 37℃에서 5일간 보존한 것을 사용한다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 초생추 접종시험

4.7.1.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 1~2주령의 닭 25마리를 사용한다. 시험계에 검사품의 권장접종량의 10배를 사용법에 따라 접종하고 21일간 관찰한다.

4.7.1.2. 판정

90% 이상이 건강하여야 한다.

4.7.2. 중추 접종시험

4.7.2.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장 접종량을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 14일간 관찰한다.

4.7.2.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.8 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 중추 접종시험에 사용한 닭 10마리 이상을 시험계로 하고 3마리 이상을 대조계로 한다. 안전시험이 끝난 시험계 및 대조계에 공격용 바이러스를 마리당 $10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀을 근육 내에 공격접종하고 14일간 이상 유무를 관찰한다.

4.8.2. 판정

무접종 대조계는 뉴캐슬병으로 100% 폐사하고 시험계는 80% 이상이 건강하여야 한다. 단, 뉴캐슬병에 기인하지 않은 사고계가 생겼을 때는 판정에서 제외한다.

* 공격바이러스

공격용바이러스는 병원성이 높은 뉴캐슬병 바이러스(교정원주)를 계태아에 감염시킨 뇨막강액이다. 바이러스의 역가는 $10^{8.0}$ ELD₅₀/ml이상이어야 한다

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다. 생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 음수접종, 점안접종, 분무접종 등의 방법으로 사용하지만 접종방법은 사용 백신주 및 접종대상 닭의 건강상태 등을 고려하여 가장 적합한 방법을 선택하여 투여한다.

<부 기>

부기1. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamysin	200 μ l/ml

부기2. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

닭 전염성기관지염 생백신

Infectious Bronchitis Vaccine, Live

1. 정의

약독 닭 전염성기관지염 바이러스를 계태아에 증식시켜 감염 계태아 뇨막강액을 동결건조한 생백신이며 닭 전염성기관지염 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

약독 닭 전염성기관지염 바이러스(infectious bronchitis virus, IBV)인 H120주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~10 일령의 SPF(specific pathogen free) 발육계란의 뇨막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ 희석한 바이러스액 0.2ml를 접종하여 37℃ 부란기에서 30~48시간 배양 후 채취한 뇨막액을 -70℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

발육계란에서 잘 증식하며 접종 시 계태아의 위축 및 폐사를 유발한다. IBV는 닭 적혈구에 대한 혈구응집능이 없으나 phospholipase C type 1 효소를 처리하면 혈구응집능이 생긴다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

보존된 종독바이러스를 PBS(부기1)로 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ 되게 희석하여 9~10일령의 SPF 발육계란의 뇨막강(allantoic cavity)내에 0.1ml씩 접종한다.

3.2.2. 바이러스 배양

접종 후 24시간 후에 검란하여 죽은 부화란은 버린다. 접종한 발육계란은 3

1-3-2-02

7~38℃에서 30~48시간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

배양한 후 검란하여 살아있는 발육계란을 4℃의 냉장실에서 12시간 이상 냉각한 후 노막액을 혈액이 혼입되지 않도록 무균적으로 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 세균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 미립바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

제조용 IB바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 검사품의 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 검사품 0.2ml에 10마리분의 용량이 되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모노막과 노막강 및 6일령 발육계란의 난황내에 각각 0.2ml씩 접종한다. 용모노막 및 노막강 접종란은 5일간, 난황내 접종란은 8일간 37℃에서 배양한 후 계태아의 병변 및 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 단, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외한다.

3.3.2.2. 판정

계태아는 모두 정상 발육하고 노막강액의 적혈구 응집성과 용모노막상에 포크형성이 없어야 한다.

3.3.3. 바이러스함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10배 단계 희석한다. 이 각각의 희석액을 5개 이상의 9~11일령 발육계란의 노막강 내에 0.1ml씩 접종한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 제외하고 24시간 이후에 폐사한 것은 닭 전염성 기관지염 바이러스에 의한 폐사임을 확인한다. 접종 7일 후에 생존한 발육계란은 닭 전염성 기관지염 특유의 계태아 병변이 나타난 것을 양성으로 판정한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{2.5}EID_{50}$ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기2)를 적당량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조괴로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함유량 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

닭 전염성 기관지염 바이러스에 감수성이 있는 3~4주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장접종량을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.8 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 시험계와 대조계를 시험동물로 한다. 안전시험이 끝난 대조계와 시험계로부터 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한

1-3-2-02

다. 중화 후 바이러스 함유량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다. 접종 7일 후에 계태아 병변을 조사하여 중화지수를 산출한다. 단, 중화시험용 바이러스는 백신제조에 사용된 것과 동일한 바이러스주를 사용한다.

4.8.2. 판정

대조계 혈청의 중화지수는 바이러스 역가에 대하여 1.0이하이어야 하며 시험계 혈청의 중화지수는 대조계 혈청에 대하여 2.0이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다. 생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 음수접종, 점안접종, 분무접종 등의 방법으로 사용한다.

<부 기>

부기1. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamysin	200 μ l/ml

부기2. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

닭 전염성후두기관염 생백신

Infectious Laryngotracheitis Vaccine, Live

1. 정의

병원성이 약한 닭 전염성후두기관염 바이러스를 발육계란 또는 조직배양세포에 증식시켜 동결건조한 생백신이며 닭 전염성후두기관염 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

병원성이 약한 닭 전염성후두기관염 바이러스 IVR-12주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~11 일령의 SPF(specific pathogen free) 발육계란의 용모노막에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ 로 희석한 바이러스액 0.2ml를 접종하여 37°C 부란기에서 4~6일간 배양후 채취한 용모노막을 유제하여 -70°C 이하에서 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

발육계란의 용모노막으로 접종 시 포크를 형성하며 닭 신장세포 및 계태아 간세포에서 합포체를 형성한다. 바이러스는 혈구응집능력이 없다. 건강한 닭에 점안으로 접종시 가벼운 결막염이외에는 증상이 나타나지 않는다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

보존된 종독바이러스를 PBS(부기1)로 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ 되게 희석하여 9~11일령의 SPF 발육계란의 용모노막에 0.1ml씩 접종한다.

3.2.2. 바이러스 배양

접종 후 24시간 후에 검란하여 죽은 부화란은 버린다. 접종한 발육계란은 3

7~38℃ 부란기에서 4~6일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

배양한 후 검란하여 살아있는 발육계란을 4℃냉실에서 12시간 이상 냉각한 후 바이러스 감염 장요막강액과 용모노막을 무균적으로 수집하여 혼합유제한 바이러스액을 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 세균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

닭 전염성 후두기관염 바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 검사품의 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 검사품 0.2ml에 10마리분의 용량이 되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모노막과 노막강 및 6일령 발육계란의 난황 내에 각각 0.2ml씩 접종한다. 용모노막 및 노막강 접종란은 5일간, 난황 내 접종란은 8일간 37℃에서 배양한 후 계태아의 병변 및 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 단, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외한다.

3.3.2.2. 판정

계태아는 모두 정상 발육하고 노막강액의 적혈구 응집성과 용모노막상에 포크형성이 없어야 한다.

3.3.3. 바이러스함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 인산완충식염수로 10배 단계 희석하여 다음의 1) 또는 2)의 방법에 따라 바이러스 함량을 조사한다.

1) 조직배양법

검사품을 10진 희석하여 5개 이상의 초대배양 닭 신장세포에 접종하여 흡착시킨 다음 세포 배양액을 첨가해 37℃에서 7일간 배양한다. 배양기간 동안 매일 관찰하여 닭 전염성 후두기관염 바이러스 특유의 세포변성효과가 인정된 것을 양성으로 하여 TCID₅₀을 산출한다.

2) 계란접종법

검사품을 10배 단계 희석하여 5개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모노막에 각각 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 5일간 배양한다. 접종 5일후에 용모노막에 닭 전염성 후두기관염 바이러스 특유의 포크가 인정되는 것을 양성으로 하여 EID₅₀을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

조직배양법에 의한 시험에서 바이러스 함량은 마리당 10^{3.5}TCID₅₀ 이상이어야 하며 계란접종법에 의한 시험에서 바이러스 함량은 마리당 10^{2.5}EID₅₀ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기2)를 적당량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조괴로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

닭 전염성 후두기관염 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사

용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장접종량을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 14일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 시험계 및 대조계에 공격용 바이러스를 0.1ml($10^{4.0}$ EID₅₀/마리)씩 기관 내에 접종하고 14일간 이상 유무를 관찰한다.

4.8.2. 판정

대조계는 80%이상이 발병하고 시험계는 80%이상이 증상 없이 내과 하여야 한다. 단, 사고계가 생겼을 때는 이를 제외하고 판정한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다. 생산업체에 따라 유효기간을 달리할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 점안접종의 방법으로 투여한다.

<부 기>

부기1. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamycin	200 μ l/ml

부기2. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

닭 전염성F낭병 생백신

Infectious Bursal Disease Vaccine, Live

1. 정의

병원성이 약한 닭 전염성F낭병 바이러스를 발육계란 또는 조직배양세포에 증식시켜 동결건조한 생백신이며 닭 전염성F낭병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

병원성이 약한 닭 전염성F낭병 바이러스로서 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~11 일령의 SPF(specific pathogen free) 발육계란 유래의 계태아섬유아세포에서 배양하거나 발육계란의 용모노막에 $10^{4.5}$ EID₅₀/ml로 희석한 바이러스액 0.1ml를 접종하여 37℃ 부란기에서 3~4일간 배양 후 채취한 용모노막을 유제하여 -70℃이하에서 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

발육계란에 접종하면 접종 3~5일후 계태아가 사망하며 계태아 부종, 점상출혈 및 간에 출혈 및 괴사소견이 나타난다. 계태아 섬유아세포에서 잘 자라며 세포 변성효과도 뚜렷하다. 바이러스는 혈구응집능력이 없다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 종란 및 세포

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란 및 계태아섬유아세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포유지용배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

1) 계태아 유래 백신

3.1.1. 바이러스 접종

1-3-2-04

$10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml되게 희석하여 9~10일령의 SPF 발육란의 용모뇨막에 0.1ml씩 접종한다

3.1.2. 바이러스 배양

접종한 발육계란은 37℃에서 3일간 배양한다.

3.1.3. 바이러스 수확

감염된 계태아를 무균적으로 수집하여 유제하고 100목망으로 여과하여 바이러스 배양유제액을 수확한다.

2) 조직배양백신

3.2.1. 세포배양

계태아섬유아세포를 세포유지용배지(부기1)에 부유시켜 2~3일간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 접종 및 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포유지용 배지를 제거하고 종독바이러스를 세포유지용배지에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml로 희석하여 세포유지용배지의 1/10량으로 접종하여 37℃에서 72~120시간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 세포변성효과가 60~90% 출현하였을 때 감염배양액을 무균적으로 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다(단 조직배양백신에 한한다).

3.3.2. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다(단 계태아유래백신에 한한다).

3.3.3. 동정 및 미립바이러스 부정시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

닭 전염성F낭병 바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 검사품의 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 시료 0.2ml에 10마리분의 용량이 되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모뇨막 및 뇨막강 내에 각각 0.2ml씩 접종하고 37℃에서 5일간 배양한 후 계태아의 병변 및 닭 적혈구

응집성을 조사한다. 단, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외한다.

3.3.3.2. 판정

계태아는 모두 정상 발육하고 뇨막강액의 적혈구 응집성과 용모뇨막에 포크형성이 없어야 한다.

3.3.4. 바이러스함량시험

1) 계태아 유래 백신

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS(부기2)로 10배 단계 희석한다. 각각의 희석액을 5개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모뇨막에 0.1ml씩 접종하고 37°C에 5일간 배양하여 전염성 F낭병 특유의 병변이 나타난 것을 양성으로 하여 EID₅₀을 산출한다.

3.3.4.2. 판정

바이러스 함량은 마리 당 10^{2.0}EID₅₀이상이어야 한다.

2) 조직배양백신

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS(부기2)로 10배 단계 희석한다. 각각의 희석액을 단층이 형성된 초대배양 계태아 섬유아세포에 접종한 후 흡착시킨 다음 세포배양액을 첨가해 37°C에서 5일간 배양한다. 배양세포에 전염성 F낭병 바이러스 특유의 세포변성효과가 인정된 것을 양성으로 하여 TCID₅₀을 산출한다.

3.3.4.2. 판정

바이러스 함량은 마리 당 10^{2.0}TCID₅₀이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기3)를 적당량을 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조괴로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

1-3-2-04

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 흡습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량 시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

닭 전염성F낭병 바이러스에 감수성이 있는 3~4주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장 접종량 10배를 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

닭 전염성F낭병 바이러스에 감수성이 있는 3~4주령의 닭 30마리를 사용하여 20마리는 시험계로, 10마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장 접종량을 사용법에 따라 접종하고 21일후에 시험계와 대조계의 혈청을 채취하여 면역확산반응에 의하여 항체 형성유무를 조사한다.

4.8.2. 판정

시험계는 80% 이상이 양성이어야 하며 대조계는 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다. 생산업체에 따라 유효기간을 달리할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 음수접종 방법으로 투여한다.

<부 기>**부기1. 세포유지용 배지**

Medium 199 + F10(2배)	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamysin	200 μ l/ml

부기3. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

마렉병 생 동결백신

Marek's Disease Vaccine, Live

1. 정의

병원성이 약한 마렉병 바이러스 또는 칠면조 유래 허피스바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 초저온하에 동결시킨 생백신이며 마렉병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

병원성이 약한 마렉병 바이러스 SB1 및 칠면조 유래 허피스바이러스 HVT FC-126주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~11 일령의 SPF (specific pathogen free) 발육계란 유래의 계태아섬유아세포를 세포증식용배지(부기1)에 24~30시간 배양하여 단층을 형성되었을 때 세포유지용배지(부기2)로 증독 바이러스(200PFU/cm²)를 접종하고 38℃에서 1~2일간 배양하여 세포변성효과를 확인 관찰한 후 감염세포 엠플에 분주하여 -196℃ 액체 질소에 동결보존한다.

2.3. 성상 및 독력

감염세포와 함께 닭에 접종하여야 감염력이 유지된다. 계태아 섬유아세포에서는 인접세포간에만 감염이 나타나는 독특한 플라크가 형성된다. 닭에서는 병원성이 발휘되지 않는다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

건강한 닭에서 생산된 SPF 유래 계태아섬유아세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용배지(부기1) 및 세포유지용배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

SPF 계태아섬유아세포를 세포증식용배지(부기1)에 부유시켜 37℃에서 24~30시간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포증식용배지를 제거하고 중독바이러스(200PFU/cm²)를 세포유지용배지(부기2)로 희석하여 접종하고 37~38℃에서 2~3일간 배양관찰한다. HVT는 약 48시간, SB1은 약 72시간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 세포변성효과가 70~80%이상 출현하였을 때 바이러스 감염세포를 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 0.1ml에 10마리분이 포함되게 희석액으로 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 뇨막강내로 0.1ml씩을 접종하여 37℃에서 5일간 배양한다. 접종 5일후에 계태아 병변 및 닭 적혈구 응집성을 조사한다.

3.3.2.2. 판정

계태아는 모두 정상 발육하고 뇨막강액의 적혈구 응집성이 없어야 한다.

3.3.3. 바이러스함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 1/5, 1/25 및 1/125 마리분으로 희석하여 24시간 내에 단층이 형성된 초대배양 계태아 섬유아세포에 접종한후 흡착시킨 다음 세포 배양액을 첨가해 37℃에서 배양한다. 접종 4~8일후에 마렉병 바이러스 특유의 세포변성효과가 인정된 것을 양성으로 하여 PFU를 산출한다.

3.3.3.2. 판정

마리당 $2 \times 10^{3.0}$ PFU 이상이어야 한다. 단 혼합하여 접종하는 백신은 각각의 바이러스 함량이 $10^{3.0}$ PFU 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

1-3-2-05

바이러스 함량을 조정한 후 수정된 바이러스 감염세포를 10% 소혈청, 7.5% DMSO(dimethyl sulfoxide), 적당량의 항생물질을 첨가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 앰플에 분주하고 봉전하여 -196℃(액체질소)에 동결보존한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조괴로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.4. 바이러스 함량 시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

마λεκ병에 감수성이 있는 1일령 병아리 25마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 10마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품 10배를 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 21일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

초저온의 액체질소에 보존한다. 12개월간 유효하다. 백신생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

부화 직후 어린 병아리의 경부피하에 0.2ml씩 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Medium 199 + F10(2배)	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
L-glutamine	3%
7.5% Sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Medium 199 + F10(2배)	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
L-glutamine	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

닭 뇌척수염 생백신

Avian Encephalomyelitis Vaccine, Live

1. 정의

닭 뇌척수염 바이러스를 발육계란의 난황 내에 증식시켜 감염 계태아의 뇌조직의 유체액을 동결건조한 생백신이며 닭 뇌척수염 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

닭 뇌척수염 바이러스 Calnek주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

4~5일령의 SPF(specific pathogen free) 발육계란의 난황 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/ml 로 희석한 바이러스액 0.2ml를 난황 내에 접종하여 37℃ 부란기에서 13~14일간 배양 후 18일령 계태아 뇌를 유체하여 -70℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

발육계란의 난황내로 접종 시 잘 자란다. 난황으로 접종 시에는 중화시험에 사용하는 계태아 순화주의 경우에는 계태아 위축 등의 병변이 나타날 수 있으나 백신주는 계태아에 아무런 병변을 나타내지 않는다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

보존된 종독바이러스를 PBS(부기1)로 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/ml되게 희석하여 4~5일령의 SPF 발육계란의 난황 내에 0.2ml씩 접종한다

3.2.2. 바이러스 배양

접종한 발육계란은 37℃에서 13~14일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

배양한 후 18일령 때 정상적인 계태아의 뇌조직을 무균적으로 수집하여 PBS 로 세척한 후 SPGA용액(부기2)으로 40% 유제액을 만들어 1,000rpm에서 5분 간 원심하여 상층의 바이러스액을 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

닭 뇌척수염 바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 검사품의 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 검사품을 0.1ml에 10마리분이 함유되도록 희석액으로 희석하여 10개 이상의 6일령 발육계란의 난황 내에 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 배양한 후 18일령에 개란하여 계태아 변화를 조사한다. 또한 10개 이상의 9~11일령의 발육계란에 0.1ml씩을 용모뇨막 및 뇨막강 내에 각각 접종하여 37℃에서 5일간 배양한다. 접종란은 5일후에 개란하여 계태아 병변과 닭 적혈구 응집성을 조사한다.

3.3.2.2. 판정

18일령에 계대한 모든 계태아는 정상 발육하고 운동성이 있어야 한다. 검사품을 용모뇨막 및 뇨막강 내에 접종 5일 후에 개란한 용모뇨막에 포크 형성이 없어야 한다.

3.3.3. 바이러스함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품 1마리분을 100배 희석하여 20개 이상의 6일령 발육계란의 난황 내에 0.1ml씩 접종한 후 부화시켜 7일간 사육하면서 관찰한다. 똑같이 얻어진 10개의 접종되지 않은 발육계란을 음성 대조로 한다.

3.3.3.2. 판정

부화한 병아리의 반수 이상이 각약, 각마비 등 닭 뇌척수염 증상을 나타내어야 한다. 대조란은 10개중에 8개 이상이 부화되어야 한다. 관찰기간 종료시 증상이 의심되는 병아리가 있을 때는 척추의 요팽대부의 병리조직학적 검사로 병변유무를 조사한다.

1-3-2-06

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액 40%와 보호제(부기2)를 60%가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조피로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 흡습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

닭 뇌척수염 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 5마리를 사용한다. 시험계에 검사품 10마리분을 사용법에 따라 접종하고 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

닭 뇌척수염 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 15마리를 사용하여 10마리는 시험계, 5마리는 무접종 대조계로 한다.

<시험1> 시험계에 검사품 10마리분을 사용법에 따라 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 계태아 순화 닭 뇌척수염 바이러스를 마리당 $10^{3.0}$ ELD₅₀(0.05~ 0.1ml)씩 뇌 내로 공격 접종하여 21일간 관찰한다.

<시험2> 시험계에 검사품 10마리분을 사용법에 따라 접종하고 28일후에 채혈하여 얻은 혈청으로 중화시험 또는 면역확산반응을 실시한다.

4.8.2. 판정

<시험1> 대조계의 80%이상이 닭 뇌척수염 증상을 나타내거나 폐사하여야 하며 시험계의 80%이상은 무증상으로 생존하여야 한다.

<시험2> 중화시험 결과 시험군의 중화지수는 대조군 혈청에 대하여 1.1이상이어야 하며 면역확산반응에서는 시험계의 80%이상이 양성반응을 나타내야 하며 대조계는 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다. 생산업체에 따라 유효기간을 달리할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 10~16주령 닭에 음수접종 방법으로 투여한다.

<부 기>

부기1. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamysin	200 μ l/ml

부기2. 보호제(SPGA용액)

Suorose.	74.62g
Monopotassium phosphate	0.571g
Dipotassium phosphate.....	1.254g
Sodium Glutamate	20.0g
Lactalbumin hydrolysate	50.0ml
Penicillin.....	200mg/ml
Acid streptomysin	200mg/ml
D.W	1,000ml

계두 생백신

Fowl Pox Vaccine, Live

1. 정의

병원성이 약한 계두 바이러스를 계태아조직세포, 또는 발육계란에 증식시켜 감염유제액을 동결건조한 생백신이며 계두 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

병원성이 약한 계두 바이러스 Vin-FP주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~11 일령의 SPF(specific pathogen free) 발육계란유래의 계태아 섬유아세포에서 배양하거나 발육계란의 용모노막에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/ml로 희석한 약독계두 바이러스액 0.2ml를 접종하여 37℃에서 4~5일간 배양후 채취한 용모노막을 유제하여 -70℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

9~11 일령의 발육계란의 용모노막에 접종 시 포크를 형성한다. 바이러스는 혈구응집능력이 없다. 닭에 접종하였을 때는 5~7일 만에 완전 발두하고 접종 후 21일 이내에 발두는 쇠퇴한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 종란 및 세포

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란 및 계태아섬유아세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용배지(부기1) 및 세포유지용배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

1) 계태아 유래 백신

3.1.1. 바이러스 접종

$10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ 되게 희석하여 9~10일령의 SPF 발육란의 용모노막에 0.1ml씩 접종한다

3.1.2. 바이러스 배양

접종한 발육계란은 37℃에서 4~5일간 배양한다.

3.1.3. 바이러스 수확

감염된 계태아 용모노막을 무균적으로 수집하여 유제하고 100목망으로 여과하여 바이러스 배양유제액을 수확한다.

2) 조직배양백신

3.2.1. 세포배양

계태아섬유아세포를 세포유지용배지(부기1)에 부유시켜 2~3일간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 접종 및 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포유지용 배지를 제거하고 증독바이러스를 세포유지용배지에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 로 희석하여 세포유지용배지의 1/10량으로 접종하여 37℃에서 72~120시간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 세포변성효과가 60~90% 출현하였을 때 감염배양액을 무균적으로 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다(단 조직배양백신에 한한다).

3.3.2. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다(단 계태아유래백신에 한한다).

3.3.3. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

계두 바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 검사품의 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 검사품 0.2ml에 10마리분의 용량이 되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모노막 및 노막강 내에 각각 0.2ml씩 접종하고 37℃ 부란기에서 5일간 배양한 후 계태아의 병변 및 닭 적혈구 응집

성을 조사한다. 단, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외한다.

3.3.3.2. 판정

계태아는 모두 정상 발육하고 뇨막강액의 적혈구 응집성과 용모뇨막에 포크형성이 없어야 한다.

3.3.4. 바이러스함량시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS(부기3)로 10배 단계 희석한다. 각각의 희석액을 5개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모뇨막에 0.1ml씩 접종하고 37℃에 5일간 배양하여 계두 바이러스 특유의 포크가 나타난 것을 양성으로 하여 EID₅₀을 산출한다.

3.3.4.2. 판정

마리당 검사품의 최소방어역가(minimum protective close)에 10^{0.7}EID₅₀을 더한 역가이상이어야 하며 또한 이 역가는 10^{2.0}EID₅₀ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기4)를 적당량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조괴로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다(단 조직배양백신에 한한다).

4.5. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다(단 계태아 유래 백신에 한한다).

4.6. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 바이러스 함량 시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.8 안전시험

4.8.1. 동물 및 시험

계두 바이러스에 감수성이 있는 1~2주령 닭 15마리를 사용하여 10마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품을 사용법에 따라 접종하고 21일간 관찰한다.

4.8.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.9 역가시험(발두시험)

4.9.1. 동물 및 시험

계두 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령 닭 15마리를 사용하여 10마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품을 사용법에 따라 접종하고 21일간 발두형성 유무를 조사한다.

4.9.2. 판정

모든 시험계는 건강하여야 하며 접종부위에 접종 3~7일 후에 발두하고 10~14일후부터 점차 위축하여 21일 이내에 소실되어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다. 생산업체에 따라 유효기간을 달리할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 동봉된 접종침에 예방약을 묻혀서 날개의 익막부 삼각형 중심부에 접종한다. 6주령 이상은 쌍침으로 접종하며 6주령 미만은 침 하나를 때고 단침으로 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Medium 199 + F10(2배)	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% Sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Medium 199 + F10(2배)	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamycin	200 μ l/ml

1-3-2-07

부기4. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염 생 혼합백신

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis Combined Vaccine, Live

1. 정의

약독 뉴캐슬병 바이러스 및 약독 닭 전염성기관지염 바이러스를 계태아에 각각 증식시켜 바이러스 감염 계태아 뇨막강액을 혼합하여 동결건조한 생백신이며 뉴캐슬병 및 닭 전염성기관지염 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 뉴캐슬병 바이러스인 B₁주와 약독 닭전염성기관지염 바이러스 H120주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 2.3에 따른다.

2.2.2. 닭 전염성 기관지염바이러스

1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 2.3에 따른다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 2.2에 따른다.

2.3.2. 닭 전염성 기관지염바이러스

1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 2.2에 따른다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

뉴캐슬병 바이러스는 1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.1에 따른다.

닭 전염성기관지염 바이러스는 1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 3.2.1

1-3-2-08

에 따른다.

3.2.2. 바이러스 배양

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.2에 따른다.

1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.3. 바이러스 수확

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.3에 따른다.

1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 미입바이러스 부정시험

뉴캐슬병 바이러스는 1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.3.2에 따른다.

닭 전염성기관지염 바이러스는 1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 3.3.2에 따른다.

3.3.3. 바이러스함량시험

뉴캐슬병 바이러스는 1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의3.3.3에 따른다.

닭 전염성기관지염 바이러스는 1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 3.3.3에 따른다.

3.4. 최종원액

각각의 바이러스 함량을 조정한 원액과 동량 혼합하고 보호제(부기1)를 적당량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조피로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 합습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

1) 초생추 접종시험

4.7.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 바이러스 및 닭 전염성 기관지염 바이러스에 감수성이 있는 1~2주령의 닭 25마리를 사용한다. 시험계에 검사품의 권장접종량 10배를 사용법에 따라 접종하고 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

90% 이상이 건강하여야 한다.

2) 중추 접종시험

4.7.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 바이러스 및 닭 전염성 기관지염 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장접종량을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 14일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험계는 시험기간중 건강하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 시험동물은 뉴캐슬병에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 하며 안전시험이 끝난 중추접종 시험계와 대조계는 닭 전염성 기관지염 시험동물로 한다.

1) 뉴캐슬병

시험계에 검사품을 사용법에 따라 접종하고 14일후에 시험계와 대조계에 공격 바이러스를 마리당 $10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀을 근육 내에 공격접종하여 14일간 이상 유무를 관찰한다.

2) 닭 전염성 기관지염

안전시험이 끝난 대조계와 시험계로부터 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한 후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 바이러스 함유량 시험법에 따라 발육계란에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다. 접종 7일 후에 계태아 병변을 조사하여 중화지수를 산출한다. 단, 중화시험용 바이러스는 백신제조에 사용된 것과 동일한 바이러스주를 사용한다.

4.8.2. 판정

1) 뉴캐슬병

무접종 대조계는 뉴캐슬병으로 100% 폐사하고 시험계는 80% 이상이 건강하여야 한다. 단, 뉴캐슬병에 기인하지 않은 사고계가 생겼을 때는 판정에서 제외한다.

2) 닭 전염성 기관지염

대조계 혈청의 중화지수는 바이러스 역가에 대하여 1.0이하이어야 하며 시험계 혈청의 중화지수는 대조계 혈청에 대하여 2.0이상이어야 한다.

* 공격바이러스

공격바이러스는 병원성이 높은 뉴캐슬병 바이러스(교정원주)를 계태아에 감염시킨 장노막강액이다. 바이러스의 역가는 $10^{8.0}$ ELD₅₀/ml 이상이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하지만 백신생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 음수접종, 점안접종, 분무접종 등의 방법으로 접종한다.

<부 기>

부기1. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

닭뇌척수염, 계두 생 혼합백신

Avian Encephalomyelitis, Fowl Pox Combined Vaccine, Live

1. 정의

약독 닭 뇌척수염 바이러스 및 약독 계두 바이러스를 발육계란에 각각 증식시켜 이 바이러스 감염 계태아 뇌조직 및 용모노막 유제액을 혼합하여 동결건조한 생백신이며 닭 뇌척수염 및 계두 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 닭 뇌척수염 바이러스 및 약독 계두바이러스 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 닭 뇌척수염 바이러스

1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신의 2.2에 따른다.

2.2.2. 계두바이러스

1-3-2-07 계두 생백신의 2.2에 따른다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. 닭 뇌척수염 바이러스

1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신의 2.3에 따른다.

2.3.2. 계두바이러스

1-3-2-07 계두 생백신의 2.3에 따른다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

닭 뇌척수염 바이러스는 1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신의 3.2.1에 따른다.

계두 바이러스는 1-3-2-02 계두 생독백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.2. 바이러스 배양

닭 뇌척수염 바이러스는 1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신의 3.2.2에 따른다.

계두 바이러스는 1-3-2-02 계두 생독백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.3. 바이러스 수확

닭 뇌척수염 바이러스는 1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신의 3.2.3에 따른다.

계두 바이러스는 1-3-2-02 계두 생독백신의 3.2.3에 따른다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 미입바이러스 부정시험

닭 뇌척수염 바이러스는 1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신의 3.3.2에 따른다.

계두 바이러스는 1-3-2-07 계두 생백신의 3.3.3에 따른다.

3.3.3. 바이러스함량시험

닭 뇌척수염 바이러스는 1-3-2-06 닭 뇌척수염 생백신의 3.3.3에 따른다.

계두 바이러스는 1-3-2-07 계두 생백신의 3.3.4에 따른다.

3.4. 최종원액

각각의 바이러스 함량을 조정한 원액과 동량 혼합하고 보호제(부기1)를 적당량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 건조괴로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 흡습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입바이러스 부정시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품을 0.1ml에 10마리분의 바이러스가 함유되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모노막강 내에 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 5일간 배양한다. 접종 5일 후에 접종란의 용모노막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다.

4.5.2. 판정

용모노막강액은 적혈구 응집성이 없어야 한다.

4.6. 바이러스 함량 시험

4.6.1. 재료 및 시험

1) 닭 뇌척수염 바이러스

<시험1> 또는 <시험2>에 따른다.

<시험1> 검사품을 계두 바이러스 고도면역혈청으로 중화한 후 20개 이상의 6일령 발육계란의 난황 내에 1마리분을 100배 희석하여 0.1ml씩 접종한 후 부화시켜 7일간 사육, 관찰한다. 똑같이 얻어진 10개의 접종되지 않은 발육계란을 음성대조로 한다.

<시험2> 검사품을 1/100마리분으로 희석하여 동량의 클로로포름을 가하여 혼합한 다음 600×g에서 10분간 원심한 후 상층액을 채취하여 20개 이상의 6일령 발육계란의 난황 내에 0.1ml씩 접종한 후 부화시켜 7일간 사육, 관찰한다. 똑같이 얻어진 10개의 접종되지 않은 발육계란을 음성대조로 한다.

2) 계두 바이러스

<시험1> 또는 <시험2>에 따른다.

<시험1> 검사품을 닭 뇌척수염 바이러스의 고도면역혈청으로 중화한 후 10배 단계 희석하여 5개 이상의 9~11일령 발육계란의 장노막상에 각 희석별로 0.1ml씩 접종한 후 37℃에서 7일간 배양한다. 접종 5일 후에 개란하여 용모노막상에 계두 바이러스 특유의 포크가 나타난 것을 양성으로 하여 EID₅₀을 산출한다.

<시험2> 검사품을 10배 단계 희석하여 5개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모노막상에 각 희석별로 0.1ml씩 접종한 후 37℃에서 5일간 배양한다. 접

중 5일 후에 개관하여 용모노막상에 계두 바이러스 특유의 포크가 나타난 것을 양성으로 하여 EID₅₀을 산출한다.

4.6.2. 판정

1) 닭 뇌척수염 바이러스

부화한 병아리의 반수 이상이 각약, 각마비등 닭 뇌척수염 증상을 나타내어야 한다. 대조군은 10개중에 8개 이상이 부화되어야 한다. 관찰기간 종료 시 증상이 의심되는 병아리가 있을 때는 척추의 요팽대부의 병리조직학적 검사로 병변 유무를 판정한다.

2) 계두 바이러스

마리당 검사품의 최소방어 역가(minimum protective dose)에 $10^{0.7}$ EID₅₀을 더한 역가 이상이어야 하며 또한 이 역가는 $10^{2.0}$ EID₅₀이상이어야 한다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

닭 뇌척수염 바이러스 및 계두 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령 닭 15마리를 사용하여 10마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품을 접종량의 10배를 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 21일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

닭 뇌척수염 바이러스 및 계두 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계, 5마리는 무접종 대조계로 한다.

1) 닭 뇌척수염 바이러스

<시험1> 또는 <시험2>에 따른다.

<시험1> 시험계에 검사품을 사용법에 따라 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 계태아 순화 닭 뇌척수염 바이러스를 마리당 $10^{3.0}$ ELD₅₀(0.05~0.1ml)씩 뇌 내로 공격접종하여 21일간 관찰한다.

<시험2> 시험계에 검사품을 사용법에 따라 접종하고 28일후에 채혈하여 얻은 혈청으로 중화시험 또는 면역확산반응을 실시한다.

4.8.2. 판정

<시험1> 대조계의 80%이상이 닭 뇌척수염 증상을 나타내거나 폐사하여야 하며 시험계의 80%이상은 무증상으로 생존하여야 한다.

<시험2> 중화시험 결과 시험군의 중화지수는 대조군 혈청에 대하여 1.1이상이어야 하며 면역확산반응에서는 시험계의 80%이상이 양성반응을 나타내야 하며 대조계는 음성이어야 한다.

2) 계두 바이러스

4.8.1. 동물 및 시험

역가시험에 사용한 시험계와 대조계를 시험동물로 한다. 역가시험에 따라 검사품을 접종한 시험계에서 발두형성 유무를 21일간 관찰한다.

4.8.2. 판정

모든 시험계는 건강하여야 하며 접종부위에 접종 3~7일후에 발두하고 10~14일 후부터 점차 위축하여 21일 이내에 소실되어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하지만 백신생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 동봉된 접종침에 묻쳐서 날개의 익막부 삼각형 중심부에 접종한다. 10~16주령 사이에 접종하되, 산란개시 4주전에 백신접종을 마치도록 한다.

<부 기>

부기1. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

뉴캐슬병 불활화백신

Newcastle Disease Vaccine, Inactivated(Gel)

1. 정의

약독 뉴캐슬병 바이러스를 계태아에 증식시켜 감염 계태아 노막강액을 불활화하고 수산화알미늄겔을 첨가하여 만든 백신이며 뉴캐슬병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 뉴캐슬병 바이러스인 La Sota주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2에 따른다.

2.3. 성상 및 독력

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.3에 따른다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.2. 바이러스 배양

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.3. 바이러스 수확

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 1N NaOH용액으로 pH 6.6~7.6으로 조정된 후 0.2%되게 포르말린을 첨가하여 37℃에서 15시간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 바이러스함량시험

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.3.3에 따른다.

3.3.3. 불활화확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

건강한 SPF 닭에서 생산한 9~11일령 발육계란 10개 이상을 사용한다. 발육계란의 요막강 내에 검사품 0.1ml씩 접종하여 37℃ 부란기에 5일간 배양관찰한 후 노막강액을 채취하여 1대 계대한 후 5일간 배양관찰한다. 요막강액을 채취하여 0.5%(v/v) 닭 적혈구 부유액을 이용하여 혈구응집성을 조사한다.

3.3.3.2. 판정

계태아는 정상발육하고 노막강액은 적혈구 응집성이 없어야한다.

3.4. 최종원액

불활화된 원액을 100목 동망으로 여과한 후 1N NaOH용액으로 pH 6.4~7.2로 조정하고 수산화 알루미늄 겔을 가하여 잘 혼합한 후 균등액이 되게 진탕하면서 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색, 회백색 또는 연자색의 부유액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다. 단, 크리스탈 바이오렛을 불활화제로 사용한 백신은 0.2ml, 0.4ml, 1.4ml 및 2.0ml의 검사품을 각각 40ml의 디오글리코레이트 액체 배지에 접종하고 각각 37℃와 22℃에서 7일간 배양한다. 배양 후 균의 발육이 없어야 한다.

4.3. 방부제 정량시험

1-3-2-10

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린의 함유량은 0.2% 이하, 치메로살 함유량은 0.01% 이하 그리고 석탄산 함유량은 0.5% 이하 이어야 한다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH는 6.6~7.6이어야 한다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 14일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다. 사고계(시험품의 주사와 관계없는 병 또는 장애 등으로 시험의 판정에 제공하기 곤란한 것)가 생겼을 때는 이를 제외하고 판정한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 닭 중에서 시험계는 10마리 이상을 사용하고 대조계는 3마리 이상을 사용한다. 안전시험이 끝난 시험계에 공격용 뉴캐슬병 바이러스 ($10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀/수)를 근육 내에 공격접종하고 14일간 뉴캐슬병 증상 및 폐사를 관찰한다.

4.6.2. 판정

대조계는 뉴캐슬병으로 100% 폐사하고 시험계는 90%이상이 건강하게 내과 생존하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하지만 백신생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 앞가슴 또는 다리근육 내에 접종한다.

뉴캐슬병 불활화 유성백신

Newcastle Disease Vaccine, Inactivated(Oil)

1. 정의

약독 뉴캐슬병 바이러스를 계태아에 증식시켜 감염 계태아 뇨막강액을 불활화하고 유성보존제를 첨가하여 만든 백신이며 뉴캐슬병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 뉴캐슬병 바이러스인 La Sota주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

1-3-2-01 뉴캐슬 생백신의 2.2에 따른다.

2.3. 성상 및 독력

1-3-2-01 뉴캐슬 생백신의 2.3에 따른다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.2. 바이러스 배양

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.3. 바이러스 수확

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.2.4. 불활화

1-3-2-10 뉴캐슬병 불활화백신의 3.2.4에 따른다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

1-3-2-11

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 바이러스함량시험

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.3.3에 따른다.

3.3.2. 불활화확인시험

1-3-2-10 뉴캐슬병 불활화백신의 3.3.3에 따른다.

3.4. 최종원액

불활화된 원액을 100목 동망으로 여과한 후 1N NaOH용액으로 pH 6.4~7.2로 조정하고 적당한 유성보존제를 가하여 혼합한 후 균등액이 되게 진탕하면서 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색, 회백색의 부유액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린의 함유량은 0.2%이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

<시험1> 90% 방어율 측정법

뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다.

<시험2> 반수방어용량(PD50) 측정법

뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 8마리를 사용하여 4마리는 시험계로, 4마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장접종량을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 21일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다. 사고계(검사품의 주사와 관계없는 병 또는 장애등으로 시험의 판정에 제공하기 곤란한 것)가 생겼을 때는 이를 제외하고 판정한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

<시험1> 90% 방어율 측정법

안전시험이 끝난 닭 중에서 시험계는 10마리 이상을 사용하고 대조계는 3마리 이상을 사용한다.

<시험2> 반수방어용량 측정법

안전시험이 끝난 닭과 뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 12마리를 시험계로 한다.

<시험1> 90% 방어율 측정법

안전시험이 끝난 시험계에 공격용 뉴캐슬병 바이러스($10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀/수)를 근육 내에 공격접종하고 14일간 뉴캐슬병 증상 및 폐사를 관찰한다.

<시험2> 반수방어용량 측정법

권장접종량의 1, 1/25, 1/50, 그리고 1/100배의 양을 각각 시험계 4마리에 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 공격용 뉴캐슬병 바이러스($10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀/수)를 근육 내에 공격접종하여 14일간 뉴캐슬병 증상 및 폐사를 관찰하여 반수방어용량(PD₅₀)을 조사한다. 단, 1마리분 접종 시험계와 대조계는 안전시험에 사용한 닭을 사용한다.

4.5.2. 판정

<시험1> 90% 방어율 측정법

대조계는 뉴캐슬병으로 100% 폐사하고 시험계는 90%이상 건강하게 내과 생존하여야 한다.

<시험2> 반수방어용량 측정법

대조계는 100% 폐사하고 백신의 반수방어용량(PD₅₀)이 1/50 이하이어야 한다. 단, 사고계가 생겼을 때는 이를 제외하고 판정한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하지만 백신생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 앞가슴 또는 다리근육 내에 접종한다.

뉴캐슬병, 닭전염성기관지염, 산란저하증 불활화 혼합 유성백신

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, Egg Drop Syndrome
Combined Vaccine, Inactivated(Oil)

1. 정의

약독 뉴캐슬병 바이러스 및 닭 전염성기관지염 바이러스를 계태아에 증식시켜 감염계태아 뇨막강액과 산란 저하증 바이러스를 오리 태아에 증식시킨 감염 오리태아 뇨막강액을 각각 불활화하여 혼합하고 유성보존제를 첨가하여 만든 백신이며 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염 및 산란저하증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 뉴캐슬병 바이러스인 La Sota주, 닭 전염성기관지염 바이러스 H120, 산란 저하증 바이러스 BC14주 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 2.2에 따른다.

2.2.2. 닭 전염성기관지염 바이러스

1-3-2-02 닭 전염성기관지염 생백신의 2.2에 따른다.

2.2.3. 산란저하증 바이러스

10~12일령의 산란저하증 바이러스 항체 음성인 오리 발육란의 뇨막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/ml로 희석한 바이러스액 0.2ml를 접종하여 37℃ 부란기에서 5~6일간 배양 후 뇨막강액을 채취하여 -70℃ 이하에서 동결보존 또는 동결건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

2.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 2.3에 따른다.

2.3.2. 닭 전염성기관지염 바이러스

1-3-2-02 닭 전염성 기관지염 생백신의 2.3에 따른다.

2.3.3. 산란저하증 바이러스

산란저하증 바이러스는 계태아 간세포에서 잘 증식되며 오리 발육란에서도 잘 자란다. 바이러스는 혈구응집능력이 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란 및 산란저하증 바이러스에 대한 항체 음성인 오리 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

3.2.1.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.1.2. 닭 전염성기관지염 바이러스

1-3-2-02 닭 전염성기관지염 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.1.3. 산란저하증 바이러스

보존된 종독 바이러스를 PBS(부기1)로 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/ml 되게 희석하여 10~12일령 오리발육란의 뇨막강(allantoic cavity)내에 접종한다.

3.2.2. 바이러스 배양

3.2.2.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.2.2. 닭 전염성기관지염 바이러스

1-3-2-02 닭 전염성기관지염 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.2.3. 산란저하증 바이러스

접종한 오리발육란을 37~38℃ 부란기에서 6일간 배양한다. 접종 후 24시간 후에 검란하여 죽은 부화란을 버린다.

3.2.3. 바이러스 수확

3.2.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-12

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.2.3.2. 닭 전염성기관지염 바이러스

1-3-2-02 닭 전염성기관지염 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.2.3.3. 산란저하증 바이러스

배양 후 검란하여 살아있는 오리 발육란을 4℃의 냉장실에 12시간 냉각한 후 바이러스 감염 요막액을 혈액이 혼입되지 않도록 주의하면서 무균적으로 수확한다.

3.2.4. 불활화

각각 수확한 바이러스원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 1N NaOH용액으로 pH 6.6~7.6으로 조정한 후 0.2%가 되게 포르말린을 첨가하여 37℃에서 15시간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다(단 조직배양백신에 한한다).

3.3.2. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다(단 계태아유래백신에 한한다).

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.3.3에 따른다.

3.3.3.2. 닭 전염성기관지염 바이러스

1-3-2-02 닭 전염성기관지염 생백신의 3.3.3에 따른다.

3.3.3.3. 산란저하증 바이러스

3.3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 세포유지용배지(부기2)로 10배 단계 희석하여 계태아 간세포 배양 96 well microplate에 각각 0.1ml씩 넣고 37℃의 CO₂부란기에서 7일간 배양한 후 0.5% 닭 적혈구를 가하여 적혈구응집반응이 일어나는 것을 양성으로 하여 감염가를 산출한다.

3.3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-10 뉴캐슬병 사독백신의 3.3.3에 따른다.

3.3.3.2. 닭 전염성기관지염 바이러스

3.3.3.2.1. 재료 및 시험

9~11일령의 SPF 발육란에 불활화한 원액을 뇨막강에 0.2ml씩 접종하여 37℃에서 배양한다. 접종 7일 후에 뇨막강액을 채취하여 2차로 10개의 9~11일령의 발육란의 뇨막강 내에 0.2ml씩 계대 접종한 후 37℃에서 7일간 배양한 후 생존한 각각의 발육란에 대하여 닭 전염성 기관지염 특유의 계태아 병변여부를 조사한다.

3.3.3.2.2. 판정

닭 전염성 기관지염 바이러스에 의한 특유의 계태아 병변이 나타나지 않아야 한다.

3.3.3.3. 산란저하증 바이러스

3.3.3.3.1. 재료 및 시험

산란저하증 바이러스에 감수성이 있는 9~11일령의 발육오리란을 10개 사용하여 검사품을 장 뇨막강 내에 0.2ml씩 접종하여 37℃에서 배양한다. 접종 7일 후에 뇨막강액을 채취하여 2차로 10개의 9~11일령의 발육오리란의 뇨막강 내에 0.2ml씩 계대 접종한 후 37℃에서 7일간 배양한다. 각각의 접종란은 접종 7일 후에 뇨막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다.

3.3.3.3.2. 판정

검사품을 1차 접종한 발육란과 1차 접종하여 얻은 뇨막강액을 2차 접종한 발육란은 이상이 없어야 하며 뇨막강액은 적혈구 응집성이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

불활화 된 각각의 원액을 100목 등망으로 여과한 후 뉴캐슬병 바이러스 감염액 10%, 닭 전염성 기관지염 바이러스 감염액 10%, 산란저하증 바이러스 감염액 20%와 적당한 유성보존제를 60%되게 가하여 혼합한 후 균등액이 되게 진탕하면서 잘흔들어 혼합한다.

1-3-2-12

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 후 봉전한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 부유액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 불활화 확인시험

3.3.3에 따른다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 바이러스, 닭 전염성 기관지염 바이러스 및 산란저하증 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령 닭 20마리를 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품의 권장접종량을 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 21일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 시험계는 시험기간 중 건강하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 시험동물은 뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하며 안전시험이 끝난 닭은 닭 전염성 기관지염 및 산란저하증 시험동물로 한다.

1) 뉴캐슬병

<시험1> 또는 <시험2>에 따른다.

<시험1> 90% 방어율 측정법

시험계에 검사품의 권장접종량을 사용법에 따라 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 공격용 뉴캐슬병 바이러스($10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀/마리)를 근육 내에 공격접종하고 14일간 뉴캐슬병 증상 및 폐사를 관찰한다.

<시험2> 반수방어용량(PD₅₀) 측정법

권장접종량의 1, 1/25, 1/50, 그리고 1/100배의 양을 각각 시험계 4마리에 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 공격용 뉴캐슬병 바이러스($10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀/마리)를 근육 내에 공격접종하여 14일간 뉴캐슬병 증상 및 폐사를 관찰하여 반수방어용량(PD₅₀)을 조사한다.

2) 닭 전염성 기관지염

안전시험이 끝난 시험계 및 대조계로부터 분리한 혈청을 각각 합하여 56℃에서 30분간 비동화한후 희석한 중화시험용 바이러스와 동량씩 혼합하여 37℃에서 1시간 중화한다. 중화 후 5개이상의 9~11일령 발육계란의 장노막강내에 0.2ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다. 접종 7일후에 계태아 병변을 조사하여 중화지수를 산출한다. 단, 중화시험용 바이러스는 백신제조에 사용된 것과 동일한 바이러스주를 사용한다.

3) 산란저하증

안전시험이 끝난 시험계와 대조계의 혈청을 채취하여 4HA 단위의 항원을 사용하여 적혈구 응집억제 항체가를 조사한다.

4.5.2. 판정

1) 뉴캐슬병

<시험1> 90% 방어율 측정법

대조계는 뉴캐슬병으로 100% 폐사하고 시험계는 90%이상이 건강하게 내과 생존하여야 한다.

<시험2> 반수방어용량(PD₅₀) 측정법

대조계는 100% 폐사하고 백신의 반수방어용량(PD₅₀)이 1/50 이하이어야 한다. 단, 사고계가 생겼을 때는 이를 제외하고 판정한다.

2) 닭 전염성 기관지염

대조계 혈청의 중화지수는 바이러스 역가에 대하여 1.0이하이며 시험계 혈청의 중화지수는 대조계 혈청에 대하여 2.0이상이어야 한다.

3) 산란저하증

시험계는 80% 이상이 적혈구 응집억제 항체가가 16배 이상이어야 하며 대조계는 음성이어야 한다.

1-3-2-12

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하지만 백신생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 근육 내 또는 피하에 접종한다.

<부 기>

부기1. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamysin	200 μ l/ml

부기2. 세포유지용 배지

Medium 199 + F10(2배)	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

뉴캐슬병, 산란저하증, 닭 전염성 F낭병, 닭 레오바이러스 불활화 혼합 유성백신

Newcastle Disease, Egg Drop Syndrome, Infectious Bursal
Disease, Reovirus Combined Vaccine, Inactivated(Oil)

1. 정의

계태아에 증식시킨 뉴캐슬병 바이러스와 오리태아에서 증식시킨 닭 산란저하증후군 바이러스의 감염 뇨막강액, 계태아 섬유아세포에서 증식시킨 닭 전염성 F낭병 바이러스 및 닭 레오바이러스의 배양액을 각각 불활화하여 혼합하고 유성보존제를 첨가하여 만든 백신이며 뉴캐슬병, 닭 산란저하증후군, 전염성 F 낭병 및 닭 레오바이러스 감염증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 뉴캐슬병 바이러스인 La Sota주, 산란저하증후군 바이러스 BC14주, 약독 닭 전염성 F 낭병 바이러스, 닭 레오바이러스 또는 국립수의과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 2.2에 따른다.

2.2.2. 산란저하증 바이러스

1-3-2-12 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염, 산란저하증 불활화 혼합유성백신의 2.2.3에 따른다.

2.2.3. 닭 전염성F낭병 바이러스

1-3-2-04 닭 전염성F낭병 생백신의 2.2에 따른다.

2.2.4. 닭 레오 바이러스

9~11 일령의 SPF 발육계란 유래의 계태아 섬유아세포에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}$ /ml로 희석한 바이러스액 0.2ml를 접종하여 37℃ 부란기에서 2~3일간 배양

후 배양액을 -70°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

2.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 2.3에 따른다.

2.3.2. 산란저하증 바이러스

1-3-2-12 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염, 산란저하증 불활화 혼합유성백신의 2.3.3에 따른다.

2.3.3. 닭 전염성F낭병 바이러스

1-3-2-04 닭 전염성F낭병 생백신의 2.3에 따른다.

2.3.4. 닭 레오 바이러스

계태아 섬유아세포에서 잘 자라며 세포변성효과도 뚜렷하다. 계태아 융모노막에 접종 시 잘 자란다. 혈구응집능력이 없다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 종란 및 세포

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란, SPF 종란으로부터 유래한 계태아 섬유아세포 및 산란저하증후군 바이러스에 대한 항체 음성인 오리 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

3.2.1.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.1에 따른다.

3.2.1.2. 닭 산란저하증 바이러스

1-3-2-12 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염, 산란저하증 불활화 혼합백신의 3.2.1.3에 따른다.

3.2.1.3. 닭 전염성F낭병 바이러스

1-3-2-04 닭 전염성F낭병 생백신의 III-2의 2)조직배양백신 3.2.1 및 3.2.2에 따른다.

3.2.1.4. 닭 레오 바이러스

계태아 섬유아세포를 세포유지용배지(부기1)에 부유시켜 2~3일간 배양 후 배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포유지용배지를 제거하고 보존된

1-3-2-13

중독바이러스를 세포유지용배지에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml로 희석하여 세포유지용배지의 1/10량을 접종한다.

3.2.2. 바이러스 배양

3.2.2.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.2에 따른다.

3.2.2.2. 닭 산란저하증 바이러스

1-3-2-12 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염, 산란저하증 불활화 혼합유성백신의 3.2.2.2.3에 따른다.

3.2.2.3. 닭 전염성F낭병 바이러스

1-3-2-04 닭 전염성F낭병 생백신의 3.2의 2)조직배양백신 3.2.2에 따른다.

3.2.2.4. 닭 레오 바이러스

접종한 배양기를 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

3.2.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.2.3에 따른다.

3.2.3.2. 닭 산란저하증 바이러스

1-3-2-12 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염, 산란저하증 불활화 혼합유성백신의 3.2.3.3에 따른다.

3.2.3.3. 닭 전염성F낭병 바이러스

1-3-2-04 닭 전염성F낭병 생백신의 3.2의 2)조직배양백신 3.2.3에 따른다.

3.2.3.4. 닭 레오 바이러스

바이러스 배양 후 세포변성효과가 60~80% 나타났을 때 바이러스 감염배양액을 무균적으로 수확한다.

3.2.4. 불활화

각각 수확한 바이러스원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 1N NaOH용액으로 pH 6.6~7.6으로 조정후 0.2%가 되게 포르말린을 첨가하여 37℃에서 15시간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다(단 조직배양백신

에 한한다).

3.3.2. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다(단 계태아유래 백신에 한한다).

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 뉴캐슬병 바이러스

1-3-2-01 뉴캐슬병 생백신의 3.3.3에 의한 검사에 따른다.

3.3.3.2. 닭 산란저하증 바이러스

1-3-2-12 뉴캐슬병, 닭 전염성기관지염, 산란저하증, 불활화 혼합유성백신의 3.3.3에 의한 검사에 따른다.

3.3.3.3. 닭 전염성F낭병 바이러스

1-3-2-04 닭 전염성F낭병 생백신의 3.3.4의 2)조직배양백신에 의한 검사에 따른다.

3.3.3.4. 닭 레오 바이러스

3.3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 세포유지용 배지로 10배 단계 희석하여 계태아 섬유아세포배양 96well microplate에 각각 0.1ml씩을 넣고 37℃의 CO₂ 부란기에서 5일간 배양 관찰한다.

3.3.3.4.2. 판정

바이러스 함량은 마리 당 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

불활화 된 각각의 원액을 100목 동망으로 여과한 후 뉴캐슬병 바이러스 감염액 10%, 닭 산란저하증 바이러스 감염액 10%, 닭 전염성 F낭병 바이러스 감염액 10%, 닭 레오 바이러스 감염액 10%와 적당한 유성보존제를 60%되게 가하여 혼합한 후 균등액이 되게 진탕하면서 잘흔들어 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다

4. 검사방법

4.1. 특성시험

1-3-2-13

동물용 생물학제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 부유액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 불활화 확인시험

4.3.1. 재료 및 시험

산란저하증 바이러스에 감수성이 있는 9~11일령의 발육오리란을 10개 사용하여 검사품을 뇨막강 내에 0.2ml씩 접종하여 37℃에서 배양한다. 접종 7일 후에 뇨막강액을 채취하여 2차로 10개의 9~11일령의 발육오리란의 뇨막강내에 0.2ml씩 계대 접종한 후 37℃에서 7일간 배양한다. 각각의 접종란은 접종 7일 후에 뇨막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다.

4.3.2. 판정

검사품을 1차 접종한 발육란과 1차 접종하여 얻은 뇨막강액을 2차 접종한 발육란은 이상이 없어야 하며 뇨막강액은 적혈구 응집성이 없어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 바이러스, 산란저하증 바이러스, 닭 전염성 F낭병 바이러스 및 닭 레오바이러스에 감수성이 있는 3~4주령 및 6~8주령 닭 20마리를 각각 사용하여 15마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 한다. 시험계에 검사품을 3~4주령 닭에는 권장접종량의 2배량을, 6~8주령 닭에는 권장접종량을 사용법에 따라 접종하여 21일간 대조계와 같이 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 시험계는 시험기간중 건강하여야 한다.

4.5 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

뉴캐슬병 시험동물은 뉴캐슬병 바이러스에 감수성이 있는 6~8주령의 닭 20마리를 사용하며 닭 레오바이러스 시험동물은 6~8주령 닭 30마리를 사용하여 20마리는 시험계로, 10마리는 무접종 대조계로 한다. 안전시험이 끝난 6~8주령 닭은 산란저하증 및 닭 전염성F낭병 시험동물로 한다.

1) 뉴캐슬병

<시험1> 또는 <시험2>에 따른다.

<시험1> 90% 방어율 측정법

시험계에 검사품의 접종량을 사용법에 따라 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 공격용 뉴캐슬병 바이러스($10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀/마리)를 근육 내에 공격접종하고 14일간 뉴캐슬병 증상 및 폐사를 관찰한다.

<시험2> 반수방어용량(PD₅₀) 측정법

접종량의 1, 1/25, 1/50, 그리고 1/100배의 양을 각각 시험계 4마리에 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 공격용 뉴캐슬병 바이러스($10^{5.0} \sim 10^{6.0}$ ELD₅₀/마리)를 근육 내에 공격접종하여 14일간 뉴캐슬병 증상 및 폐사를 관찰하여 반수방어용량(PD₅₀)을 조사한다.

2) 닭 산란저하증

안전시험이 끝난 시험계와 대조계의 혈청을 채취하여 4HA 단위의 항원을 사용하여 닭 적혈구 응집억제 항체를 조사한다.

3) 닭 전염성 F낭병

안전시험이 끝난 시험계 및 대조계의 혈청을 채취하여 면역확산반응에 의하여 항체형성 유무를 조사한다.

4) 닭 레오바이러스

<시험1> 또는 <시험2>의 방법에 의한다.

<시험1> 시험계에 검사품의 접종량을 사용법에 따라 접종하고 21일후에 시험계와 대조계에 공격용 바이러스($10^{3.0}$ ELD₅₀)를 발바닥에 접종하고 14일간 관찰한다.

<시험2> 시험계에 공시품의 권장접종량을 사용법에 따라 접종하고 28일후에 시험계와 대조계로부터 혈청을 분리하여 면역확산반응을 실시한다.

4.5.2. 판정

1) 뉴캐슬병

<시험1> 90% 방어율 측정법

대조계는 뉴캐슬병으로 100% 폐사하고 시험계는 90%이상 건강하게 내과 생존하여야 한다.

<시험2> 반수방어용량(PD₅₀) 측정법

대조계는 100% 폐사하고 백신의 반수방어용량(PD₅₀)이 1/50 이하이어야 한다.

2) 닭 산란저하증

시험계의 80% 이상이 적혈구 응집억제 항체가가 16배 이상이어야 하며 대조계는 음성이어야 한다.

3) 닭 전염성 F낭병

시험계의 80%이상이 항체 양성이어야 하며 대조계는 음성이어야 한다.

4) 닭 레오바이러스

<시험1> 대조계의 80%이상이 접종 다리에 바이러스성 관절염의 전형적인 증상이 나타나야하며 시험계는 80%이상이 건강하여야 한다.

<시험2> 면역확산반응에서 시험계의 80% 이상이 항체 양성이어야 하며 대조계는 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하지만 백신생산업체에 따라 유효기간을 달리 할 수 있다.

6. 사용방법

규정량을 근육 내 또는 피하에 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포유지용 배지

Medium 199 + F10(2배)

Tryptose phosphate broth 5%

Fetal bovine serum 5%

7.5% sodium bicarbonate 2%

Fungizone 0.025 μ g/ml

Penicillin G-Na 200unit/ml

Streptomycin 100 μ g/ml

여 백

1-4 개

여 백

개 렙토스피라 불활화백신

Canine Leptospirosis Vaccine, Inactivated

1. 정의

개 렙토스피라 배양액을 불활화하고 보호제를 가하여 만든 백신이며 개의 렙토스피라 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Leptospira canicola 및 *Leptospira icterohaemorrhagiae*주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Leptospira canicola 및 *Leptospira icterohaemorrhagiae* 균주를 Ellinghausen's semisolid oleic albumin 배지(부기1)에 30℃에서 1~2주간 배양하면서 각각 접종하여 *Leptospira*균 활성을 확인한 후 각각 채균하여 28℃ 항온기에 4주 간격으로 계대하고 보존하며, 6개월에 1회씩 실험동물에 통과시켜 균 활력을 유지시킨다.

2.3. 성상 및 독력

암시야 장치 현미경으로 균을 검사하면 나선형이며 균체의 양끝은 갈고리 모양으로 구부러져 있거나 회전, 사행운동을 한다. 생후 1~4년 된 개에 감염발병이 쉬우며 뇨에서 균이 검출, 배양된다. 56℃에서 20분 안에 사멸되며 동물체 밖에서는 오래 생존하지 못한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

개 렙토스피라균 Ellinghausen's semisolid oleic albumin medium(부기1) 및 증균용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균 배양

원 종균 배양 균액을 렙토스피라 배양 배지(부기1)에 접종하여 28℃에서 7일간 진탕배양한 것을 종균으로 사용한다.

3.2.2. 본배양

배양된 종균을 랩토스피라 증균용배지(부기2)에 접종하고 28℃에서 7일간 진탕배양한다.

3.2.3. 집균

배양 중에 무균적으로 배양액을 채취하여 암시야 현미경으로 균수를 측정하여 균수가 가장 많이 증식(40억/ml개 이상)된 시기에 배양을 중지하고 배양액을 무균적으로 집균한다. 집균액의 일부는 채취하여 원액검사에 사용하고 나머지는 항원농도를 조절한 후 불활화한다.

3.2.4. 불활화

집균된 배양액은 항원농도를 조절한 후 포르말린을 최종농도가 0.2%되게 첨가하고 실온에서 교반하면서 3일간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

랩토스피라 증균용배지에서 14일간 배양하여 균 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화 된 균액을 10,000 rpm에서 원심하여 PBS(부기3)로 2회 세척한 후 *Leptospira canicola* 및 *Leptospira icterohaemorrhagiae* 불활화 균액의 균수가 각각 1×10^8 /ml개 이상이 되도록 PBS(부기3)로 균 농도를 조절하고 치메로살을 0.01% 첨가한 후 수산화알루미늄 겔을 20% 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 적색 또는 담적색의 투명한 부유액으로서 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

렙토스피라 증균용배지에서 14일간 배양하여 균 발육이 인정되어서는 아니된다.

4.5. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 따라 치메살 0.01% 이하이어야 한다.

4.6. 안전시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 각 2마리에 1ml씩을 근육내 및 피하에 근육 내에 접종하고 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰한다.

4.6.2. 판정

주사부위를 중심으로 화농 및 괴사등의 부작용이 없이 생존해야 한다.

4.7. 역가시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 약 300~400g의 건강한 기니픽 10마리 또는 6개월령 미만의 렙토스피라 항체 음성인 개 3마리를 사용한다. 기니픽 및 개에 검사품의 규정량을 14일간격으로 2회 피하 접종한다. 2차 접종 14일 후에 채혈하여 각 혈청형별 항체를 측정한다. 렙토스피라 항원은 배지에 4~7일간 배양하여 1ml당 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 균수로 사용한다.

4.7.2. 판정

각각의 혈청에 대한 항체는 기니픽에서 80% 이상이 10배 이상의 응집가를 나타내어야 하며, 개의 경우는 모두 10배 이상의 응집가를 나타내어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

연령 및 체중에 관계없이 두당 1ml를 견갑부 피하 또는 대퇴부 근육 내에 주사한후 2~4주 후 보강접종한다.

<부 기>

부기1. Ellinghausen's semisolid oleic albumin medium

가. 저장용액

1) 25배 인산염완충식염액

Na ₂ HPO ₄	16.6g
KH ₂ PO ₄	2.172g
D.W	1,000ml

2) 20배 식염액

NaCl	38.5g
NH ₄ Cl	5.35g
NaCl ₂ · 6H ₂ O	3.81g
D.W	1,000ml

3) Cu⁺⁺ 용액

CuSO ₄	30mg
D.W	100ml

4) Zn⁺⁺ 용액

ZnSO ₄ · 7H ₂ O	80mg
D.W	200ml

5) Fe⁺⁺ 용액

FeSO ₄ · 7H ₂ O	80mg
D.W	200ml

6) 비타민 B₁₂ 농축 저장액

Vitamin B ₁₂	10mg
D.W	1,000ml

7) 비타민 B₁₂ 농축 저장액

농축저장액	10mg
D.W	90ml

8) 다아민 HCl B₁ 용액

다아민 HCl B ₁₂	200mg
-------------------------------	-------

- D.W 100ml
- 9) 1% Tween 80 용액
 Tween 80 10ml
 D.W 1,000ml
 Tween 80을 60℃로 가열 용해토록 하며 플라스틱 병에 분병하여 보존한다.
- 10) 소혈청 알부민 용액
 소혈청 알부민 50ml
 25배 인산염완충식염액 40ml
 D.W 960ml
 1% Tween 80용액은 동결보존한다. 그 외는 냉장고에서 보존한다.

나. 배지의 조성

- 1) 25배 인산염완충식염액..... 40ml
 20배 식염액..... 50ml
 Cu⁺⁺용액..... 1ml
 Zn⁺⁺용액..... 10ml
 Fe⁺⁺용액..... 20ml
 D.W 700ml
 균질하게 되도록 잘 혼합한다.
 L-Cystine..... 0.2g
 5분 동안 흔들고 짓는다.(가열하지 말 것)
- 2) 2중의 두꺼운 와트만 No1여과지에 여과한다. 여과액이 맑지 않으면 여과를 반복한다.
- 3) 비타민 B₁₂ 용액 20ml를 가한다.
- 4) 디아민 HCl B₁ 용액을 0.1ml가한다.
- 5) 1% Tween 80 용액 120ml을 가한다.(동결보존한 것을 녹여서)
- 6) 증류수로 1,000ml가 되도록 채운다.
- 7) 2.2g의 한천을 가하여 녹을 때까지 저으면서 가열한다. 그러나 배지가 끓어서는 아니된다.
- 8) 800ml를 다른 멸균 멸균병에 옮겨 121℃ 15분간 고압소독 한 후 항온수조에서 56℃로 보존한다.

1-4-1-01

9) 5%의 여과 멸균한 소혈청 알부민액 200ml를 가한다.

(알부민 용액은 하룻밤 부란기에 넣어 따뜻하게 한다)

10) 스쿠르캡 시험관에 분병한다.

위의 조성에서 한천을 제외하면 엘린하우젠씨 액상유성배지가 된다.

부기2. Leptospira 증균용 배지(1L 기준)

Leptospira medium base, EMJH 2.3g

D.W 900ml

15Lb에 15분간 고압 멸균후

Leptospira enrichment, EMJH 100ml

첨가 50ml 시험관에 25ml씩 분주해서 사용한다.

부기3. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Nacl 8g

KCl 0.2g

KH₂PO₄ 0.2g

Na₂HPO₄ 1.15g

D.W 1,000ml

개 보테텔라 브론키셉티카 생백신

Canine Bordetella bronchiseptica(Kennel Cough)vaccine, Live

1. 정의

개의 보테텔라 브론키셉티카 균 배양액을 동결건조한 백신이며 개의 보테텔라 브론키셉티카 감염증의 예방에 사용한다.

2. 사용균

2.1. 균주

개의 *Bordetella bronchiseptica* S-55 균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

종균을 tryptic soy agar(TSA)평판 배지에 이식하여 37℃에서 40시간 배양한 후 순수한 균집락을 선정 채취하여 다시 tryptic soy broth(TSB)배지에 이식하고 37℃에서 12~15시간 배양한 후 배양액을 채균하여 -80℃이하에 동결보존, 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

개의 *Bordetella bronchiseptica*는 개의 호흡기 질병에 가장 흔하게 관여하는 그람음성의 작은 간균으로서 blood agar에서 용혈성이 있으며, 피부괴사독소(dermonecrotising toxin : DNT)를 생성하는 특성이 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

TSA 배지 및 TSB 배지를 사용하거나 이에 준하는 배지를 사용할 수 있다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

종균을 TSB 배지에 접종하고 37℃에서 12~15시간 배양한 다음 TSA 평판 배지에 이식하여 37℃에서 40시간 배양한 후 순수한 균집락을 선정 채취하여 다시 TSB배지에 이식하고 37℃에서 12~15시간 배양한 균액을 채균하여 종균으로 사용한다.

1-4-1-02

3.2.2. 본배양

TSB 배지에 종균을 배지량의 1%되게 접종하고 37℃에서 12~15시간 배양한다.

3.2.3. 집균

배양균액은 잡균의 혼입여부를 관찰한 후 100 mash 동당 또는 가제로 여과하여 집균한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다

3.3.2. 균수시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 10배 단계 희석하고 각 희석액 1ml을 TSA 평판 배지에 접종하고 그 위에 다시 TSA를 덮은 다음 37℃에서 40시간 배양한 후 균수를 계산한다,

3.3.2.2. 판정

*Bordetella bronchiseptica*균수는 1마리당 1×10^8 개 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

집균된 균액의 균수를 최종조절한 원액에 보호제(부기1)를 20%가하여 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 따라 회백색 또는 황백색의 건조괴로서 이물질 또는 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다

4.5. 균수시험

4.5.1. 동물 및 시험

검사품을 10배 단계 희석하고 각 희석액 1ml을 TSA 평판 배지에 접종하고 그 위에 다시 TSA를 덮은 다음 37°C에서 40시간 배양한 후 colony 수를 계산한다.

4.5.2. 판정

*Bordetella bronchiseptica*균수는 1마리당 1×10^7 개 이상이어야 한다

4.6. 안전시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리 및 체중 300~350g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 검사품을 희석액으로 용해하여 마우스에는 0.25ml씩을, 기니픽에는 0.5ml씩을 각각피하에 접종한 다음 7일간 관찰하며, *Bordetella bronchiseptica*에 대한 항체음성인 6주령(체중 3kg)의 개 4마리를 선정하며 개 2마리는 3마리분을, 개 2마리는 1마리 분을 각각 비강 내로 접종하여 21일간 관찰한다.

4.6.2. 판정

모든 동물은 이상 없이 생존하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12~18개월간 유효하다.

6. 사용방법

건강한 동물에만 접종하여야 하며 백신은 직사광선을 피하고 부표의 용법용량에 의해 용해 후 즉시 사용한다.

1-4-1-02

<부 기>

부기1. 보호제(LPGG)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

개 보데텔라 브론키셉티카 균체, 독소이드 불활화 혼합백신

Canine Bordetella bronchiseptica(Kennel Cough), Toxoid
Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

개 보데텔라 브론키셉티카 균을 순수배양한 균액과 이균에서 얻은 독소이드를 불활화하여 혼합한 백신이며, 이 균에 의한 개 전염성호흡기 감염증의 예방에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

개의 호흡기질환인 kennel cough 등 기관지폐염에 감염된 환경으로부터 분리된 *Bordetella bronchiseptica* 균주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

혈액한천배지(blood agar)상의 37℃에서 48시간 배양 후 용혈성이 있는 단독집락을 선정하여 tryptic soy broth(TSB)에 이식하여 37℃에서 18~24시간 배양하여 배양액을 -80℃이하에 동결보존 또는 보호제를 가한 후 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

*Bordetella bronchiseptica*는 개의 호흡기 질병에 가장 흔하게 관여하는 그람음성(-)의 작은 간균으로서 blood agar에서 용혈성이 있으며, MacConkey agar(+), urea 분해능(+), oxidase(+) 및 glucose(-) 등의 생화학적 성상과 피부괴사독소(dermonecrotising toxin : DNT)를 생성한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Tryptic soy agar(TSA) 및 TSB배지를 사용하거나 이에 준하는 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

종균을 멸균식염수에 용해하여 TSA 배지에 이식하고 37℃에서 48시간 배양하여 단독집락을 선택하여 TSB 배지에 이식하여 37℃에서 24시간 진탕 배양한다.

3.2.2. 본배양

제조용 배지를 fermentor에 완전히 용해 후 배양기에 분주하고 121℃에서 20분간 고압증기멸균하고 냉각수를 이용하여 37℃를 유지하면서 배양한기에 종균배양액을 배지량의 1%되게 접종하고 37℃에서 18~24시간 배양한다.

3.2.3. 집균

종균을 접종한 후 37℃에서 18~24시간 배양한 후 잡균의 혼입여부를 관찰한 후 연속원심분리기(Sharples centrifuges, TOMOE)를 사용하여 균체만을 수집하고 멸균 phosphate buffered saline(PBS)으로 균 배양액이 1/20양으로 되게 재부유한다.

3.2.4. 불활화

3.2.4.1. 균체 불활화

집균하여 재 부유한 균액에 포르말린을 0.3% 첨가하여 37℃에서 72시간 불활화한다.

3.2.4.2. Toxin(crude dermonecrotising toxin : cDNT)의 분리 및 불활화

집균하여 재 부유한 균액을 초음파 분쇄기를 사용하여 분쇄한 후 8,000rpm에서 30분간 원심분리하고 그 상층액을 cDNT를 함유한 원액으로 한다. 원심분리 한 상층액의 일부는 protein 농도측정에 사용하고 나머지는 포르말린을 0.5% 첨가하여 37℃에서 72시간 불활화한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 균체의 불활화 확인시험

3.3.3.1.1. 재료 및 시험

균 불활화 한 균액을 혈액배지에 도말하여 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.3.1.2. 판정

어떠한 세균의 증식도 없어야 한다.

3.3.3.2. Toxoid의 불활화 확인시험

3.3.3.2.1. 재료 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 및 기니픽을 300~350g의 건강한 기니픽을 각각 10수씩 선정하여 마우스는 불활화 된 검사품을 복강에 0.1ml씩 접종하고 기니픽 피내에 0.1ml씩 접종하여 7일간 관찰한다.

3.3.3.2.2. 판정

시험동물은 모두 이상 없이 생존하고 마우스는 비장의 크기가 위축됨이 없어야하며 피부괴사가 없어야 한다.

3.4. 최종원액

BCA protein assay reagent kit(Pierce Co.)를 이용하여 standard albumin의 protein 함량을 기준으로 보데텔라 독소이드 protein 농도를 측정하여 *Bordetella bronchiseptica* 불활화 된 균체항원은 1.5×10^{10} /ml개 이상, 불활화 독소이드 항원은 200 μ g/ml이상 되도록 조절하여 수산화알루미늄겔 10mg, ISA25 3%, 포르말린 0.2%, 치메로살 0.01%이하를 함유하도록 교반하면서 균등액이 되도록 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 색으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2% 이하, 지메로살 함유량은 0.01%이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 10마리를 선정하여 검사품을 5마리는 0.5ml씩을 복강에, 5마리는 0.5ml씩을 피하에, 체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 선정하여 근육 내 및 피하에 각 2마리에 1ml씩을 각각 접종하여 7일간 관찰하고 2마리는 0.1ml씩 피내에 접종하여 7일간 관찰한다. 또한 생후 3~4주령의 건강한 개 6마리를 선정하여 4마리는 규정량의 2배 용량인 1m씩을 근육 내에 접종하고 2마리는 대조로 하여 2주간 관찰한다.

4.4.2. 판정

마우스는 모두 이상 없이 생존하여야 하며 개는 접종 후 1~2시간 이내에 과민반응이 없어야 하고 각각 2주간 관찰하여 주사부위에 화농 및 괴사등의 부작용이 없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 보데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*)

4.5.1.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 검사품을 마우스 20마리는 개 1두분 용량의 1/5로 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고, 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후에 *Bordetella bronchiseptica*균 10LD₅₀/0.2ml을 각각 복강에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다.

4.5.1.2. 판정

보데텔라 브론키셉티카(*Bordetella bronchiseptica*) 검사품은 80%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.

4.5.2. 보데텔라 브론키셉티카 독소이드(*Bordetella bronchiseptica toxoid*)

다음의 시험방법 중 제품의 특성(당해 제품의 기준 및 시험방법)에 적합한 한 가지 방법으로 시험을 실시한다.

4.5.2.1. 동물 및 시험

체중 15~20g의 건강한 마우스 30마리를 선정하여 마우스 20마리는 검사품을 개 1두분 용량의 1/5로 2주 간격으로 2회 복강에 접종하고, 10마리는 대조로 둔다. 2차 접종 10일 후에 *Bordetella bronchiseptica* cDNT 4MLD/0.2ml을 각각 복강에 접종하고 10일간 생존여부를 관찰한다. cDNT MLD(minimum

lethal dose)는 cDNT를 PBS로 2단계 희석하고, 각 희석배수별로 10마리의 마우스에 0.2ml씩 복강에 접종하여 10일간 관찰한다.

4.5.1.2.2. 판정

관찰 결과 마우스가 100% 폐사한 최고희석배수를 1MLD/0.2ml로 한다. 판정은 검사품 접종군은 80%이상 생존하여야 하고 대조군은 100% 폐사하여야 한다.. *Bordetella bronchiseptica*에 대한 항체 음성인 1.5~2kg의 건강한 토끼 6마리를 선정하여 검사품을 4마리는 규정량을 2주 간격으로 근육 내에 2회 접종하고 2마리는 대조로 한다. 2차 접종 2주 후에 채혈하여 ELISA법에 의하여 항체를 측정한다. *Bordetella bronchiseptica* toxoid에 대한 ELISA 항체는 검사품 접종군은 256배 이상이어야 하고 대조군은 항체가가 8배 이하이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

18개월간 유효하다.

6. 사용방법

건강한 동물에만 접종하여야 하며 사용 전 실온에서 1시간정도 방치 후 충분히 흔들어서 동봉된 사용설명서에 따라 사용한다.

광견병 생백신

Rabies Vaccine, Live

1. 정의

조직배양 순화약독 광견병 바이러스를 조직배양 세포에 증식시켜 감염배양액을 동결건조한 백신이며 광견병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

돼지 신장조직배양 순화 광견병 바이러스 ERA주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지신장조직배양세포에 접종하여 37°C에서 4~6일간 증식배양한 후 감염극기에 배양액을 -80°C 이하에 동결보존 또는 동결건조 하여 -4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

야외 사용량의 10배의 종독을 6개월령 이상의 개 근육 내에 접종하여 4주간 관찰하였을 때 종독에 의한 광견병 특이의 임상증상이 없으며 돼지 신장조직의 배양 세포에 접종하였을 때 2주 이상의 관찰 기간 중 세포변성을 일으키지 않는다. 이 시험은 연 12회 실시한다. 또한 체중 12g의 건강한 마우스 뇌 내에 종독을 10진 희석하여 각 희석액별 0.03ml를 접종하여 3주간 관찰하였을 때 감염가가 $10^{5.0}LD_{50}/0.03ml$ 이상이어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

돼지 신장조직 배양세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 돼지 신장세포를 세포증식용배지(부기1)에

부유시켜 37℃에서 3~4일간 배양하면서 세포 단층이 형성할 때까지 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

세포증식용 배지를 제거하고 세포유지용 배지(부기2)에 $10^{4.0}LD_{50}/0.03ml$ 의 광견병 바이러스(ERA주)를 접종하여 37℃에서 4~5일간 회전배양한다

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 바이러스의 감염극기에 배양액을 무균적으로 수집하여 120 Mash 동망으로 여과하여 배양액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법Ⅳ-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 약외 사용량으로 희석하고 여기에 광견병 고도면역혈청을 동량 가하고 5℃에서 2시간 잠작시킨 후 돼지 신장배양세포에 접종하고 37℃에서 7일간 회전배양하면서 세포 변성효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

배양세포에 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스함량 시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

2~5% 말 혈청가 생리적 식염수로 검사품을 약외 사용량으로 희석하고 10배 단계 희석법으로 $10^{-6.0}$ 까지 희석한 것을 13~15g의 건강한 마우스 10마리 이상에 각 희석액별로 각각 0.03ml씩 뇌 내에 접종하여 21일간 관찰하여 베렌스겔바(Behrens-Käber)방법에 의하여 LD_{50} 을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{4.0}LD_{50}/0.03ml$ 이상이어야 한다. 단, 접종 후 4일 내에 폐사하는 것은 제외한다. 그리고 접종 후 4일간의 마우스의 폐사율이 20%이상일 때에는 다시 시험 한다.

3.4. 최종원액

1-4-2-01

바이러스 함량을 조정한 원액과 보호제(부기3)를 동량 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 담홍 또는 대홍 회백 색의 건조괴이며, 용해용 용액을 가하여 흔들면 쉽게 균등한 현탁액이 되며, 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 검사법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 합습도시험

동물용 생물학적제제 일반 검사법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 검사법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.6. 바이러스 함량시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

중화항체 음성인 6개월령(체중 10kg) 건강한 개 2마리와 체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 350~400g의 건강한 기니픽 4마리를 선정하여 개에는 10두분을 근육 내에 접종하고 최소한 28일간 관찰한다. 마우스 5마리는 복강 내에, 5마리는 피하에 각각 0.5ml씩 접종하고, 기니픽 4마리는 피하에 각각 2ml씩 접종하고 7일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

검사품으로 인한 어떠한 질병 발생없이 모두 건강하게 생존하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

체중 350g의 건강한 기니픽 20마리를 선정하여 15마리는 시험군으로 5마리는 대조군으로 하여 검사품 1마리분예 2% 말 혈청을 가한 생리식염수로 전량이 20ml가 되도록 희석하여 잘 용해한 후 0.25ml씩 시험군의 기니픽 대퇴부 근육 내에 접종하고 접종 후 21일간 관찰한다. 접종군중 9마리 이상이 생존해야하며 8마리 이하일 경우 시험을 다시하여야 한다. 생존한 기니픽에 공격바이러스 2MLD를 0.5ml씩 대퇴부 근육 내에 공격접종하고 공격일로부터 15일간 관찰한다.

4.8.2. 판정

공격접종군은 70%이상 생존하여야하며 대조군은 80%이상 감염 폐사하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

규정된 희석액으로 잘 혼합하여 1두분을 건강한 개의 대퇴부 근육 내에 주사한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지(Hank's balanced salt solution)

Sodium chloride	8.0 g
Potassium chloride	0.4 g
Calcium chloride	0.14 g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2 g
Potassium dihydrogen phosphate	0.06 g
Sodium hydrogen phosphate	0.0475 g
Glucose	1.0 g
Phenol red	0.02 g
Lactalbumin hydrolysate	5.0 g
Streptomycin sulfate	0.2mg/ml
D.W	1,000ml
Calf serum	5~10%

부기2. 세포유지용 배지

상기 세포증식용 배지에 calf serum을 2%되게 감량 첨가한다.

부기3. 보호제 LPGG(lactose, phosphate, glutamate, gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

개 파보바이러스 생백신

Canine Parvovirus Vaccine, Live

1. 정의

개 파보바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 감염배양액에 보호제를 가하여 동결건조한 생 백신이며 개 파보바이러스 감염증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

개 파보바이러스 약독주(C-780916 주 및 FK주) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

개 파보바이러스를 CRFK세포(Crandel feline kidney cell)에 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 를 접종하고 37℃에서 4~6일간 배양한 후 감염 배양액을 -80℃이하에 동결보존또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

개 파보바이러스는 CRFK세포 및 A-72세포에서 자라고, 돼지혈구에 혈구응집반응을 일으키며, 기니픽, 마우스에서 병원성이 없으며, 안전성도 뛰어나다. 개 파보바이러스 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

CRFK세포 또는 A-72 세포주를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

CRFK세포를 세포증식용 배지(부기1)에 부유시켜 세포 배양병에 분주한 후 37C에서 3~4일간 배양하면서 배양세포의 단층이 50% 형성 될 때까지 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포 증식용 배지를 제거하고 개 파보바이러스를 $10^{4.0}$ TCID/ml 접종하여 37°C에서 4~6일간 배양하면서 세포변성 효과가 80%이상 출현할 때까지 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 (배양액의 혈구응집능이 1:1,000배 이상 달하였을 때)바이러스 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품에 동량의 개 파보바이러스 고도 면역혈청을 가한 후 37°C에서 2시간 감작하여 중화시킨 후 고양어 신장세포(CRFK cell)가 배양된 5개의 시험관에 검사품을 각각 0.1ml씩 접종하고 37°C에서 7일간 배양한다.

3.3.2.2. 판정

배양세포 내에 봉입체를 형성하거나 세포변성효과 또는 적혈구 응집현상을 일으키는 미입 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 세포배양법

3.3.3.1.1. 재료 및 시험

검사품을 10배 단계적으로 10^{-5} 까지 희석하고 각 희석액 0.1ml를 10개의 고양어 신장세포 또는 CRFK세포 또는 A72세포가 배양된 시험관 또는 24well plate에 접종한 후 37°C에서 7일간 배양하여 적혈구 응집상태 또는 세포변성효과를 현미경으로 관찰하여 바이러스의 함량을 산출한다.

3.3.3.1.2. 판정

바이러스함량은 1두분당 $10^{5.0}$ TCID₅₀이상 이어야 한다.

3.3.3.2. 형광항체법(fluorescent antibody assay)

3.3.3.2.1. 재료및시험

검사품을 인산완충식염수(PBS)로 10배 단계 희석하여 각 희석 바이러스액을 8 well slide chamber에 증식시킨 고양이 신장세포에 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 4일간 배양한다. 4일 후 상층액을 조심히 버린다. -20℃의 80% acetone으로 세포를 고정한다. PBS로 세 번 세척하고 37℃에서 20분간 건조한 후 개 파보바이러스 특이 단클론항체 0.1ml씩을 분주한다. 37℃에서 1시간 배양 후 PBS로 세척한 후 Anti-mouse IgG FITC conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 배양한다. PBS로 세척한 후 형광현미경으로 특이 형광을 관찰한다.

3.3.3.2.2. 판정

바이러스함량은 1두분당 $10^{5.0}$ FAID₅₀ 이상 이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 조정된 원액에 보호제(부기3)를 20%되게 가하여 유제액을 만들고 120목 동망으로 여과한 후 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 담홍 또는 대홍 회백색의 건조괴이며, 용해용 용액을 가하여 흔들면 쉽게 균등한 현탁액이 되며, 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

1-4-2-02

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 4마리 및 개 파보바이러스 항체음성의 건강한 3개월령 개 6마리를 사용한다. 검사품을 마우스에는 0.5ml씩을 피하 및 복강 내에 각각 5마리씩 접종하고, 기니픽에는 복강 내에 2ml씩 접종하여 7일간 관찰한다. 개는 2마리는 3두분을 다른 2마리에는 1두분을 각각 피하에 접종하고 대조개와 같이 14일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

모든 동물은 관찰기간 중 모두 이상 없이 생존하여야 한다.

4.6. 미입바이러스 부정시험

3.5.2에 의한 검사에 따른다.

4.7. 바이러스 함량시험

3.5.3에 의한 검사에 따른다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 1두분 접종개 2마리 및 대조개 2마리를 사용한다. 1두분 접종개는 안전시험이 끝난 날 다시 1두분을 피하에 각각 접종하고 2주 후에 채혈한 혼합혈청과 대조혼합혈청을 사용하여 개 파보바이러스에 대한 혈구응집억제항체가 또는 중화 항체를 측정한다.

4.8.2. 판정

시험개의 개 파보바이러스에 대한 혈구응집억제가 또는 중화항체가가 80배 이상이어야 하며 대조개는 10배 이하의 음성이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효한다.

6. 사용방법

견갑부 피하 또는 뒷다리부분의 근육 내에 1마리 분 1.0ml씩을 접종한다.

모체 이행항체에 따라 접종시기를 달리하나, 일반적으로 생후 4~6주령에 실시하고, 2차 접종은 8~9주령에 실시하며, 그 후 1년마다 보강 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM 용해액

Lactalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM

Lactalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. 보호제 LPGG(lactose, phosphate, glutamate, gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

개 파보바이러스, 코로나바이러스 생 혼합백신

Canine Parvovirus, Coronavirus Combined Vaccine, Live

1. 정의

조직배양 순화약독 개 파보바이러스와 개 코로나바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 감염배양액을 혼합하고 보호제를 가하여 동결건조한 생 백신이며 개 파보바이러스 및 개 코로나바이러스 감염증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 개 파보바이러스 C-780916주 및 개 코로나바이러스 K-378주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 개 파보바이러스 C-780916주

개 파보바이러스를 CRFK세포(crandel feline kidney cell)에 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하고 37℃에서 4~6일간 배양한 후 감염 배양액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 개 코로나바이러스 K-378주

개 코로나바이러스를 A-72주화세포(canine tumor cell origin, ATCC. CRL-1542)에 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하고 37℃에서 3~5일간 배양한 후 배양감염액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

2.3.1. 개 파보바이러스

CRFK세포(crandel feline kidney cell) 또는 A-72세포에서 자라고, 돼지혈구에 혈구응집반응을 일으키며 기니픽, 마우스에서 병원성이 없으며, 안전성도 뛰어나다. 개 파보바이러스 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화된다.

2.3.2. 개 코로나 바이러스

개 코로나바이러스는 개에서만 설사를 일으키며 다른 동물에 영향을 주지 않는다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 개 파보바이러스

3.1.1.1. 세포

CRFK세포를 사용한다.

3.1.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.1.2. 개 코로나바이러스

3.1.2.1. 세포

A-72세포주를 사용한다.

3.1.2.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 개 파보바이러스

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.2 원액제조 3.2.1, 3.2.2, 3.2.3의 방법에 따른다.

3.2.2. 개 코로나 바이러스

3.2.2.1. 세포배양

A-72세포를 세포증식용 배지(부기1)에 부유시켜 세포배양병에 분주한 후 37℃에서 3~5일간 배양하면서 배양세포의 단층이 50% 형성될 때까지 배양한다.

3.2.2.2. 바이러스 배양

배양세포의 단층이 형성되었을 때 세포 증식용 배지를 제거하고 개 코로나바이러스를 0.01 M.O.I(multiplicity of infection) 접종하여 37℃에서 1시간 흡착한 후 세포유지용 배지(부기2)를 넣고 37℃에서 3~5일간 배양한다.

3.2.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 80%정도의 CPE가 출현하였을 때 배양병을 동결 및 용해 과정을 3회 반복시킨 후 무균적으로 배양액을 수검하여 1,500rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

1-4-2-03

3.3. 원액검사

3.3.1. 개 파보바이러스

3.3.1.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.1.2. 미입바이러스 부정시험

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.3.2에 의한 검사에 따른다.

3.3.1.3. 바이러스 함량시험

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.3.3에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 개 코로나바이러스

3.3.2.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.2.1. 재료 및 시험

검사품에 동량의 개 코로나 바이러스로 고도 면역된 혈청을 가한 후 37℃에서 2시간 감작하여 중화시킨 후 A-72세포가 배양된 5개의 시험관에 검사품을 각각 0.1ml씩을 접종하고 37℃에서 3~5일간 배양한다.

3.3.2.2.2. 판정

배양세포에서 세포변성효과 또는 적혈구 응집현상을 일으키는 미입 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

3.3.2.3. 바이러스 함량시험

3.3.2.3.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10진 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72 세포가 배양된 plate에 접종하고 37℃에서 3~5일간 배양하며 세포변성효과(CPE)를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.2.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{6.5}$ TCID₅₀/0.1ml 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

각각의 바이러스 함량을 조정한 개 파보바이러스 원액 35%, 개 코로나바이러스 원액 35%, 보호제(부기3) 30%를 가하여 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법Ⅳ-1에 의한 검사에 따라 진탕하면 담홍회백 색의 액체로 이물·이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법Ⅳ-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 합습도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법Ⅳ-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법Ⅳ-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 미입바이러스 부정시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품에 개 파보바이러스 및 개 코로나바이러스의 고도면역혈청을 동량 가하여 37°C 내에서 1~2시간 감작하여 중화시킨 것을 시험재료로 한다. 개 파보바이러스 및 개 코로나바이러스의 검사품은 A-72 세포배양 시험관 또는 마이크로플레이트(96well) 10개씩에 각각 0.1ml 씩 접종하고 37°C 배양기 또는 CO₂ 배양기내에서 7일간 배양한다.

4.5.2. 판정

각 배양세포 내에 봉입체를 형성하거나 세포변성효과 또는 적혈구 응집 및 흡착현상을 일으키는 미입 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

4.6. 바이러스 함량시험

4.6.1. 개 파보바이러스

4.6.1.1. 재료 및 시험

검사품을 개 코로나바이러스의 고도면역혈청으로 중화한 후 10배 단계 희석하여 각 희석액을 A-72 세포가 배양된 24 well plate에 각각 접종한 후 37°C에서 7일간 배양하여 적혈구응집상태 또는 세포변성효과를 현미경으로 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

4.6.1.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml(1두분) 이상이어야 한다.

4.6.2. 개 코로나바이러스

4.6.2.1. 재료 및 시험

검사품을 개 파보바이러스 고도면역혈청으로 중화한 후 10배 단계 희석하고 각 희석액을 A-72세포에 각각 접종한 후 37C에서 7일간 배양하여 CPE를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

4.6.2.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml(1두분) 이상이어야 한다.

4.7. 안전시험

4.7.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g 건강한 기니픽 4마리 및 개 파보 및 코로나바이러스 항체음성의 건강한 3개월령 개 6마리를 사용한다. 검사품을 마우스에는 0.5ml을 피하 및 복강 내에 각각 5마리씩 접종하고, 기니픽에는 복강 내에 2ml씩 접종하여 7일간 관찰한다. 개는 각각 2마리에 3두분, 1두분을 근육 내에 접종하고 대조개와 같이 14일간 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 동물은 관찰기간 중 모두 이상 없이 생존하여야 한다.

4.8. 역가시험

4.8.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 1두분 접종개 2마리 및 대조개 2마리를 사용한다. 1두분 접종개는 안전시험이 끝난 날 다시 1두분을 피하에 검사품을 각각 접종하고 2주 후에 채혈한 혼합혈청과 대조개의 혼합혈청을 사용하여 개 파보바이러스는 혈구응집억제항체가 (HI) 또는 중화항체를 측정하고 개 코로나바이러스는 중화시험법 및 FFN 시험법<별첨>으로 중화항체를 측정한다.

4.8.2. 판정

시험개의 개 파보바이러스는 혈구응집억제항체가 또는 중화항체가가 80배이상, 개 코로나바이러스는 중화항체가가 4배이상 이어야 하며 대조개는 개 파보바이러스는 10배 이하, 개 코로나바이러스는 2배 이하의 음성이어야 한다.

5. 저장 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

견갑부 피하 또는 뒷다리부분의 근육 내에 1마리분 1.0ml씩을 접종한다.

모체 이행항체에 따라 접종시기를 달리하나, 일반적으로 생후 4~6주령에 실시하고, 2차 접종은 8~9주령에 실시하며, 그 후 1년마다 보강 접종한다.

1-4-2-03

<별첨> FFN(fluorescence focus neutralization) 시험법

- 1) 검사혈청을 2-fold 희석한 후 CCV(1,000 ffu/well)를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응
- 2) A-72 cell이 배양된 96-well plate에 접종 후 37℃에서 24시간 배양
- 3) 감염 24시간 후에 80% acetone을 사용하여 고정
- 4) TGE-specific 단클론항체를 96-well plate에 넣고 37℃에서 1시간 반응
- 5) PBS로 3회 세척 후 FITC conjugated goat anti mouse IgG(H+L) 첨가
- 6) 37℃에서 1시간 반응
- 7) PBS로 3회 세척 후 glycerol buffer 첨가 후 형광현미경으로 관찰

* 대조군에 비하여 FA 양성세포가 60%까지 감소된 혈청의 희석배수의 역수를 FFN 항체가로 판정

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

L-15 medium	80%
Fetal bovine serum	8%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

부기2. 세포유지용 배지

L-15 medium	80%
Fetal bovine serum	5%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

부기3. LPGG 보호제

Lactose	74.6g
Monopotassium phosphate	0.51g
Dipotassium phosphate	0.85g
Monosodium L-glutamate	10.0g
Gelaten	7.50g
D.W	1,000ml

개 파보바이러스 불활화백신

Canine Parvovirus Vaccine, Inactivated

1. 정의

개 파보바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 감염배양액을 불활화하여 만든 백신이며 개 파보바이러스 감염증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

개 파보바이러스 약독주(C-780916주) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

개 파보바이러스를 CRFK세포(crandel feline kidney cell)에 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하고 37°C에서 4~6일간 배양 후 감염 배양액을 -80°C이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

CRFK(crandel feline kidney cell) 및 A72세포에서 자라고, 돼지혈구에 혈구 응집반응을 일으키며, 기니픽, 마우스에서 병원성이 없으며, 안전성도 뛰어나다. 개 파보바이러스 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

CRFK세포 또는 A72 세포주를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.2.1의 방법에 따른다.

3.2.2. 바이러스 배양

3.2.2의 방법에 따른다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80% 출현하였을 때 배양병을 동결 및 용해과정을 반복 3회 반복시킨 후 3,000rpm으로 15분간 원심분리하여 세포파편들을 제거하고 상층액을 무균적으로 수확한다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 포르말린을 최종농도가 0.2%되게 첨가하여 실온에서 교반하면서 3일간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.3.2에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.3.3에 의한 검사에 따른다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 원심하여 적당량을 투석막에 넣고 4℃에서 시험품 100배량 이상인 인산완충식염액(PBS)에서 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다. CRFK세포 또는 감수성있는 세포를 배양하여 단층을 형성시킨 다음 배양 상층액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

조직배양 세포에서 세포변성효과가 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화된 개 파보바이러스 원액 80%, 수산화알루미늄 겔을 20%정도(최종농도 8mg/ml)되게 첨가하여 완전히 균등액이 되게 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 연한 황적색의 액체이며, 이물 및 이취가 없고 흔들면 쉽게 균등한 현탁액이 되어야 하고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중이 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 4마리, 및 개 파보바이러스 항체 음성의 3개월령의 중화항체 음성 건강한 개 2마리를 사용한다. 검사품을 마우스는 복강에 0.5ml, 기니픽은 근육 내에 2ml를 접종하여 7일간 관찰한다. 개 2마리에는 2부분 근육 내에 접종하고 21일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 모두 이상없이 생존하여야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 300~350g의 건강한 기니픽 7마리를 사용한다. 기니픽 5마리에는 1부분씩 3주 간격으로 2회 근육접종하고, 2마리는 무처치 대조로 하여 2차 접종 1주후 채혈하여 혈구응집억제 항체가를 HI로 측정한다.

4.6.2. 판정

접종군은 HI항체가 160배이상 이어야 하며 대조군은 10배 이하의 음성이어야 한다.

5. 저장 및 유효기간

2~4℃의 냉장소에 보존하며 제조완료일로 부터 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

견갑부 피하 또는 뒷다리부분의 근육 내에 1마리분 1.0ml씩을 접종한다.

모체 이행항체에 따라 접종시기를 달리하나, 일반적으로 생후 4~6주령에 실시하고, 2차 접종은 8~9주령에 실시하며, 그 후 1년마다 보강접종한다.

<부 기>

부기1. TV액(Trypsin-Versene solution)

NaCl	8g
KCl	0.4 g
Dextrose	1 g
NaHCO ₃	0.58 g
Trypsin(1:250)	0.5 g
EDTA	0.2 g
D.W	1000ml

부기2. 세포증식용 배지

α-MEM	82%
Tryptose phosphate broth	10%
Horse serum	5%
Penicillin(200,000IU solution)	1%
Streptomycin 50mg solution	1%
증조 7% 액	1%

부기3. 세포유지용 배지

α-MEM	85%
Tryptose phosphate broth	10%
Horse serum	2%
Penicillin(200000IU solution)	1%
Streptomycin 50mg solution	1%
증조 7%액	1%

개 코로나바이러스 불활화백신

Canine Coronavirus Vaccine, Inactivated

1. 정의

개 코로나 바이러스를 조직배양 세포에 증식시켜 감염배양액을 불활화하여 오일보존제를 가하여 만든 백신이며 개 코로나 바이러스 감염증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

국내에서 분리한 개 코로나 바이러스 D1주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

개 코로나바이러스를 A-72주화세포(canine tumor cell origin, ATCC.CRL-1542)에 접종하여 37℃에서 세포증식용 배지(부기1)에 배양하여 세포의 단층이 약 50% 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 다음 세포유지용 배지(부기2)에 개 코로나 바이러스를 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하여 37℃에서 3~5일간 배양한 후 배양감염액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

개 코로나 바이러스는 개에서만 설사를 일으키며 다른 동물에 영향을 주지 않는다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

A-72 세포주를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

1-4-2-03 개 파보바이러스·개 코로나 바이러스 생 혼합백신의 3.2 원액제조

1-4-2-05

3.2.2.1의 방법에 따른다.

3.2.2. 바이러스 배양

1-4-2-03 개 파보바이러스·개 코로나 바이러스 생 혼합백신의 3.2 원액제조

3.2.2.2의 방법에 따른다.

3.2.3. 바이러스 수확

1-4-2-03 개 파보바이러스·개 코로나 바이러스 생 혼합백신의 3.2 원액제조

3.2.2.3의 방법에 따른다.

3.2.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 formalin을 최종농도가 0.2%되게 첨가하여 37℃에서 3일간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품에 개 코로나 바이러스로 고도 면역된 혈청과 동량혼합하여 감작 중화된 재료를 A-72 세포에 접종한 후 37℃에서 3~5일간 배양한다.

3.3.2.2. 판정

배양세포에서 세포변성효과(CPE) 또는 적혈구 응집현상을 일으키는 미입 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS(부기3)로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72 세포에 접종한 후 37℃에서 3~5일간 배양하며 CPE를 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{6.5}$ TCID₅₀/0.1ml 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 원심하여 적당량을 투석막에 넣고 4℃에서 검사품 100배량 이상의 PBS에서 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다.

A-72세포를 배양하여 단층을 형성시킨 다음 배양 상층액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다

3.3.4.2. 판정

조직배양 세포에서 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화 된 개 코로나 바이러스 원액 75% 오일보존제 25%의 비율로 오일혼합 탱크에서 30분간 유화시킨 후 완전히 균등액이 되게 진탕하면서 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물·이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하이어야 한다.

4.4. 불활화 확인시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 300~350g 건강한 기니픽 4마리 및 개코로나 항체음성의 건강한 3개월령 개 6마리를 사용한다. 검사품을 기니픽의 복강에 2ml씩 접종하여 7일간 관찰하고, 시험개는 각각 2마리에 3두분 및 1두분씩을 근육 내에 접종하고 대조개 2마리와 같이 14일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

모든 동물은 관찰기간 중 모두 이상없이 생존하여야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

1-4-2-05

안전시험이 끝난 1두분 접종개 2마리 및 대조개 2마리와 체중 300~350g 건강한 기니픽 6마리를 사용하여 4마리는 시험군, 2마리는 대조군으로 한다. 안전시험이 끝나는 날 1두분 접종개에 다시 검사품을 1두분씩 근육 내에 접종하고, 2주후에 채혈하여 시험군 개의 혈청과 대조군 개의 혈청을 사용하여 FFN(fluorescence focus neutralization)시험법(부기4)으로 중화항체가를 측정한다.

4.6.2. 판정

1두분 접종군의 개는 중화항체가가 1:4 이상이어야 하며 대조군의 개는 1:2 이하의 음성이어야 한다.

5. 저장 및 유효기간

12개월간 유효한다.

6. 사용방법

견갑부 피하 또는 뒷다리부분의 근육 내에 1마리 분 1.0ml씩을 접종한다.

모체 이행항체에 따라 접종시기를 달리하나, 일반적으로 생후 4~6주령에 실시하고, 2차 접종은 8~9주령에 실시하며, 그 후 1년마다 보강 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

L-15 medium	80%
Fetal bovine serum	8%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

부기2. 세포유지용 배지

L-15 medium	83%
Fetal bovine serum	5%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

부기3. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride	0.2g
Disodium hydrogen orthophosphate(anhydros)	1.15g
Potassium dehydrogen	1,000ml

부기4. FFN(fluorescence focus neutralization)시험법

- 1) 검사혈청을 2-fold 희석한 후 CCV(1,000 ffu/well)를 첨가하여 37℃에서 1시간 반응
 - 2) A-72 cell이 배양된 96-well plate에 접종 후 37℃에서 24시간 배양
 - 3) 감염 24시간 후에 80% acetone을 사용하여 고정
 - 4) TGE-specific 단클론항체를 96-well plate에 넣고 37℃에서 1시간 반응
 - 5) PBS로 3회 세척 후 FITC conjugated goat anti mouse IgG(H+L) 첨가
 - 6) 37℃에서 1시간 반응
 - 7) PBS로 3회 세척 후 glycerol buffer 첨가 후 형광현미경으로 관찰
- * 대조군에 비하여 FA 양성세포가 60%까지 감소된 혈청의 희석배수의 역수를 FFN 항체가로 판정

개 파보바이러스, 코로나바이러스 불활화 혼합백신

Canine Parvovirus·Coronavirus Combined Vaccine, Inactivated

1. 정의

개 파보바이러스와 개 코로나바이러스를 조직배양세포에 증식시켜 감염배양액을 불활화 한 후 혼합하고 유성보존제를 가하여 만든 백신이며 개 파보바이러스 및 개 코로나바이러스 감염증 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

개 파보바이러스 CPV-6주 및 개 코로나바이러스 CCVDI주 또는 국립수의 과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 개 파보바이러스 CPV-6주

개 파보바이러스를 CRFK세포(crandel feline kidney cell)에 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하고 37°C에서 4~6일간 배양한 후 감염 배양액을 -80°C이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.2.2. 개 코로나바이러스 CCV D1주

개 코로나바이러스를 A-72주화세포(canine tumor cell origin, ATCC. CRL-1542)에 접종하여 37°C에서 세포증식용 배지(부기3)에 배양하여 세포의 단층이 약 50% 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거한 다음 세포유지용 배지(부기4)에 개 코로나바이러스를 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하여 37°C에서 3~5일간 배양한 후 배양감염액을 -80°C이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. 개 파보바이러스

CRFK세포에서 자라고, 돼지혈구에 혈구응집반응을 일으키며, 기니픽, 마우스에서 병원성이 없으며, 안전성도 뛰어나다. 개 파보바이러스 발병을 예

방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화된다.

2.3.2. 개 코로나바이러스

코로나 바이러스로서 개에서만 설사를 일으키며 다른 동물에 영향을 주지 않는다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 개 파보바이러스

3.1.1.1. 세포

CRFK세포를 사용한다.

3.1.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)와 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.1.2. 개 코로나바이러스

3.1.2.1. 세포

A-72세포주를 사용한다.

3.1.2.2. 배지

세포증식용 배지(부기3) 및 세포유지용 배지(부기4)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 개 파보바이러스

3.2.1.1. 세포배양

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.2.1의 방법에 따른다.

3.2.1.2. 바이러스 배양

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.2.2의 방법에 따른다.

3.2.1.3. 바이러스 수확

1-4-2-02 개 파보바이러스 생백신의 3.2.3의 방법에 따른다.

3.2.2. 개 코로나 바이러스

3.2.2.1. 세포배양

1-4-2-05 개 코로나바이러스 불활화백신의 3.2.1의 방법에 따른다.

3.2.2.2. 바이러스 배양

1-4-2-05 개 코로나바이러스 불활화백신의 3.2.2의 방법에 따른다.

3.2.2.3. 바이러스 수확

1-4-2-06

1-4-2-05 개 코로나바이러스 불활화백신의 3.2.3의 방법에 따른다.

3.2.3. 불활화

1-4-2-04 개 파보바이러스 불활화백신 및 1-4-2-05 개 코로나바이러스 불활화백신의 3.2.4의 각 방법에 따른다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

1-4-2-03 개 파보바이러스 · 개 코로나 바이러스 생 혼합백신의 3.3.1.2 및 3.3.2.2의 각 방법에 따른다.

3.3.3. 바이러스 함량시험

1-4-2-03 개 파보바이러스 · 개 코로나 바이러스 생 혼합백신의 3.1.3 및 3.3.2.3의 각 방법에 따른다.

3.3.4. 불활화 확인시험

1-4-2-04 개 파보바이러스 불활화백신 및 1-4-2-05 개 코로나바이러스 불활화백신의 3.3.4의 방법에 따른다.

3.4. 최종원액

불활화 된 개 파보바이러스 원액 35%, 개 코로나바이러스 원액 40%, 오일보존제 25%의 비율로 오일혼합 탱크에서 30분간 유화시킨 후 완전히 균등액이 되게 진탕하면서 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따라 연한 분홍색의 액체이며, 이물 및 이취가 없고 흔들면 쉽게 균등한 현탁액이 되어야 하고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하, 치메로살 함유량은 0.01%이하이어야 한다.

4.4. 불활화 확인시험

4.4.1. 시험 및 재료

검사품을 원심하여 적당량을 투석마게 넣고 4℃에서 검사품 100배량 이상의 인산완충용액(PBS)에서 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 하여 단층을 형성시킨 다음 배양 상층액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩을 10개 이상에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

4.4.2. 판정

조직배양 세포에서 CPE가 인정되어서는 아니된다.

4.5. 안전시험

4.5.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~500g의 건강한 기니픽 4마리, 3개월령의 중화항체 음성 건강한 개 6마리를 사용한다. 마우스는 복강에 0.5ml, 기니픽은 근육 내에 2ml를 접종하여 7일간 관찰한다. 개 2마리에는 3두분, 개 2마리에는 1두분을 각각 접종하고 2마리는 대조로하여 21일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 모두 이상없이 생존하여야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 동물 및 시험

체중 300~350g의 건강한 기니픽 7마리와 안전시험이 끝난 1두분 접종 개 2마리 및 대조 개 2마리를 사용한다.

개 파보바이러스는 기니픽 5마리에 1두분씩 3주 간격으로 2회 근육접종하고, 2마리는 무처리 대조로 하여 2차 접종 1주후 채혈하여 혈구응집억제 항체가(HI)로 측정한다.

개 코로나바이러스는 안전시험이 끝나는 날 1두분 접종개에 다시 1두분을 피하에 접종하고 2주 후에 채혈한 혼합혈청과 혼합대조 혈청을 사용하여 NPLA(neutralizing peroxidase-linked assay, NPLA)시험법<별첨>으로 중화항체가를 측정한다.

1-4-2-06

4.6.2. 판정

개 파보바이러스는 접종균은 HI항체가 160배(기하평균) 이상이어야 하며 대조균은 10배 이상 이하의 음성이어야 한다.

개 코로나바이러스는 1두분 접종개는 NPLA항체가 4배 이상이어야 하며 대조개는 음성이어야 한다.

5. 저장 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

생후 4주 및 7주에 견갑부 피하에 1.0ml를 접종한다.

생후 4주 및 7주 기초 면역된 개는 매년 1회씩 보강 접종한다.

<별첨> NPLA(neutralizing peroxidase-linked assay)법

- 1) Microplate에 가검혈청을 2진법으로 희석하여 well당 50 μ l가 되도록 한다.
- 2) 개 코로나바이러스를 0.1ml당 200TCID₅₀되게하여 well당 50 μ l씩 넣는다.
- 3) 진탕기에 20초간 혼합하여 37 $^{\circ}$ C, 1시간 감작한다.
- 4) A-72세포(약 20만개/ml)를 100 μ l/well씩 넣고 3일간 37 $^{\circ}$ C(5% CO₂)에 배양한다.
- 5) 배양상층액을 버리고 PBS로 1회 세척한 후 microplate를 완전히 건조시킨다.
- 6) 80% cold acetone를 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 고정한다.
- 7) 고정액을 완전히 버리고 PBS로 1회 세척한다.
- 8) TGE 단크론성 항체 또는 CCV 단크론성 항체(CCDV와 교차 반응성포함)로 PBS(2% 말혈청 함유)로 적당량 희석한 후 50 μ l/well씩 부어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
- 9) PBS로 3~4회 세척한다.
- 10) Biotinylated Anti-mouse IgG용액 (kit solution)을 50 μ l/well씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 40~60분간 반응시킨다.

<Biotinylated Anti-mouse IgG용액 제조법>

PBS	9.9ml
말혈청	0.1ml
biotinylated anti-mouse IgG	1 drop

- 11) 동시에 다음 단계의 시약을 제조하여 실시한다.

<AB Solution 제조법>

PBS-T (0.05% tween20)	10ml
A solution (avidin DH)	2 drop
B solution (biotinylated HRP)	2 drop

- 12) PBS로 2회 세척한다.
- 13) AB solution을 100 μ l/well씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 40~60분간 반응시킨다.
- 14) PBS-T로 3회 세척한 후, 1회 PBS로 세척한다.
- 15) 물기를 완전히 제거한다.
- 16) Substrate DAB(10 \times ,60mg DAB/9ml DW)을 50 μ l/well씩 넣는다.

1-4-2-06

<Working solution(1X)>

PBS 9ml
30% H₂O₂ 10 μ l
DAB solution(10X)
1ml

- 17) 증류수로 세척한 후 대조군에 비하여 염색된 세포가 60%까지 감소된 혈청희석배수의 역수를 NPLA 항체가로 판정한다.

<부 기>

부기1. CRFK 세포증식용 배지

Eagle's MEM medium	80%
Fetal bovine serum	8%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

부기2. CRFK 세포유지용 배지

Eagle's MEM medium	80%
Fetal bovine serum	5%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

부기3. 세포증식용 배지

L-15 medium	80%
Fetal bovine serum	8%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

부기4. 세포유지용 배지

L-15 medium	80%
Fetal bovine serum	5%
Tryptose phosphate broth	10%
Streptomycin(10mg/ml)	1%
Penicillin(10000IU/ml)	1%

1-4-2-06

부기 5. FFN 시험법(florescence focus neutralization)

- 1) 검사혈청을 2-fold 희석한 후 CCV(1,000 ffu/well)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응
 - 2) A-72 cell이 배양된 96-well plate에 접종 후 37°C에서 24시간 배양
 - 3) 감염 24시간 후에 80% acetone을 사용하여 고정
 - 4) TGE-specific 단클론항체 또는 CCV 특이 단클론항체(CCV와 교차반응성 포함)를 96-well plate에 넣고 37°C에서 1시간 반응
 - 5) PBS로 3회 세척 후 FITC conjugated goat anti-mouse IgG(H+L) 첨가
 - 6) 37°C에서 1시간 반응
 - 7) PBS로 3회 세척 후 glycerol buffer 첨가 후 형광현미경으로 관찰
- * 대조군에 비하여 FA 양성세포가 60%까지 감소된 혈청의 희석배수의 역수를 FFN 항체가로 판정

개 디스토펜퍼, 전염성 간염, 파보바이러스, 파라인플루엔자(생)/코로나 바이러스 불활화 혼합백신

Canine Distemper, Hepatitis, Parvovirus, Parainfluenza,
Live/Coronavirus, Inactivated Combined Vaccine

1. 정의

조직배양순화 개 디스토펜퍼 바이러스 (canine distemper virus, CDV), 개 전염성 간염 바이러스(infectious canine hepatitis virus, ICHV), 개 파보바이러스(danine parvovirus, CPV), 개 파라인플루엔자 바이러스 (canine parainfluenza virus, CPIV)를 각각 조직배양세포에 증식시켜 감염배양액을 혼합한 후 보호제를 가하여 동결건조한 백신과 개 코로나 바이러스(canine corona virus)를 조직배양 세포에 증식시켜 감염배양액을 불활화하여 만든 백신이며 CDV, ICHV, CPV, CPIV 및 CCV의 감염증의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

CDV는 계태아 배양세포에 순화된 Rockborn주, ICHV는 돼지 신장조직배양세포에 순화된 CAV-2주, CPV는 C-780916주, CPIV는 D008주주 및 CCV는 K-378주, 또는 국립수의과학검역원에서 이들과 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 개 디스토펜퍼 바이러스(CDV)

특정병원체 부재(specific pathogen free, SPF) 10일령 발육계란의 계태아 섬유아세포에 바이러스를 접종하여 37℃에서 5~6일간 배양한 후 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 개 전염성간염 바이러스(ICHV)

돼지 신장조직배양세포에 바이러스를 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후 ICHV에 의한 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰, 확인하고 CPE가 약 80%이상 출현하였을 때 바이러스 감염배양액을 채취하여 -8

0℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.3. 개 파보바이러스(CPV)

개의 종양세포인 A-72(Canine tumor cell origin, ATCC. CRL-1542) 배양세포의 단층이 50% 형성되었을 때 바이러스를 접종하여 37℃에서 4~6일간 배양한 후 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.4. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

Vero(African green monkey kidney cell line) 배양세포의 단층이 50% 형성되었을 때 바이러스를 접종하여 37℃에서 5~6일간 배양한 후 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.5. 개 코로나 바이러스(CCV)

개의 종양세포인 A-72 배양세포의 단층이 50% 형성되었을 때 바이러스를 접종하여 37℃에서 3~5일간 배양한 후 바이러스 감염 배양액을 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

2.3.1. 개 디스토펜 바이러스

10일령 SPF발육계란의 계태아 섬유아세포에서 증식하며 7일령 발육계란의 장노막상에 접종하면 비만성 부종을 동반하는 병변(Pock)이 형성된다. CDV발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.2. 개 전염성간염 바이러스

돼지 신장조직배양세포에서 ICHV 특유의 CPE가 일어나며 ICHV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.3. 개 파보바이러스

A-72 세포에서 증식이 잘되며 CPV 특유의 CPE가 일어나며 돼지 적혈구에 의한 혈구응집능이 인정된다. CPV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고, 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.4. 개 파라인플루엔자 바이러스

A-72 세포 및 Vero 배양세포에 증식이 잘되며 혈구흡착시험에서 기니픽

적혈구를 흡착한다. CPI 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.5. 개 코로나 바이러스

A-72 세포에서 잘 자라며, 돼지혈구에 혈구응집반응을 일으키며, CCV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되며 배양세포에서의 바이러스의 증식성은 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

3.1.1.1. 개 디스토펜퍼 바이러스

SPF 10일령 발육계란의 계태아 섬유아세포를 사용한다.

3.1.1.2. 개 전염성간염 바이러스

돼지(신생자돈) 신장조직 배양세포를 사용한다.

3.1.1.3. 개 파보 바이러스

A-72(canine tumor cell origin)세포를 사용한다.

3.1.1.4. 개 파라인플루엔자 바이러스

A-72(canine tumor cell origin)세포 또는 Vero세포를 사용한다.

3.1.1.5. 개 코로나 바이러스

A-72(canine tumor cell origin)세포 또는 자견신장세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

제조용 배지는 세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 개 디스토펜퍼 바이러스(CDV)

3.2.1.1. 세포배양

A-72세포(또는 계태아 섬유아세포)를 증식용배지(부기1)에 부유시켜 배양 병에 분주한 다음 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.1.2. 바이러스배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 증식용 배지를 제거하고 CDV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 함유된 세포유지용 배지(부기2)로 교환하여 주고 37℃에서

1-4-2-07

5~6일간 회전배양한다.

3.2.1.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.2. 개 전염성 간염 바이러스(ICHV)

3.2.2.1. 세포배양

A-72세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37°C에서 2~3일간 배양한다.

3.2.2.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 증식용배지를 제거하고 ICHV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀의 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37°C에서 5~6일간 회전 배양한다.

3.2.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.3. 개 파보바이러스(CPV)

3.2.3.1. 세포배양

A-72세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37°C에서 2~3일간 배양한다.

3.2.3.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 세포 증식용배지를 제거하고 CPV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀의 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37°C에서 4~6일간 회전배양한다.

3.2.3.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.4. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

3.2.4.1. 세포배양

A-72세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37°C에서

2~3일간 배양한다.

3.2.4.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 CPIV의 함량이 ml당 $10^{3.0}$ TCID₅₀의 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 5~6일간 회전배양한다.

3.2.4.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.5. 개 코로나 바이러스(CCV)

3.2.5.1. 세포배양

A-72세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37℃에서 3~4일간 배양한다.

3.2.5.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 CCV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 3~5일간 회전배양한다.

3.2.5.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다.

3.2.5.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 BPL(β -propiolactone)을 10배 희석하여 최종농도가 0.2% 되게 가하여 하룻밤동안 불활화시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미립바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품에 동량의 5가지 바이러스(CDV, ICHV, CPV, CPIV, CCV)의 고도 면역혈청을 가하여 37℃에서 2시간 (또는 4℃에서 18~24시간) 감작한 검사품을 CDV, ICH바이러스, 및 불활화 전 CCV 바이러스는 개 신장 배양세포 시험관에, CPV 및 CCV는 A-72세포배양 시험관 10개에 각각 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 3~7일간 배양한다.

3.3.2.2. 판정

접종액에 의한 봉입체의 형성, CPE 또는 적혈구응집 및 흡착(HA, HAD) 현상을 일으키는 미입 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량 시험

3.3.3.1. 개 디스토펜 바이러스(CDV)

3.3.3.1.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72 세포가 배양된 plate에 접종하고 37°C에서 7일간 배양하여 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.1.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.3.2. 개 전염성 간염바이러스(ICHV)

3.3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72세포또는 개 신장조직 배양세포(돼지 신장배양세포)에 배양된 plate에 접종하고 37°C에서 7일간 배양하여 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.2.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.3.3. 개 파보바이러스(CPV)

3.3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72세포가 배양된 시험관 또는 96well plate에 접종한 후 37°C에서 7일간 배양하여 적혈구 응집상태 또는 CPE를 현미경으로 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.3.4. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

3.3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72세포 또는 Vero 세포가 배양된 시험관 또는 96well plate에 접종한 후 37°C에서 7

일간 배양하여 기니피 혈구 흡착시험(HAD)또는 CPE를 현미경으로 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.4.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.3.5. 개 코로나 바이러스(CCV)

3.3.3.5.1. 재료 및 시험

불활화전 검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72세포가 접종한 후 37℃에서 3~5일간 배양하여 적혈구 응집 상태 또는 CPE를 현미경으로 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.5.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{6.5}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

적당량의 개 코로나 바이러스 불활화용액을 원심분리한 다음 상층액을 투석막에 넣고 4℃에서 300ml 이상의 PBS에서 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다. 단층이 형성된 A-72 배양세포 또는 개 코로나 바이러스에 감수성이 있는 세포에 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상의 96well plate 또는 배양 시험관에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

조직배양 세포에서 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. CDV, ICHV, CPV 및 CPIV

마리당 CDV는 $10^{3.5}$ EID₅₀이상, ICHV는 $10^{3.0}$ TCID₅₀이상, CPV는 $10^{5.0}$ TCID₅₀이상, CPIV는 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 이상이 함유되도록 각각 조절한 후 혼합하고 보호제(부기3)를 가하여 유제액을 만들고 120mesh 동망으로 여과한 후 항생물질 (penicillin G-Na 200unit/ml, streptomycin 100mg/ml)을 가하고 잘 혼합한다.

3.4.2. CCV

불활화된 CCV원액과 수산화알루미늄겔을 10% 가하여 유제한 다음 동망으로 여과한 후 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

1-4-2-07

3.5.1. CDV, ICHV, CPV 및 CPIV

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결건조 후 봉전한다.

3.5.2. CCV

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 DHPP 백신은 미색의 건조괴이며, 개 코로나 바이러스 불활화 백신은 연홍색의 액체로서 DHPP 백신을 용해하면 쉽게 균등한 연분홍색의 현탁액이 되며, 굵은입자, 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 방부제 정량시험

개 코로나 바이러스 정량시험은 동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하이어야 한다.

4.6. 불활화 확인시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다..

4.7. 미입바이러스 부정시험

4.7.1. 재료 및 시험

검사품에 동량의 4가지 바이러스(CDV, ICHV, CPV 및 CPIV)의 고도 면역혈청을 가하여 37℃에서 2시간 (또는 4℃에 18~24시간) 감작하여 중화시킨 혼합액을 검사품으로 한다. 개 디스토펜 바이러스, 전염성간염 바이러스 및 개 파라인플루엔자 바이러스의 검사품은 개 신장조직배양세포 시험관에, 개 파보바이러스의 검사품은 고양이 신장조직세포 배양 시험관 10개에 각각 0.1 ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양하여 세포의 변화를 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험관이 접종액에 의한 봉입체의 형성, CPE 또는 적혈구 응집현상을 일으키는 미입바이러스가 인정되어서는 아니된다.

4.8. 바이러스 함량시험

4.8.1. 개 디스토펙퍼 바이러스

4.8.1.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 10배 단계 희석하여 Vero세포 또는 개 디스토펙퍼 바이러스에 감수성이 있는 세포가 배양된 플레이트의 구멍에 희석단계별로 0.1ml씩 접종한 후 37°C에서 7일간 배양 관찰하고 CPE가 세포변성효과를 산출한다.

4.8.1.2. 판정

바이러스 함량은 1두분 당 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.8.1.2. 형광항체 검사법

4.8.1.2.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 10배 단계 희석하여 각 희석 바이러스액을 플레이트에 증식시킨 Vero세포 또는 개 디스토펙퍼 바이러스에 감수성이 있는 세포에 0.1ml씩 접종하고 37°C에서 4일간 배양한다. 접종 4일 후 배양 상층액을 버리고 80% Cold Acetone을 첨가하여 -20°C에서 10분간 세포를 고정시킨다. 고정된 세포를 PBS(부기4)로 두 번 세척하고 37°C에서 20분간 건조한 후 플레이트 한 구멍당 개 디스토펙퍼 바이러스에 반응하는 특이항체 0.1ml씩을 분주한다. 플레이트를 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 PBS(부기4)로 세척하고, FITC conjugate를 첨가한 후 다시 37°C에서 1시간 반응시킨다. 플레이트를 PBS로 세척한 후 형광현미경으로 특이 형광을 관찰한다.

4.8.1.2.2. 판정

바이러스 함량은 1두분 당 $10^{3.5}$ FAID₅₀ 이상이어야 한다.

4.8.2. 개 전염성간염 바이러스

4.8.2.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml씩을 플레이트에 접종하고 개 신장세포 또는 개 전염성간염 바이러스에

감수성이 있는 세포 배양액 0.1ml를 가하여 37℃에서 7일간 배양 관찰하고 세포 변성효과를 산출한다.

4.8.2.2. 판정

바이러스 함량은 1두분당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.8.3. 개 파보바이러스

개 파보바이러스의 함량시험은 조직배양법, 형광항체검사법 중 한 가지 방법을 선택하여 실시한다.

4.8.3.1. 조직배양법

4.8.3.1.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 10배 단계 희석하여 각 희석 단계별 희석액 0.1ml를 plate에 증식시킨 고양이 신장세포 또는 개 파보바이러스에 감수성이 있는 세포에 접종한다. 검사품이 접종된 plate를 7일간 배양하여 적혈구 응집상태 또는 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

4.8.3.1.2. 판정

바이러스 함량은 1두분당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.8.3.2. 형광항체법(fluorescent antibody assay)

4.8.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 10배 단계 희석하여 각 희석 바이러스액을 플레이트에 증식시킨 고양이 신장세포 또는 개 파보바이러스에 감수성이 있는 세포에 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 4일간 배양한다. 접종 4일 후 배양 상층액을 버리고 80% cold acetone을 첨가하여 -20℃에서 10분간 세포를 고정시킨다. 고정된 세포를 PBS(부기4)로 두 번 세척하고 37℃에서 20분간 건조한 후 plate 한 구멍당 개 파보바이러스에 대한 특이항체 0.1ml씩을 분주한다. plate를 37℃에서 1시간 동안 반응시킨다. plate를 PBS로 세척한 후 Anti-mouse IgG FITC conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응 후 PBS로 3회 세척하고 형광현미경으로 개 파보바이러스에 반응한 특이 형광을 관찰한다.

4.8.3.2.2. 판정

바이러스 함량은 1두분 당 $10^{5.0}$ FAID₅₀ 이상이어야 한다.

4.8.4. 개 파라인플루엔자 바이러스

4.8.4.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10^{-1} 부터 10^{-6} 까지 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 10개의 Vero세포 또는 개 파라인플루엔자 바이러스에 감수성이 있는 세포에 접종하여 37°C에서 7일간 배양시킨다. 이때 기니픽 혈구 흡착시험(HAD) 또는 CPE를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

4.8.4.2. 판정

바이러스 함량은 1두분 당 $10^{4.0}$ HAD₅₀ 또는 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.9. 안전시험

4.9.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~500g의 건강한 기니픽 4마리 및 각 바이러스에 대한 중화항체 음성(10배 이하)의 3개월 령의 건강한 개 6마리를 사용하며 검사품을 마우스 5마리는 0.03ml씩 뇌 내에 접종하고, 5마리에는 0.5ml씩 복강에 접종하고, 기니픽 4마리에는 2.0ml씩을 복강에 접종하여 7일간 관찰한다. 그리고 검사품을 개 2마리에는 3마리분을, 2마리는 1마리분을 각각 피하에 접종하고 2마리는 무 처치 대조로 하여 14일간 관찰한다.

4.9.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 모두 이상 없이 생존하여야 한다.

4.10. 역가시험

4.10.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 1두분 접종개 2마리와 대조개 2마리를 사용한다. 1두분 접종개는 안전시험이 끝나는 날 다시 1두분을 피하에 접종하고 2주 후에 채혈한 혈청을 사용하여 중화항체가, 혈구응집억제가(HI) 및 혈구흡착억제가(HAID)를 측정한다.

4.10.2. 판정

개 디스토펜퍼 및 개 전염성간염 바이러스 1:120배 이상, 개 코로나 바이러스 1:4배 이상의 중화항체가(부기5)를 각각 나타내야 하며, 개 파보바이러스는 1:80배 이상의 혈구응집억제가, 개 파라인플루엔자는 1:80배 이상의 혈구흡착억제가 또는 중화항체를 나타내야 한다. 무처치 대조군은 각 바이러스에 대해 항체가가 1:2이하의 음성이어야 한다.

1-4-2-07

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

DHPP동결건조 백신과 개 코로나 바이러스 불활화백신을 무균적으로 잘 혼합하여 견갑부 피하에 1마리 당 1.0ml를 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM 또는 alpha MEM	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
L-glutamine	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM 또는 alpha MEM	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
L-glutamine	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. 보호제 LPGG(lactose, phosphate, glutamate, gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

1-4-2-07

부기4. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml

개 디스토펙퍼, 전염성간염, 파보바이러스, 파라인플루엔자(생)/렙토스피라 불활화 복합백신

Canine Distemper, Hepatitis, Parvovirus, Parainfluenza, Live/Leptospira,
Inactivated Compounded Vaccine

1. 정의

조직배양순화 개 디스토펙퍼 바이러스(canine distemper virus, CDV), 개 전염성 간염 바이러스(infectious canine hepatitis virus, ICHV), 개 파보바이러스(canine parvovirus, CPV) 및 개 파라인플루엔자 바이러스 (canine parainfluenza virus, CPIV)를 각각 조직배양 세포에 증식시켜 감염배양액을 혼합한 후 보호제를 가하여 동결건조한 백신과 *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*를 순수배양하여 얻은 균액을 불활화하여 만든 백신이며 CDV, ICHV, CPV, CPIV 및 렙토스피라증의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스 및 균

2.1. 바이러스주 및 균주

CDV는 계태아 배양세포에 순화된 CDV-C13주, ICHV는 돼지 신장조직배양세포에 순화된 CAV-2주, CPV는 C-780916주, CPIV는 D008주이며, *Leptospira*는 *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* 균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주 및 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 개 디스토펙퍼 바이러스(CDV)

특정병원체 부재(specific pathogen free, SPF) 10일령 발육계란의 계태아 섬유아세포에 증독바이러스를 접종하여 37℃에서 5~6일간 배양한 후 바이러스 감염 배양액을 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 개 전염성간염 바이러스(ICHV)

돼지 신장조직배양세포에 증독바이러스를 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후 ICHV에 의한 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)를 관찰, 확인하고 약 80%이상 일어났을 때 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이

하에 보존한다.

2.2.3. 개 파보바이러스(CPV)

개의 종양세포인 A/72(canine tumor cell origin) 배양세포의 단층이 50%형성되었을 때 종독바이러스를 접종하여 37℃에서 4~6일간 배양한 후 바이러스 감염 배양액을 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.4. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

Vero(African green monkey kidney cell line) 배양세포의 단층이 50% 형성되었을 때 종독바이러스를 접종하여 37℃에서 5~6일간 배양한 후 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.5. 렘토스피라(*Leptospira*)

L. canicola 및 *L. icterohaemorrhagiae* 균주를 Ellinghausen's semisolid oleic albumin 배지(부기3)에 각각 접종하여 30℃에서 1~2주간 배양하면서 *Leptospira* 균 활성을 확인한 후 각각 채균하여 28℃ 항온기에 보존하며 4주 간격으로 계대 배양하고 6개월에 1회씩 실험동물에 통과시켜 균 활력을 유지시킨다.

2.3. 성상 및 독력

2.3.1. 개 디스토펜 바이러스

10일령 SPF발육계란의 계태아 섬유아세포에서 증식하며 7일령 발육계란의 장노막상에 접종하면 비만성 부종을 동반하는 병변(pock)이 형성된다. CDV발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 계태아 섬유아 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 이상이다.

2.3.2. 개 전염성간염 바이러스

돼지 신장조직배양세포에서 ICHV 특유의 세포변성효과(CPE)가 일어나며 ICHV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 이상이다.

2.3.3. 개 파보바이러스

A-72 배양세포에서 증식이 잘되며 CPV 특유의 CPE가 일어나며 돼지 적혈구에 의한 혈구응집능이 인정된다. CPV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고, 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 이상이다.

2.3.4. 개 파라인플루엔자 바이러스

Vero배양세포에 증식이 잘되며 혈구흡착시험에서 기니픽 절혈구를 흡착한다. CPV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.5. 렙토스피라(*L. canicola* 및 *L. icterohaemorrhagiae*)

암시야 장치 현미경으로 균을 검사하면 나선형이며 균체의 양끝은 갈고리 모양으로 구부러져 있거나 회전, 사행운동을 한다. 생후 1~4년된 개에 감염발병이 쉬우며 뇨에서 균이 검출, 배양된다. 56℃에서 20분 안에 사멸되며 동물체 밖에서는 오래 생존하지 못한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

3.1.1. 세포

3.1.1.1. 개 디스토펜퍼 바이러스

SPF 10일령 발육계란의 계태아 섬유아세포를 사용한다.

3.1.1.2. 개 전염성간염 바이러스

돼지(신생자돈)신장조직배양세포를 사용한다.

3.1.1.3. 개 파보 바이러스

A-72(canine tumor cell origin)배양세포를 사용한다.

3.1.1.4. 개 파라인플루엔자 바이러스

Vero(African green monkey kidney cell line)배양세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

3.1.2.1. 개 디스토펜퍼 바이러스, 3.1.2.2. 개 전염성간염 바이러스, 3.1.2.3 개 파보 바이러스 및 3.1.2.4 개 파라인플루엔자 바이러스의 배지는 세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.1.2.5 개 렙토스피라균

Ellinghausn's semisolid oleic albumin medium(부기3) 및 *Leptospira* medium(부기4)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 개 디스토펜퍼 바이러스(CDV)

3.2.1.1. 세포배양

A-72세포(또는 계태아 섬유아세포)를 증식용배지(부기1)에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.1.2. 바이러스배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 증식용배지를 제거하고 CDV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 함유된 세포유지용 배지(부기2)로 교환하여 주고 37℃에서 5~6일간 회전배양한다.

3.2.1.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.2. 개 전염성 간염 바이러스(ICHV)

3.2.2.1. 세포배양

A-72세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.2.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 증식용배지를 제거하고 ICHV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 5~6일간 회전 배양한다.

3.2.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.3. 개 파보바이러스(CPV)

3.2.3.1. 세포배양

A-72세포를 37℃에서 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.3.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 CPV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀의 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 4~6일간 회전 배양한다.

3.2.3.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확

한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.4. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

3.2.4.1. 세포배양

A-72세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 후 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.4.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 CPIV의 함량이 ml당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 5~6일간 회전배양한다.

3.2.4.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 배양액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.5. 렙토스피라

3.2.5.1. 종균배양

L. canicola 및 *L. icterohaemorrhagiae* 균주를 10% 토끼혈청을 첨가한 Fletcher medium(부기4)에 종균을 각각 접종하여 30℃에서 1~2주간 배양한다.

3.2.5.2. 본 배양

Leptospira basal medium에 Leptospira enrichment EMJH 100ml를 첨가하여 배양된 종균을 5/100가량 접종한 후 30℃에서 4~5일간 계대배양하여 배양한 균액을 종균으로 사용하여 Leptospira medium(부기5-가)에 여과 멸균된 BSA용액(부기5-나)이 첨가된 배양액에 종균을 접종한 후 30℃에서 4~5일간 배양한다.

3.2.5.3. 집균

렙토스피라는 종균을 접종한 후 균 발육상태 및 잡균오염을 매일 암시아 현미경으로 관찰하면서 ml당 균수가 40억개를 얻었을 때 배양액의 일부를 공정검사용으로 채취하고 나머지 배양액은 채균한다.

3.2.5.4. 항원농도조절

집균한 균액을 농축기(Amicon M60, 0.22 μ l)를 이용하여 약 10배량으로 농축한다.

3.2.5.5. 불활화

집균된 배양액은 항원농도를 조절한 후 포르말린을 최종농도가 0.2%되게

첨가하고 실온에서 교반하면서 3일간 불활화시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품에 동량의 4가지 바이러스의 고도면역혈청을 가하여 37℃에서 2시간(또는 4℃에 18~24시간) 감작하여 중화시킨 혼합액을 검사품으로 한다. 개 디스토펜 바이러스, 전염성간염 바이러스 및 파라인플루엔자 바이러스의 검사품은 개 신장 조직배양세포 시험관에, 개 파보바이러스의 검사품은 고양이 신장세포배양 시험관 10개에 각각 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양하여 세포의 변화를 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

모든 시험관이 접종액에 의한 봉입체의 형성, CPE 또는 적혈구 응집현상을 일으키는 미입바이러스가 인정되어서는 안된다.

3.3.3. 바이러스 함량 시험

3.3.3.1. 개 디스토펜 바이러스

3.3.3.1.1. 조직 배양법

3.3.3.1.1.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10배 단계 희석하여 각 희석 바이러스액을 계태아 섬유아세포가 배양된 plate에 접종한 후 37℃에서 배양하여 세포변성효과를 관찰하고 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.1.1.2. 판정

바이러스함량은 마리당 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.3.1.2. 형광항체법(fluorescent antibody assay)

3.3.3.1.2.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10배 단계 희석하여 각 희석 바이러스액을 plate에 증식시킨 고양이 신장유래세포에 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 4일간 배양한다. 4일 후 상층액을 제거하고 80% cold acetone으로 세포를 고정한다. PBS로 두 번 세척하고 37℃에서 20분간 건조 후 plate 한 구멍마다 개 디스

템퍼 바이러스에 대한 특이항체 0.1ml씩을 분주한다. plate를 37℃에서 1시간 동안 반응시킨다. plate를 PBS로 세척한 후 anti-mouse IgG FITC conjugate를 넣고 37℃에서 1시간 반응 후 PBS로 3회 세척하고 형광 현미경으로 특이형광을 관찰한다.

3.3.3.1.2.2. 판정

바이러스 함량은 마리 당 $10^{3.5}$ FAID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.3.2. 개 전염성간염 바이러스

3.3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml씩 4개의 신장세포 배양시험관 또는 96well microplate에 접종하고 세포배양액 0.9ml 또는 0.1ml를 가하여 37℃에서 7일간 배양하여 세포변성효과를 관찰하고 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.2.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다

3.3.3.3. 개 파보바이러스

3.3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 10개의 고양이 유래세포 또는 고양이 신장세포 또는 A-72세포가 배양된 시험관 또는 96well plate에 접종한 후 37℃에서 7일간 배양하여 적혈구 응집상태 또는 CPE를 현미경으로 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.3.4. 개 파라인플루엔자 바이러스

3.3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 세포배양액으로 10배 단계 희석하여 $10^{6.0}$ 까지 희석하고 각 희석액 0.1ml를 10개의 개 신장유래세포 또는 Vero세포에 접종하여 37℃에서 7일간 배양시킨다. 이 때 기니픽 혈구 흡착시험(HAD)또는 CPE를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.4.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.4. 순수시험

렙토스피라 균액은 동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 따른다.

3.3.5. 불활화 확인시험

렙토스피라 선택배지(부기4)에서 14일간 배양하여 균 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. DHPP 바이러스

각각의 원액 검사에서 바이러스 함량을 마리당 CDV 함량은 $10^{3.5}$ TCID₅₀이상, ICH함량은 $10^{3.0}$ TCID₅₀이상, CPV함량은 $10^{5.0}$ TCID₅₀이상, CPIV함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀이상이 함유되도록 조절한 후 혼합하고 보호제(부기6)를 가하여 유제액을 만들고 120mesh 동망으로 여과한 후 항생물질 (penicillin G-Na 200unit/ml, streptomycin 100mg/ml)을 가하고 잘 혼합한다.

3.4.2. 렙토스피라

배양액을 농축한 다음 10% thimerosal를 1:10,000이 되도록 첨가하여 농축된 Leptospira 배양 원액을 ml당 균수가 각각 10억개 되도록 조정한 후 PBS (부기7)를 가하여 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

3.5.1. DHPP 바이러스

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결건조 후 봉전한다.

3.5.2. 렙토스피라

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따른다

4.2. 진공도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 합습도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하이어야 한다.

4.6. 불활화 확인시험

랩토스피라 선택배지에서 14일간 배양하여 균 발육이 인정되어서는 아니된다.

4.7. 미입바이러스 부정시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.8. 바이러스 함량시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.9. 안전시험

4.9.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~500g의 건강한 기니픽 4마리 및 각 바이러스에 대한 중화항체 음성(10배 이하)의 3개월령의 건강한 개 6마리를 사용하며 마우스 5마리는 0.03ml씩 뇌내에 접종하고, 5마리에는 0.5ml씩 복강에 접종하고, 기니픽 4마리에는 2.0ml씩을 복강에 접종하여 7일간 관찰한다. 그리고 검사품을 개 2마리에는 3마리분을, 2마리는 1마리분을 각각 피하에 접종하고 2마리는 무처치 대조로 하여 14일간 관찰한다.

4.9.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 이상 없이 생존하여야 한다.

4.10. 역가시험

4.10.1. CDV, ICHV, CPV 및 CPIV

4.10.1.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 1두분 접종개 2마리와 대조조건 2마리를 사용한다. 1두분 접종개는 안전시험이 끝나는 날 다시 1두분을 피하에 접종하고 2주 후에 채혈한 혼합 혈청과 대조혈청을 사용하여 중화항체를 측정한다.

4.10.1.2. 판정

1두분 접종개의 중화항체는 디스토펜 및 전염성간염 바이러스 1:120배 이상, 개 파보바이러스 1:80배 이상의 혈구응집억제가 또는 중화항체가, 개 파라인플루엔자는 1:80배 이상의 중화항체를 나타내야 한다.

1-4-4-08

4.10.2. 렙토스피라(Leptospira spp.)

4.10.2.1. 동물 및 시험

체중 약 300~400g의 건강한 기니픽 10마리 또는 6개월령 미만의 렙토스피라 항체음성인 개 3마리를 사용한다. 기니픽 10마리 또는 개 3마리에 백신 규정량을 14일 간격으로 2회 피하 접종한다. 2차 접종 14일 후에 채혈하여 각 혈청형별 항체가를 측정한다. 렙토스피라 항원은 배지(부기3)에 4~7일간 배양하여 1ml당 약 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 균수로 사용한다.

4.10.2.2. 판정

각각의 혈청형에 대한 항체가는 기니픽에서 80% 이상이 10배 이상의 응집가를 나타내어야 하며, 개의 경우는 모두 10배 이상의 응집가를 나타내어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

DHPP동결건조 백신과 렙토스피라 불활화 백신을 무균적으로 잘 혼합하여 개의 견갑부 피하에 1마리 당 1.0ml를 접종한다.

<부 기>**부기1. 세포증식용 배지**

Eagle's 또는 alpha MEM	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
L-glutamine	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM 또는 alpha MEM	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
L-glutamine	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. Ellinghausen's semisolid oleic albumin medium**가. 저장용액**

1) 25배 인산염완충식염수

Na ₂ HPO ₄	16.6g
KH ₂ PO ₄	2.172g
D.W	1,000ml

2) 20배 식염액

NaCl	38.5g
------------	-------

1-4-4-08

NH ₄ Cl	5.35g
NaCl ₂ · 6H ₂ O	3.81g
D.W	1,000ml
3) Cu ⁺⁺ 용액	
CuSO ₄	30mg
D.W	100ml
4) Zn ⁺⁺ 용액	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	80mg
D.W	200ml
5) Fe ⁺⁺ 용액	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	80mg
D.W	200ml
6) 비타민 B ₁₂ 농축 저장액	
Vitamin B ₁₂	10mg
D.W	100ml
7) 비타민 B ₁₂ 농축 저장액	
농축저장액	10mg
D.W	90ml
8) 디아민 HCl B ₁ 용액	
디아민 HCl B ₁₂	200mg
D.W	100ml
9) 1% tween 80 용액	
tween 80	10ml
D.W	1,000ml
tween 80을 60℃로 가열 용해토록 하며 플라스틱 병에 분병하여 보존한다.	
10) 소혈청 알부민 용액	
소혈청 알부민	50ml
25배 인산염완충식염액	40ml
D.W	960ml
1% tween 80용액은 동결보존한다. 그 외는 냉장고에서 보존한다.	

나. 배지의 조성

- | | |
|---------------------------|-------|
| 1) 25배 인산염완충식염수 | 40ml |
| 20배 식염액 | 50ml |
| Cu ⁺⁺ 용액 | 1ml |
| Zn ⁺⁺ 용액 | 10ml |
| Fe ⁺⁺ 용액 | 20ml |
| D.W | 700ml |
- 균질하게 되도록 잘 혼합한다.
- L-Cystine 0.2g
- 5분 동안 흔들고 젖는다.(가열하지 말 것)
- 2) 2중의 두꺼운 와트만 No.1여과지에 여과한다. 여과액이 맑지 않으면 여과를 반복한다.
 - 3) 비타민 B₁₂ 용액 20ml를 가한다.
 - 4) 디아민 HCl B₁ 용액을 0.1ml가한다.
 - 5) 1% Tween 80 용액 120ml을 가한다.(동결보존한 것을 녹여서)
 - 6) 증류수로 1,000ml가 되도록 채운다.
 - 7) 2.2g의 한천을 가하여 녹을 때까지 저으면서 가열한다. 그러나 배지가 끓어서는 안된다.
 - 8) 800ml를 다른 멸균 멸균병에 옮겨 121℃ 15분간 고압소독 한 후 항온수조에서 56℃로 보존한다.
 - 9) 5%의 여과 멸균한 소혈청 알부민액 200ml를 가한다.
(알부민 용액은 하룻밤 부란기에 넣어 따뜻하게 한다)
 - 10) 스퀴르캡 시험관에 분병한다.
위의 조성에서 한천을 제외하면 엘린하우젠씨 액상유성배지가 된다.

부기4. Flechter medium

Flechter medium	90%
Rabbit serum	10%

1-4-4-08

부기5. Leptospira medium

가. 기본배양액

Na ₂ HPO ₄	54g
KH ₂ PO ₄	16.2g
NaCl	54g
NH ₄ Cl	13.5g
Vitamin B ₁	0.27g
Sodium pyruvate	5.4g
Glycerol	15.4ml
Tween80	75ml
D.W	60,000ml

여과멸균

나. BSA solution

Bovine serum albumin	700g
CaCl ₂	1.05g
MgCl ₂	1.05g
ZnSO ₄	0.28g
CuSO ₄	0.021g
FeSO ₄	3.5g
Vitamin B ₁₂	0.014g
D.W	7,000ml

121℃ 30분 Autoclave. pH 7.2~7.4

부기6. 보호제 LPGG(lactose phosphate glutamate gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

부기7. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml

개 디스토펙퍼, 전염성간염, 파라인플루엔자(생)/ 파보바이러스, 렙토스피라 불활화 복합백신

Canine Distemper, Hepatitis, Parainfluenza,
Live/Parvovirus, Leptospira, Inactivated Compound Vaccine

1. 정의

조직배양순화 개 디스토펙퍼 바이러스(canine distemper virus, CDV), 개 전염성 간염 바이러스(infectious canine hepatitis virus, ICHV) 및 개 파라인플루엔자 바이러스(canine parainfluenza virus, CPIV)를 각각 조직배양 세포에 증식시켜 감염배양액을 혼합한 후 보호제를 가하여 동결건조한 백신과 개 파보바이러스(canine parvovirus, CPV)를 조직 배양세포에 증식시켜 감염배양액을 불활화하고 *Leptospira canicola*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*를 순수배양하여 얻은 균액을 불활화하여 만든 백신이며 CDV, ICHV, CPV, CPIV 및 렙토스피라증의 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스 및 균주

2.1. 바이러스 및 균주

CDV는 계태아 배양세포에 순화된 TCO-D주, ICHV는 돼지 신장조직배양세포에 순화된 TCO-H주, CPIV는 CPIV-37주, CPV는 CPV-6주이며, *Leptospira*는 *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae* 균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스 및 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

2.2.1. 개 디스토펙퍼 바이러스(CDV)

특정병원체 부재(specific pathogen free, SPF) 10일령 발육계란의 계태아 섬유아세포에 종독바이러스를 접종하여 37℃에서 5~6일간 배양한 후 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.2. 개 전염성간염 바이러스(ICHV)

돼지 신장조직배양세포에 종독바이러스를 접종하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후 ICHV에 의한 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)가하고 약 80%이상

출현하였을 때 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.3. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

Vero(African green monkey kidney cell line) 배양세포의 단층이 50% 형성되었을 때 바이러스를 접종하여 37℃에서 5~6일간 배양한 후 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.4. 개 파보바이러스(CPV)

개의 종양세포인 A-72(canine tumor cell origin) 배양세포의 단층이 50% 형성되었을 때 종독바이러스를 접종하여 37℃에서 4~6일간 배양한 후 바이러스 감염배양액을 채취하여 -80℃에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.2.5. 렙토스피라(*Leptospira*)

L. canicola 및 *L. icterohaemorrhagiae* 균주를 Ellinghausen's semisolid oleic albumin 배지(부기3)에 각각 접종하여 30℃에서 1~2주간 배양하면서 *Leptospira*균 활성을 확인한 후 각각 채균하여 28℃ 항온기에 보존하며 4주 간격으로 계대배양하고 6개월에 1회씩 실험동물에 통과시켜 균 활력을 유지시킨다.

2.3. 성장 및 독력

2.3.1. 개 디스토펜 바이러스

10일령 SPF발육계란의 계태아 섬유아세포에서 증식하며 7일령 발육계란의 장노막상에 접종하면 비만성 부종을 동반하는 병변(Pock)이 형성된다. CDV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 계태아 섬유아 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.2. 개 전염성간염 바이러스

돼지 신장조직배양세포에서 ICHV 특유의 세포변성효과(CPE)가 일어나며 ICHV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.3. 개 파라인플루엔자 바이러스

Vero 배양세포에 증식이 잘되며 혈구흡착시험에서 기니피프 절혈구를 흡착한다. CPI 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml이상이다.

2.3.4. 개 파보 바이러스

A-72 배양세포에서 증식이 잘되며 CPV 특유의 CPE가 일어나며 돼지 적혈구에 의한 혈구응집능이 인정된다. CPV 발병을 예방하는 면역원성을 보유하며 항혈청에 의하여 중화되고, 배양세포에서의 바이러스의 증식은 $10^{7.0}$ TCID₅₀/ml 이상이다.

2.3.5. 렘토스피라(*L. canicola* 및 *L. icterohaemorrhagiae*)

암시야 장치 현미경으로 균을 검사하면 나선형이며 균체의 양끝은 갈고리 모양으로 구부러져 있거나 회전, 사행운동을 한다. 생후 1~4년 된 개에 감염 발병이 쉬우며 뇨에서 균이 검출, 배양된다. 56℃에서 20분 안에 사멸되며 동물체 밖에서는 오래 생존하지 못한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

3.1.1. 세포

3.1.1.1. 개 디스토펜퍼 바이러스

SPF 10일령 발육계란의 계태아 섬유아세포를 사용한다.

3.1.1.2. 개 전염성간염 바이러스

돼지(신생자돈)신장조직배양세포를 사용한다.

3.1.1.3. 개 파라인플루엔자 바이러스

이유자견의 신장피질을 0.25% 트립신으로 3회 이상 소화시켜 얻어진 실질 세포를 사용한다.

3.1.1.4. 개 파보 바이러스

이유자견의 신장피질을 0.25% 트립신으로 3회 이상 소화시켜 얻어진 실질 세포를 사용한다

3.1.2. 배지

3.1.2.1. 개 디스토펜퍼 바이러스, 3.1.2.2. 개 전염성간염 바이러스, 3.1.2.3. 개 파라인플루엔자 바이러스 및 3.1.1.4. 개 파보 바이러스의 배지 세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.1.2.5. 개 렘토스피라균의 배지는 Ellinghausn's semisolid oleic albumin medium(부기3) 및 *Leptospira* medium(부기4)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 개 디스토펙퍼 바이러스(CDV)

3.2.1.1. 세포배양

A-72 세포(또는 계태아 섬유아세포)를 증식용배지(부기1)에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.1.2. 바이러스배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 증식용배지를 제거하고 CDV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 함유된 세포유지용 배지(부기2)로 교환하여 주고 37℃에서 5~6일간 회전배양한다.

3.2.1.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 배양감염액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.2. 개 전염성 간염 바이러스(ICHV)

3.2.2.1. 세포배양

A-72 세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.2.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 증식용배지를 제거하고 ICHV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀가 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 5~6일간 회전 배양한다.

3.2.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 배양감염액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.3. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

3.2.3.1. 세포배양

A-72 세포를 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 후 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.3.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 CPIV의 함량이 ml당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 5~6일간 회전배양한다.

3.2.3.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 배양감염액을 무균적으로 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.4. 개 파보바이러스(CPV)

3.2.4.1. 세포배양

A-72 세포를 37℃에서 세포증식용 배지에 부유시켜 배양병에 분주한 다음 37℃에서 2~3일간 배양한다.

3.2.4.2. 바이러스 배양

배양세포가 단층을 형성하였을 때 세포증식용 배지를 제거하고 CPV의 함량이 ml당 $10^{4.0}$ TCID₅₀ 함유된 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 4~6일간 회전 배양한다.

3.2.4.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80%이상 출현하였을 때 바이러스 배양감염액을 무균적으로 수확한다.

3.2.4.4. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 1-4-2-04 개 파보바이러스 불활화 백신의 3.2.4의 방법에 따른다.

3.2.5. 렙토스피라

3.2.5.1. 종균배양

L. canicola 및 *L. icterohaemorrhagiae* 균주를 10% 토끼혈청을 가한 Fletcher Medium(부기4)에 종균을 각각 접종하여 30℃에서 1~2주간 배양한다.

3.2.5.2. 본 배양

Leptospira basal medium에 Leptospira enrichment EMJH 100ml를 첨가하여 배양된 종균을 5/100량 접종한 후 30℃에서 4~5일간 계대배양하여 배양한 균액을 종균으로 사용하여 Leptospira medium(부기5-가)에 여과 멸균된 BSA용액(부기5-나)이 첨가된 배양액에 종균을 접종한 후 30℃에서 4~5일간 배양한다.

3.2.5.3. 집균

렙토스피라는 종균을 접종한 후 균 발육상태 및 잡균오염을 매일 암시야 현미경으로 관찰하면서 ml당 균수가 40억개를 얻었을 때 배양액의 일부를 원액검사용으로 채취하고 나머지 배양액은 집균한다.

3.2.5.4. 항원농도조절

채균한 균액을 농축기(Amicon M60. $0.22\mu\text{l}$)를 이용하여 약 10배 량으로 농축한다.

3.2.5.5. 불활화

집균된 배양액은 항원농도를 조절한 후 포르말린을 최종농도가 0.2%되게 첨가하고 실온에서 교반하면서 3일간 불활화시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품에 동량의 4가지 바이러스(CDV, ICHV, CPIV, CPV)의 고도 면역혈청을 가하여 37°C 에서 2시간 (또는 4°C 에서 18~24시간) 감작한 시험품을 A-72 세포배양 시험관 10개에 각각 0.1ml씩 접종하고 37°C 에서 3~7일간 배양한다.

3.3.2.2. 판정

접종액에 의한 봉입체의 형성, CPE 또는 적혈구응집 및 흡착(HA, HAD) 현상을 일으키는 미입 바이러스가 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 바이러스 함량 시험

3.3.3.1. 개 디스토펜 바이러스(CDV)

3.3.3.1.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72 세포가 배양된 plate에 접종하고 37°C 에서 7일간 배양하여 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.1.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{3.5}\text{TCID}_{50}$ 이상이어야 한다.

3.3.3.2. 개 전염성 간염바이러스(ICHV)

3.3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72세포또는 개 신장조직 배양세포(돼지 신장배양세포)에 배양된 plate에

접종하고 37℃에서 7일간 배양하여 세포변성효과를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.2.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.3.3. 개 파라인플루엔자 바이러스(CPIV)

3.3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72세포 또는 Vero 세포가 배양된 시험관 또는 96well plate에 접종한 후 37℃에서 7일간 배양하여 기니픽 혈구 흡착시험(HAD)또는 CPE를 현미경으로 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 $10^{4.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3.3.3.4. 개 파보바이러스(CPV)

3.3.3.4.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml를 A-72세포가 배양된 시험관 또는 96well plate에 접종한 후 37℃에서 7일간 배양하여 적혈구 응집상태 또는 CPE를 현미경으로 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

3.3.3.4.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{5.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 개 파보바이러스

3.3.4.1.1. 재료 및 시험

검사품을 원심하여 적당량을 투석막에 넣고 4℃에서 시험품 100배량 이상인 PBS에서 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다. A-72세포를 배양하여 단층을 형성시킨 다음 세포증식용 배지를 제거하고 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상에 접종하고 세포유지용 배지로 교환하여 주고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.1.2. 판정

조직배양 세포에서 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.3.4.2. 렙토스피라

렙토스피라 선택배지(부기4)에서 14일간 배양하여 균발육이 인정되어서는 안된다.

3.4. 최종원액

3.4.1. DHPI 바이러스

각각의 DHPI 바이러스 원액검사에서 바이러스 함량을 조절한 배양액 CDV 30%, ICHV 10% , CPIV 10% 및 보호제 50%(부기6)를 가하여 잘 혼합한다.

3.4.2. CPV 및 렙토스피라

CPV 바이러스함량(3.3.3.4에 의함) 및 렙토스피라 항원농도(3.2.5.4에 의함)를 조절한 후 불활화된 CPV 원액 40% 렙토스피라 케니코라 20%, 렙토스피라 익테로 헤모라지 20% 및 수산화알루미늄겔 20%를 혼합탱크에서 30분 이상 진탕하여 잘 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

3.5.1. CDV, ICHV 및 CPIV

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결건조 후 봉전한다.

3.5.2. CPV 및 렙토스피라

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 DHPP 백신은 미색의 건조괴이며, 렙토스피라 백신은 연홍색의 액체로서 렙토스피라 백신 으로 DHPP백신을 용해하면 쉽게 균등한 연분홍색의 현탁액이 되며, 굵은입 자, 이물, 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 진공도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-2에 의한 검사에 따른다.

4.3. 함습도 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-3에 의한 검사에 따른다.

4.4. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.5. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하이어야 한다.

4.6. 불활화 확인시험

4.6.1. 개 파보바이러스

3.7.4.1에 의한 검사에 따른다.

4.6.2. 렘토스피라

3.7.4.2에 의한 검사에 따른다.

4.7. 미입바이러스 부정시험

4.7.1. 재료 및 시험

검사품에 동량의 3가지 바이러스(CDV, ICHV, CPIV)의 고도면역혈청을 가하여 37℃에서 2시간 (또는 4℃에 18~24시간) 감작하여 중화시킨 혼합액을 시험품으로 한다. 개 디스토펜 바이러스, 전염성간염 바이러스 및 파라인플루엔자 바이러스의 시험품은 개 신장배양세포 시험관 10개에 각각 0.1ml씩 접종하고 37℃에서 7일간 배양하여 세포의 변화를 관찰한다.

4.7.2. 판정

모든 시험관이 접종액에 의한 봉입체의 형성, CPE 또는 적혈구 응집현상을 일으키는 미입바이러스가 인정되어서는 아니된다.

4.8. 바이러스 함량시험

4.8.1. 개 디스토펜 바이러스

4.8.1.1. 조직 배양법

4.8.1.1.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10배 단계 희석하여 각 희석 바이러스액을 계태아 섬유아 세포가 배양된 plate에 접종한 후 37℃에서 배양하여 세포변성효과를 관찰하고 바이러스 함량을 산출한다.

4.8.1.1.2. 판정

바이러스함량은 마리당 $10^{3.5}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다.

4.8.1.2. 형광항체법(fluorescent antibody assay)

4.8.1.2.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10배 단계 희석하여 각 희석 바이러스액을 plate에 증식시킨 고양이 신장유래세포에 0.1ml씩 접종하고 37°C에서 4일간 배양한다. 4일 후 상층액을 제거하고 80% cold acetone으로 세포를 고정한다. PBS로 두 번 세척하고 37°C에서 20분간 건조 후 plate 한 구멍마다 개 디스토펜 바이러스에 대한 특이항체 0.1ml씩을 분주한다. plate를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다. plate를 PBS로 세척한 후 anti-mouse IgG FITC conjugate를 넣고 37°C에서 1시간 반응 후 PBS로 3회 세척하고 형광현미경으로 특이형광을 관찰한다.

4.8.1.2.2. 판정

마리 당 $10^{3.5}$ FAID₅₀ 이상이어야 한다.

4.8.2. 개 전염성간염 바이러스

4.8.2.1. 재료 및 시험

시험품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 각 희석액 0.1ml씩 4개의 신장세포 배양시험관 또는 96well microplate에 접종하고 세포배양액 0.9ml 또는 0.1ml를 가하여 37°C에서 7일간 배양하여 세포변성효과를 관찰하고 바이러스 함량을 측정한다.

4.8.2.2. 판정

바이러스함량을 마리 당 $10^{3.0}$ TCID₅₀ 이상이어야 한다

4.8.3. 개 파라인플루엔자 바이러스

4.8.3.1. 재료 및 시험

검사품을 세포증식용 배지로 10배 단계 희석하여 $10^{6.0}$ 까지 희석하고 각 희석액 0.1 ml를 10개의 개 신장유래세포 또는 Vero세포에 접종하여 37°C에서 7일간 배양시킨다. 이 때 기니픽 혈구 흡착시험(HAD)또는 CPE를 관찰하여 바이러스 함량을 산출한다.

4.8.3.2. 판정

바이러스함량을 마리 당 $10^{4.0}$ TCID₅₀(HAD₅₀)이상 이어야한다.

4.9. 안전시험

4.9.1. 동물 및 시험

체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~500g의 건강한 기니픽 4마리 및 각 바이러스에 대한 중화항체 음성(10배 이하)의 3개월령의 건강한 개 6마리를 사용한다. 검사품을 마우스 5마리는 0.03ml씩 뇌내에 접종하고, 5

마리에는 0.5ml씩 복강에 접종하고, 기니픽 4마리에는 2.0ml씩을 복강에 접종하여 7일간 관찰한다. 검사품을 개 2마리에는 3마리분을, 2마리는 1마리분을 각각 피하에 접종하고 2마리는 무처치 대조로 하여 14일간 관찰한다.

4.9.2. 판정

시험동물은 관찰기간 중 모두 이상없이 생존하여야 한다.

4.10. 역가시험

4.10.1. 바이러스 (CDV, ICHV, CPIV, CPV)

4.10.1.1. 동물 및 시험

안전시험이 끝난 1두분 접종개 2마리와 대조건 2마리를 사용한다. 1두분 접종개는 안전시험이 끝나는 날 다시 1두분을 피하에 접종하고 2주 후에 채혈한 혼합 혈청과 대조혈청을 사용하여 중화항체를 측정한다.

4.10.1.2. 판정

1두분 접종개의 중화항체는 디스토포 및 전염성간염 바이러스 1:120배 이상, 개 파보바이러스 1:80배 이상의 혈구응집억제가 또는 중화항체가, 개 파라인플루엔자는 1:80배 이상의 중화항체를 나타내야 한다.

4.10.2. 렙토스피라(Leptospira spp.)

4.10.2.1. 동물 및 시험

체중 약 300~400g의 기니픽 10마리 또는 6개월령 미만의 렙토스피라 항체음성인 개 3마리를 사용한다. 기니픽 10마리 또는 개 3마리에 백신 규정량을 14일 간격으로 2회 피하 접종한다. 2차 접종 14일 후에 채혈하여 각 혈청형별 항체를 측정한다. 렙토스피라 항원은 배지(부기3)에 4~7일간 배양하여 1ml당 약 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ 균수로 사용한다.

4.10.2.2. 판정

각각의 혈청형에 대한 항체는 기니픽에서 80% 이상이 10배 이상의 응집가를 나타내어야 하며, 개의 경우는 모두 10배 이상의 응집가를 나타내어야 한다.

5. 보존 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

DHPI동결백신과 CPV 및 렙토스피라 불활화 백신을 무균적으로 잘 혼합하여 견갑부 피하에 1마리 당 1.0ml를 접종한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM 또는 alpha MEM	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
L-glutamine	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM 또는 alpha MEM	
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% sodium bicarbonate solution	2%
L-glutamine	3%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. Ellinghausen's semisolid oleic albumin medium

가. 저장용액

1) 25배 인산염완충식염수

Na ₂ HPO ₄	16.6g
KH ₂ PO ₄	2.172g
D.W	1,000ml

2) 20배 식염액

NaCl	38.5g
------------	-------

1-4-4-09

NH ₄ Cl	5.35g
NaCl ₂ · 6H ₂ O	3.81g
D.W	1,000ml
3) Cu ⁺⁺ 용액	
CuSO ₄	30mg
D.W	100ml
4) Zn ⁺⁺ 용액	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	80mg
D.W	200ml
5) Fe ⁺⁺ 용액	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	80mg
D.W	200ml
6) 비타민 B ₁₂ 농축 저장액	
Vitamin B ₁₂	10mg
D.W	100ml
7) 비타민 B ₁₂ 농축 저장액	
농축저장액	10mg
D.W	90ml
8) 다아민 HCl B ₁ 용액	
다아민 HCl B ₁₂	200mg
D.W	100ml
9) 1% tween 80 용액	
Tween 80	10ml
D.W	1,000ml
Tween 80을 60℃로 가열 용해토록 하며 플라스틱병에 분병하여 보존한다.	
10) 소혈청 알부민 용액	
소혈청 알부민	50ml
25배 인산염완충식염수	40ml
D.W	960ml
1% Tween 80용액은 동결보존한다. 그 외는 냉장고에서 보존한다.	

나. 배지의 조성

1) 25배 인산염완충식염수	40ml
20배 식염액	50ml
Cu ⁺⁺ 용액	1ml
Zn ⁺⁺ 용액	10ml
Fe ⁺⁺ 용액	20ml
D.W	700ml

균질하게 되도록 잘 혼합한다.

L-Cystine	0.2g
-----------------	------

5분동안 흔들고 젖는다(가열하지 말 것).

- 2중의 두꺼운 와트만 No.1여과지에 여과한다. 여과액이 맑지 않으면 여과를 반복한다.
- 비타민 B₁₂ 용액 20ml를 가한다.
- 디아민 HCl B₁ 용액을 0.1ml가한다.
- 1% Tween 80 용액 120ml를 가한다(동결보존한 것을 녹여서).
- 증류수로 1,000ml가 되도록 채운다.
- 2.2g의 한천을 가하여 녹을 때까지 저으면서 가열한다. 그러나 배지가 끓어서는 아니된다.
- 800ml를 다른 멸균 멸균병에 옮겨 121℃ 15분간 고압소독 한 후 항온수조에서 56℃로 보존한다.
- 5%의 여과 멸균한 소혈청 알부민액 200ml를 가한다(알부민 용액은 하룻밤 부란기에 넣어 따뜻하게 한다).
- 스큐르캡 시험관에 분병한다. 위의 조성에서 한천을 제외하면 엘린하우젠씨 액 상유성배지가 된다.

부기4. Flechter medium

Flechter medium	90%
Rabbit serum	10%

1-4-4-09

부기5. *Leptospira* medium

가. 기본배양액

Na ₂ HPO ₄	54g
KH ₂ PO ₄	16.2g
NaCl	54g
NH ₄ Cl	13.5g
Vitamin B ₁	0.27g
Sodium pyruvate	5.4g
Glycerol	15.4ml
Tween80	75ml
D.W	60,000ml

여과멸균

나. BSA solution

Bovine serum albumin	700g
CaCl ₂	1.05g
MgCl ₂	1.05g
ZnSO ₄	0.28g
CuSO ₄	0.021g
FeSO ₄	3.5g
Vitamin B ₁₂	0.014g
D.W	7,000ml

121℃ 30분 Autoclave. pH 7.2~7.4

부기6. 보호제 LPGG(lactose, phosphate, glutamate, gelatin mixture)

Lactose	74.62g
KH ₂ PO ₄	0.517g
K ₂ HPO ₄	0.854g
Sodium L-glutamate	10g
Gelatin	5g
D.W	1,000ml

부기7. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml

여 백

1-6 토 끼

여 백

토끼 바이러스성 출혈병 불활화백신

Rabbit Viral Haemorrhagic Disease Vaccine, Inactivated

1. 정의

토끼 바이러스성 출혈병 바이러스(Calicivirus)를 건강한 토끼에 접종하여 감염장기를 유제하고 포르말린을 가하여 불활화하여 만든 백신이며 토끼의 바이러스성 출혈병 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

1988년 한국에서 분리동정한 토끼바이러스성 출혈병 바이러스 KJ주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

토끼바이러스성 출혈병 바이러스 항체 음성인 12개월령 토끼에 바이러스를 접종하여 RVH(rabbit viral haemorrhagic) 바이러스에 감염된 토끼의 간과 비장을 PBS(부기1)로 10%되게 유제하여 2,000g에서 15분간 원심한 후 상층액의 바이러스를 -80°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

발육계란이나 초대 토끼 신장세포, 토끼 신장세포주 등 각종세포에서 증식되지 않는다. PBS와 사람의 "O"형 적혈구를 이용하여 혈구응집을 나타낼 수 있다. 사람의 "O"형 혈구를 이용하여 혈구응집역가가 1:1,280배 이상을 나타내어야 한다. 토끼에 감염되면 급성, 발열, 치사성 전염병으로 특별한 전구 임상 증상 없이 갑자기 폐사하는 심급성형과 체온이 41°C 이상 상승 한 후 식욕 감퇴, 침울, 발작증세 등을 나타내며 12~16시간에 폐사한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 동물

토끼 바이러스성 출혈병에 대한 항체 음성인 12개월령 토끼를 사용한다.

3.1.2. 재료

-80°C 에 보존된 RVH 바이러스 감염액에 항생제를 첨가하여 만든 유제액을

접종재료로 한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

토끼 바이러스성 출혈열 바이러스 감염유제액을 토끼 대퇴부 근육에 1.0ml씩을 접종한 후 2~3일내 폐사한 토끼의 간장, 비장, 신장을 무균적으로 적출한다.

3.2.2. 바이러스 수확

적출한 재료를 세정한 후 PBS로 10%가 되게 유제하여 2,000g에서 15분간 원심하여 상층액을 수확한다.

3.2.3. 불활화

수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 4% 포르말린을 가하여 진탕한 후 37℃에서 2시간 간격으로 매 5분 정도 진탕하면서 24시간 불활화 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 불활화 확인시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

불활화 된 원액일부를 채취하여 멸균된 투석막에 넣고 25℃ 냉실에서 인산완충 식염액 속에 넣고 하룻밤 투석하여 포르말린을 제거한 다음 토끼 바이러스성 출혈병에 대한 항체 음성인 10~20개월령의 토끼 2마리 이상을 선정하여 검사품을 근육 내에 1.0ml씩 각각 접종하고 14일간 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

토끼는 모두 이상없이 생존하여야 한다.

3.3.3. 동정시험

3.3.3.1. 동물 및 시험

검사품과 동량의 비동화한 토끼 출혈병바이러스의 항혈청을 가하여, 37℃에서 30분마다 2회 교반하는 방법으로 90분간 처리하여 시료로 한다. 항체음성인 건강한 토끼4마리 이상에 시료를 각각 1ml씩 근육 내에 접종하고 7일간 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

검사품을 접종한 토끼는 특이증상을 나타내서는 아니된다.

3.4. 최종원액

불활화 된 바이러스액에 동량의 40% 수산화 알미늄겔을 가하여 잘 흔들어 혼합한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 회갈색의 조직 유제액으로서 정치하면 상청액은 투명하나 진탕하면 용이하게 균등한 액이 된다. 이물 또는 이취를 나타내서는 아니되며, 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 0.2% 이하이어야 한다.

4.4. 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

체중 10~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 4마리 및 토끼 바이러스성 출혈병의 항체 음성인 10~20개월령의 건강한 토끼 10마리를 선정하여 사용한다. 검사품을 마우스 복강에 0.5ml씩, 기니픽 복강에 2ml씩을 각각 접종하고 7일간 관찰하며 토끼 2마리에는 검사품 3두분을, 5마리에는 검사품의 1두분을 각각 근육 내에 주사하고, 3마리는 대조로 한다.

4.4.2. 판정

14일간 관찰에서 모든 토끼는 이상없이 생존하여야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 동물 및 시험

1-6-2-01

안전시험이 끝난 검사품 1두분 접종 토끼 5마리와 안전시험에 사용한 대조 토끼 3마리를 사용하며 토끼 바이러스성 출혈병 바이러스 10,000 MLD(1HA 단위)를 8마리의 토끼 근육 내에 각각 공격 접종하고 10일간 관찰한다.

4.5.2. 판정

대조 토끼는 2마리 이상이 토끼 바이러스성 출혈병에 의한 폐사를 하여야 하며, 검사품을 접종한 토끼는 4마리(80%) 이상이 건강하게 생존내과 하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

3개월령 이하의 토끼에는 1ml씩 1~2개월 간격으로 2회 근육 또는 피하에 접종한다. 3개월령 이상의 토끼에는 1ml씩 근육 또는 피하에 접종하고 6개월 후 보강 접종한다.

<부 기>

부기1. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride	0.2g
Disodium hydrogen orthophosphate(anhydrous)	1.15g
Potassium dehydrogen	0.2g
D.W	1,000ml

최종 pH가 7.2되게 조정하여 15Lb에서 15분간 멸균 후 사용한다.

여 백

1-7 오 리

여 백

오리 바이러스성 간염 생백신

Duck Viral Hepatitis Vaccine, Live

1. 정의

약독 오리 간염 바이러스를 계태아에 증식시켜 감염 계태아 유제액을 동결한 생백신이며 오리 바이러스성 간염 예방에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 오리 간염 바이러스인 HSB주 또는 국립과학검역원에서 적당하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

8 일령의 SPF (specific pathogen free) 발육계란의 뇨막강 내에 $10^{5.0}$ EID₅₀/ml 희석한 바이러스액 0.2ml를 접종하여 37℃ 부란기에서 48시간 배양 후 감염된 계태아를 무균적으로 채취한다. 계태아의 머리를 제거한 후 감염 계태아를 20% 유제하여 -70℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

약독 오리 간염 바이러스는 계태아에서 순화된 바이러스로 계태아 치사율이 높으며 계태아 몸통에서 매우 잘 자란다. 감염된 계태아는 위축되고 간에 괴사소가 형성된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

건강한 닭에서 생산된 SPF 종란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

보존된 종독바이러스를 PBS(부기1)로 $10^{5.0}$ EID₅₀/ml되게 희석하여 8일령의 SPF 발육계란의 뇨막강(allantoic cavity)내로 0.2ml씩 접종한다.

3.2.2. 바이러스 배양

접종한 발육계란을 37~38℃ 부란기에서 48시간 배양한다.

1-7-2-01

3.2.3. 바이러스 수확

배양 후 검란하여 살아있는 발육계란을 4℃의 냉장실에서 12시간 이상 냉각한 후 난황이 혼입되지 않도록 하여 계태아를 무균적으로 채취하여 바이러스 감염 계태아의 머리를 제거한 후 20%의 유제액을 만든다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 미입바이러스 부정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

오리 바이러스 감염바이러스의 고도 면역혈청을 사용하여 검사품의 바이러스를 완전히 중화하고 중화된 검사품 0.2ml에 10마리분의 용량이 되도록 희석하여 10개 이상의 9~11일령 발육계란의 용모노막과 노막강 및 6일령 발육계란의 난황 내에 각각 0.2ml씩 접종한다. 용모노막 및 노막강 접종란은 5일간, 난황 내 접종란은 8일간 37℃에서 배양한 후 계태아의 병변 및 닭 적혈구 응집성을 조사한다. 단, 접종 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외한다.

3.3.2.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{3.5}EID_{50}$ 이상이어야 한다.

3.3.3. 바이러스함량시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 PBS로 10배 단계 희석한다. 이 각각의 희석액을 5개 이상의 8~10일령 SPF발육계란의 노막강 내에 0.1ml씩 접종한다. 접종 후 24시간 이내에 폐사한 것은 판정에서 제외하고, 37℃에 5일간 배양하여 오리 바이러스성 간염 특유의 병변이 나타난 것을 양성으로 하여 EID_{50} 을 산출한다.

3.3.3.2. 판정

바이러스 함량은 마리당 $10^{3.5}EID_{50}$ 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

바이러스 함량을 PBS로 조정된 원액을 4℃에서 충분히 교반하여 혼합한다.

3.5. 분병 및 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한 후 -70°C 이하에 동결한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 있으며 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 세균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-6에 의한 검사에 따른다.

4.3. 바이러스 함량시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.4 안전시험

4.4.1. 동물 및 시험

오리 바이러스성 간염에 감수성이 있는 1~3일령 오리 50마리를 사용하여 검사품을 10마리는 근육 내로, 10마리는 피하로 10마리는 음수로, 10마리는 점안으로 접종하여 40마리는 시험계로, 10마리는 무접종 대조계로 한다. 시험동물에 검사품의 권장접종량 10배를 사용법에 따라 접종하고 대조계와 같이 14일간 관찰한다.

4.4.2. 판정

모든 시험동물은 시험기간 중 건강하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

-70°C 이하 냉동고에 보존 또는 액체질소통에 보존한다. 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

규정량을 음수 또는 근육 내 접종 등의 방법으로 투여한다.

1-7-2-01

<부 기>

부기1. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.047g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin G-Na	500unit/ml
Kanamysin	200 μ l/ml

2. 진단 제 제

여 백

2-1 소

여 백

소결핵 피.피.디(PPD) 진단액

Bovine PPD Tuberculin, Intradermic

1. 정의

결핵균을 액체배지에 배양하여 그 배양여과액 중 결핵병에 대하여 특이적인 피내반응을 일으키는데 필요한 활성물질을 함유한 투명한 액상제제(PPD tuberculin)이며 소의 결핵병 검출을 위한 피내반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

우형 결핵균(*Mycobacterium bovis*)AN5주 또는 국립수의과학검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Löwenstein-Jensen(L-J) 사면배지(부기1)에 결핵균을 이식하여 37~38℃ 부란기내에 2~4주간 배양하며 6개월마다 계대배양하여 4℃에 보존 또는 동결건조하여 4℃ 냉장고에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

우형 결핵균은 항산성 염색 양성인 간균이며 아포, 협막, 편모를 형성하지 않으며 색소를 형성치않고 카타라제 시험(catalase test), 니아신 시험(niacin test), 나이트레이트 반응시험(nitrate reduction test)에서 음성이다. 소결핵균은 기니피크, 토끼에서는 병원성이 있으나 닭에서는 병원성이 없다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Dorset-Henley(D-H)배지(부기2) 또는 이와 동등한 성능을 가진 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

L-J 사면배지에 발육된 균을 백금이(spatula loop)로 따서 D-H 배지를 약 7ml씩 소분한 메카트니병 (McCartney bottle)의 벽에 문질러 사면에 균을 부유시켜 37~38℃ 부란기에 2주간 배양하여 균막을 형성시키고 발육왕성한

2-1-1-01

균막을 300ml 삼각플라스크(Erlenmayer flask)에 100ml씩 넣은 D-H배지 액면상에 조용히 띄우고 2주간 37~38℃ 부란기에서 배양 관찰한다.

3.2.2. 본배양

종균배양에서 발육한 균막을 클로버엽상 (spatula loop)으로 건져서 1,000ml 룩스병(Roux bottle)에 200ml씩 넣은 D-H배지 액면상에 종균배양과 같은 방법으로 조용히 이식한 후 37~38℃ 부란기에서 9~10주간 배양한다.

3.2.3. 살균

9~10주간 본배양후에 잡균오염 유무를 경검 확인하여 오염된 것은 살균 후 버리고 잡균오염이 없는 것은 잘 흔들어서 균막을 배지중에 완전히 가라앉혀 진탕 부유시키고 100℃ 증기압에서 60분간 살균한다.

3.2.4. 제균

살균된 것은 실온에서 냉각 후 60~80목 동망으로 여과하여 균피를 제거하고 이어서 여과지로 여과하면 투명한 황갈색의 배양여액인 튜베르쿨린(tuberculin) 원액을 얻는다.

여과된 튜베르쿨린 원액을 사이즈(Sitz)여과기의 이케이 패드(EK pad)여과지로 여과하여 잡균 및 균체를 완전히 제거한다.

3.2.5. 정제

사이즈 여과액에 40% TCA(trichloroacetic acid) 용액을 1/10량(v/v) 가하여 잘 혼합한 후 실온에서 하룻밤 정치하여 단백을 침전 시킨다. 침전물을 원심침전병에 넣어 8,000rpm으로 30분간 원심 침전하여 상층액을 버리고 1% TCA 일정량을 넣어 진탕하여 10분간 원심 침전한다. 이와 같은 방법으로 3회 반복하여 배양여액중의 배지 성분을 제거하고 10% sodium chloride용액을 가하여 원심 침전하여 TCA 성분을 제거한다.

3.2.6. PPD(purified protein derivative, PPD) 건조

3.2.5에 의해 원심 세척하여 침전된 단백질의 병을 여과지로 밀봉하여 37℃ 부란기 내에서 2일간 방치 건조하여 PPD분말을 만든다. 건조한 PPD는 4℃에 보관한다.

3.2.7. PPD 용액제조

분말 PPD에 M/15 disodium phosphate용액 일정량을 가하여 pH를 7.0~7.2로 수정하고 진탕기에서 2시간이상 진탕하여 완전한 용액상태로 만들고 원배양액의 1/10량 되게하여 게달(Kjeldahl)법에 의하여 총 단백질량을 측정하여 단

백함량이 2mg/ml되게 PPD tuberculin 희석액(부기3)으로 PPD의 액상용액을 제조한다.

3.2.8. 항원농도조절

3.2.8.1. 재료 및 시험

Tuberculin 제조용 우형결핵균 AN₅주를 본 배양과 같은 슬기로 약 4주간 배양하여 발육왕성한 균액을 100℃에서 30분간 살균하여 균체를 여별하고 균체는 0.1% 투윈 워터 (tween water) (부기4)로 2~3회 세조하고 아세톤(acetone)과 에칠이더(ethyl ether)로 다시 세조하여 37℃ 부란기 내에서 완전히 건조시킨다. 건조된 유발내에 소결핵 사균 건조균체 5mg/ml에 멸균 Freund's adjuvant를 가하여 잘 갈아서 균등한 유제액을 만든다. 이상의 조작 중 잡균에 대한 오염의 염려가 있을 때는 80℃에 30분간 가온 살균하여 사용하는 것이 좋다. 이상과 같이 하여 만든 사균 유제액을 체중 350g~400g 정도되는 건강한 기니픽의 대퇴부 근육내에 각각 0.3ml씩 접종한다. 기니픽은 감염 6주 후에 시험에 사용한다.

3.2.8.2. 시험

PPD 용액을 0.5% 페놀가 인산완충액 (부기5)으로 다음<표>와 같이 희석한다

<표>

시험품		표준품		기니픽수
%	희석배수	%	희석배수	
40	1:2,500	100	1:1,000	5
60	1:1,660	100	1:1,000	5
80	1:1,250	100	1:1,000	5
100	1:1,000	100	1:1,000	5
120	1:833	100	1:1,000	5

상기 <표>와 같이 각 20% 간격의 매희석액을 감염된 기니픽의 배부양측을 삭모하고 정중선을 경계로 하여 한쪽에는 표준품을 다른 한쪽에는 검사품을 각 대응 희석액을 각각 5개소에 0.1ml씩 피내접종하고 24시간 후에 그 경결 반응치를 측정하여 그 반응치의 신뢰도 표준품과 검사품 간에 있어서 90~110%에 들어가는 점을 통계적으로 처리하여 PPD 용

2-1-1-01

액을 tuberculin 희석액(부기3)으로 표준품과 같은 농도가 되도록 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 결핵균 부정시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

L-J 사면배지 5개 이상에 검사품 1ml씩 각각 접종하고 37℃에서 8주간 배양한다.

3.3.3.2. 판정

결핵균 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.4. 동정시험

3.3.4.1. 동물 및 시험

체중 350g~400g의 건강한 기니픽과 감작 기니픽(별첨 참조) 각각 2마리씩 사용하여 각 기니픽 내부에 표준품과 검사품의 1,000배 희석액을 각각 2개소에 0.1ml씩 피내접종한다.

3.3.4.2. 판정

24시간 후 감작 기니픽에서는 표준품과 공시품이 거의 같은 반응을 나타내며 건강한 기니픽에서는 7mm이하의 반응을 나타내어야 한다.

3.3.5. 안전시험

3.3.5.1. 동물 및 시험

체중 350~400g의 건강한 기니픽 6마리에 검사품 tuberculin을 1ml씩 복강내 접종하고 6주간 관찰하며 6주 후 표준품 tuberculin의 1,000배 희석액 0.1ml씩을 2개소의 배부 피내에 접종하고 반응치를 측정하며 또한 부검하여 장기의 병변을 확인한다.

3.3.5.2. 판정

기니픽은 1주간의 관찰기간 중 이상이 없어야 하고 표준품 tuberculin 접종 24시간 후 tuberculin반응이 음성이어야 한다. 또한 접종한 기니픽의

부검결과 결핵병변이 없어야 한다.

3.3.6. 역가시험

3.3.6.1. 동물 및 시험

감작 기니픽 15마리 이상의 등의 털을 깎고 등 한쪽에는 표준품을 다른 한쪽에는 검사품을 다음 표와 같이 각각 희석하여 각 대응부에 0.1ml씩 10개소에 피내 접종하고 24시간 후에 그 반응치를 측정하여 분산 분석법을 표준품과 검사품간의 유의성의 유무를 검정한다.

<표1> 표준품과 검사품 PPD tuberculin의 반응치 집계표

제 품	검 사 품					표 준 품				
	A 1/100	B 1/150	C 1/200	D 1/300	E 1/400	A' 1/100	B' 1/150	C' 1/200	D' 1/300	E' 1/400
1										
2										
3										
·										
·										
·										
15										
A	A					A'				
B		B					B'			
C			C					C'		
D				D					D'	
E					E					E'
(A+B+C+D+E)										
(A+B+C+D+E) + (A'+B'+C'+D'+E')										

3.3.6.2. 판정

처리(희석배수)간에는 1%와 5% 수준의 유의성 차가 인정되나 표준품과 검사품간에 1%와 5% 수준에서 유의성 차가 있어서는 안된다.

<표2> PPD tuberculin 반응치의 분산분석표

요 인	DF	SS	MS	F
전 체 처리(회석) 시험품(검사품, 표준품)(1) 기니픽 반복수(2) 상호작용 1×2 오 차				

3.3.6.3. 간이시험

감작 기니픽 4마리의 등에 털을 깎고 등 한쪽에는 표준품 다른 한쪽에는 검사품의 1,000배액을 각각 3개소에 0.1ml씩 피내접종하고 24시간 후의 반응치를 조사한다. 표준품과 검사품간의 반응차는 2mm이내이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.8에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 무색의 투명한 액체로서 소분용기마다 내용물의 성상이 균일하고 이물이나 침전물이 없어야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 석탄산의 함유량은 $0.5 \pm 0.05\%$ 이어야 한다.

4.4. 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.6에 의한 검사에 따른다.

4.7. 간이시험

3.3.6.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 피내접종반응법

소는 원액 0.1ml를 미근부 추벽부 피내에 접종한다.

유산양은 0.5% 석탄산액으로 2배 희석하여 0.1ml를 내근부 추벽부 피내에 접종한다.

돼지는 0.5% 석탄산액으로 2배 희석하여 0.1ml를 이근부피내에 접종한다.

6.2. 판정

양 성 : 접종후 48~72시간에 접종부위 종장차가 5mm 이상이고 경결을 동반한 것.

음 성 : 종장차가 3mm 이하이고 경결을 동반하지 않는 것.

의양성 : 종장차가 3mm 이상 5mm 이하이며 양성인지 음성인지 확실치 않은 것

<부 기>

부기1. Löwenstein - Jensen(L-J) 사면배지

Mono potassium phosphate, anhydrous(KH_2PO_4)	2.4g
Magnesium sulfate($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.24g
Magnesium citrate($\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$)	0.6g
Asparagine	3.6g
Glycerol(reagent grade)	12ml
D.W	600ml
Potato flour	30gm
Homogenized whole egg	1,000ml
Malachite green(2% aqueous solution)	20ml

계란은 신선한 것으로 하며 난각파괴전 가-제로 잘 씻어 말린후 각반할 때 2% malachite green을 가하여 각반후 두겹의 멸균 가제로 여과하고 상기 시약을 녹힌 용액과 잘혼합하여 1/2 OZ 맥카트니병(McCattney bottle)에 약 7~8ml씩 분주하여 사면으로 제 1일에 85~90℃ 건열기내에서 50분간 소독하고 제 2일에 다시 80~85℃에서 50분간 소독하고 소독이 끝나면 37℃ 부란기내에서 48시간동안 무균검사를 실시한 후 사용한다.

부기2. Dorset-Henley(D-H) 배지

A. Asparagine	18g
Sodium citrate($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.9g
Potassium phosphate,dibasic($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	1.8g
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.5g
Glycerol(reagent grade)	100(79.4)ml
Ferric citrate(Scales)	0.3g
Ammonium citrate($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7$)	0.3g
D.W	950ml

B. Trace element

Zinc sulfate($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	10mg
Magnesium chloride($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	2.5mg
Calcium chloride($CaCl_2$)	3.5mg
D.W	50ml

상기 A용액에 B액인 발육인자를 가하여 pH6.8~7.2가 되게 1N(normal) NaOH나 HCl로 조정하고 여과지로 여과하여 1,000ml 룩스병 (Roux bottle)에 200ml씩 분주하여 15파운드에서 20~30분간 증기고압멸균한 다음 50% 포도당 (50% glucose)용액을 싸이츠(Seitz)여과하여 각 용기마다 4ml씩(배지량의 1/50 v/v) 가해준다.

다음 37℃ 부란기내에서 2~3일간 무균검사를 실시한 후 사용한다.

부기3. PPD tuberclin 희석액

Glycerol	300ml
Sodium chloride(NaCl)	15g
Phenol	15g
M/15 phosphate buffer solution(①+②)	300ml
① Na_2HPO_4 4.73g 증류수 500ml	183.3ml
② KH_2PO_4 4.53g 증류수 500ml	116.7ml
①183.3ml + ②116.7ml = 300ml	
Gelatin	0.6g

15Lb 30분간 멸균후 최종pH7.0 되게 조정 4℃ 냉장고에 보존하면서 사용시에는 상기용액 1Volume + 멸균증류수 4Volume을 혼합하여 사용한다.

부기4. Tween water (0.1% tween 80)

Tween 80	10ml
D.W	1,000ml

15Lb에서 15분간 멸균하여 사용한다.

2-1-1-01

부기5. 0.5% 페놀가 인산완충액

Potassium phosphate(KH_2PO_4)	41.45g
Sodium phosphate($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	7.6g
Sodium chloride(NaCl)	14.8g
Glycerin	30ml
Gelation	1.0ml
Phenol	5ml
D.W	1,000ml

요네병 피.피.디(PPD) 진단액

Johnin PPD, Intradermic

1. 정의

요네병균을 액체 배지에 배양하여 그 배양 여과액 중 요네병에 대하여 특이적인 피내 반응을 일으키는데 필요한 활성물질을 함유한 투명한 액상제제(Johnin PPD)이며 소의 요네병 검출을 위한 피내반응 건사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ATCC 19698주 또는 국립수의 과학연구소에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

보존된 균주를 mycobactin를 첨가한 Löwenstein-Jensen 배지(부기1)에 이식하여 37℃에서 6~8주 배양한 후 4℃에 보존하며 6개월마다 계대 또는 균액에 보호제를 가하여 동결건조한 후 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Dorset-Henley(D-H)배지(부기2)에 균질하게 자라며 Löwenstein-Jensen(L-J) 배지 등 고체 배지에 배양 시 mycobactin이 첨가된 배지에서만 자라는 것이 다른 *mycobacterium*과 구별된다. 균은 다른 *mycobacterium* 같이 호기성, 향산성 단간균이며 표준한천배지 및 nutrient agar에 7일간 배양하였을 때 균 발육이 없어야한다. 본 균은 소, 양에 주로 감염되며 어린 송아지가 감수성이 가장 높다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

D-H배지(부기2) 또는 이와 동등한 성능을 가진 본 균이 잘 자랄 수 있는 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

Mycobactin을 첨가한 L-J사면배지(부기1)에 발육된 균을 백금이(spatula loop)로 따서 D-H 배지를 약 7ml씩 소분한 메카트니병(McCartney bottle)의

2-1-1-02

벽에 문질러 액상 배지에 균체가 떠서 자라도록 균을 부유시켜 37~38℃ 배양기에서 8~10주간 배양하여 균막을 형성시키고 발육 왕성한 균막을 300ml 삼각 플라스크에 100ml씩 분주한 D-H 배지의 액면상에 균막을 이식하여 조용히 띄우고 6~8주간 37~38℃ 배양기에서 배양 관찰한다.

3.2.2. 본배양

종균배양에서 발육한 균막을 클로버엽상 (spatula loop)으로 건져서 1,000ml 룩스병(Roux bottle)에 200ml씩 넣은 D-H배지 액면상에 종균배양과 같은 방법으로 조용히 이식한 후 37~38℃ 부란기에서 9~10주간 배양한다.

3.2.3. 살균

8~10주간 본배양후에 잡균오염 유무를 경검 확인하여 오염된 것은 살균 후 버리고 잡균오염이 없는 것은 잘 흔들어서 균막을 배지중에 완전히 가라앉혀 진탕 부유시키고 100℃에서 30분간 살균한다.

3.2.4. 제균

살균된 것은 실온에서 냉각 후 60~80목 동망으로 여과하여 균괴를 제거하고 이어서 여과지로 여과하면 투명한 황갈색의 배양여액인 Johnin원액을 얻는다. 여과된 Johnin 원액을 사이즈(Sitz)여과기의 이케이 패드(EK pad)여과지로 여과하여 잡균 및 균체를 완전히 제거한다.

3.2.5. 정제

사이즈 여과액에 40% TCA(trichloroacetic acid) 용액을 1/10량(v/v) 가하여 잘혼합한 후 실온에서 하룻밤 정치하여 단백을 침전 시킨다. 침전물을 원심침전병에 넣어 2,000rpm으로 10분간 원심 침전하여 상층액을 버리고 1% TCA 일정량을 넣어 진탕하여 10분간 원심 침전한다. 이와 같은 방법으로 3회 반복하여 배양여액중의 배지 성분을 제거하고 10% sodium chloride용액을 가하여 원심 침전하여 TCA 성분을 제거한다.

3.2.6. PPD(purified protein derivative) 건조

3.2.5에 의해 원심 세척하여 침전된 단백질의 병을 여과지로 밀봉하여 37℃ 부란기 내에서 2일간 방치 건조하여 PPD분말을 만든다. 건조한 PPD는 4℃에 보관한다.

3.2.7. PPD 용액제조

분말 PPD에 M/15 disodium phosphate용액 일정량을 가하여 pH를 7.0~7.2로

수정하고 진탕기에서 2시간이상 진탕하여 완전한 용액상태로 만들고 원배양액의 1/10량 되게 하여 게달(Kjeldahl)법에 의하여 총 단백질량을 측정하여 단백질량이 2mg/ml되게 Johnin PPD 회석액(부기3)으로 PPD의 액상용액을 제조한다.

3.2.8. 항원농도조절

3.2.8.1. 재료 및 시험

Johnin 제조용 *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* ATCC 19698주를 본 배양과 같은 술기로 약 8주간 배양하여 발육왕성한 균액을 100℃에서 30분간 살균하여 균체를 여별하고 균체는 0.1% 투윈 워터(tween water) (부기4)로 2~3회 세조하고 아세톤(Acetone)과 에칠이더(ethyl ether)로 다시 세조하여 37℃ 부란기 내에서 완전히 건조시킨다. 건열멸균된 유발내에 소결핵 사균 건조균체 5mg/ml에 멸균 Freund's adjuvant를 가하여 잘 갈아서 균등한 유제액을 만든다. 이상의 조작 중 잡균에 대한 오염의 염려가 있을 때는 80℃에 30분간 가온 살균하여 사용하는 것이 좋다. 이상과 같이 하여 만든 사균 유제액을 체중 350g~400g 정도되는 건강한 기니피크의 대퇴부 근육내에 각각 0.3ml씩 접종한다. 기니픽은 감작 약 6주 후에 시험에 사용한다.

3.2.8.2. 시험

PPD 용액을 0.5% 페놀가 인산완충액 (부기5)으로 다음<표>와 같이 희석한다.

<표>

검사품		표준품		기니픽수
%	희석배수	%	희석배수	
40	1:2,500	100	1:1,000	5
60	1:1,660	100	1:1,000	5
80	1:1,250	100	1:1,000	5
100	1:1,000	100	1:1,000	5
120	1:833	100	1:1,000	5

상기 <표>와 같이 각 20% 간격의 매희석액을 감작된 기니픽의 배부양측을 삭모하고 정중선을 경계로 하여 한쪽에는 표준품을 다른한쪽에는 검사품을

2-1-1-02

각 대응 회석액을 각각 5개소에 0.1ml씩 피내접종하고 24시간 후에 그 경결 반응치를 측정하여 그 반응치의 신뢰도 표준품과 검사품간에 있어서 90~110%에 들어가는 점을 통계적으로 처리하여 PPD 용액을 Johnin 회석액(부기3)으로 표준품과 같은 농도가 되도록 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 요네균 부정시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

L-J 사면배지 5개 이상에 각각 검사품 1ml씩을 접종하고 37℃에서 8주간 배양한다.

3.3.3.2. 판정

요네균 발육이 인정되지 않아야 한다.

3.3.4. 동정시험

3.3.4.1. 동물 및 시험

체중 350~400g의 건강한 백색 기니픽과 감작 기니픽<별첨>을 각각 2마리씩 사용한다. 각 기니픽의 배부에 표준품과 검사품의 100배 회석액을 각각 2개소에 0.1ml씩 접종한다.

3.3.4.2. 판정

24시간 후 측정결과 감작 기니픽에 있어서는 검사품과 표준품이 거의 같은 반응을 나타내어야 하며 건강 기니픽에 있어서는 7mm 이하의 반응을 나타내어야 한다.

3.3.5.1. 동물 및 시험

체중 300~400g의 건강한 기니픽 6마리를 사용하여 검사품을 복강내에 1ml씩 각각 접종하고 1주일간 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

관찰기간 중 어떠한 이상도 나타내서는 아니된다.

3.3.5.3. 배양시험

검사품 Johnin 0.5ml를 5개의 L-J사면배지에 각각 0.1ml씩 접종 배양하여 6주간 관찰한다. 그 결과 결핵균의 발육이 없어야 한다.

3.3.6. 역가시험

3.3.6.1. 동물 및 시험

감작 기니픽 15마리 이상의 등을 깎고 등 한쪽에는 표준품 다른 한쪽에는 검사품을 다음 표와 같이 각각 희석하여 각 대응부에 0.1ml씩 8개소에 피내접종하고 24시간 후 그 반응치를 측정하여 분산분석법으로 표준품과 검사품간의 유의성의 유무를 검정한다.

<표1> 표준품과 검사품 Johnin PPD의 반응치 집계표

제품	공시품					표준품				
	A 1/100	B 1/150	C 1/200	D 1/300	E 1/400	A' 1/100	B' 1/150	C' 1/200	D' 1/300	E' 1/400
1										
2										
3										
·										
·										
15										
A	A					A'				
B		B					B'			
C			C					C'		
D				D					D'	
E					E					E'
(A+B+C+D+E)										
(A+B+C+D+E) + (A'+B'+C'+D'+E')										

3.3.6.2. 판정

처리(희석배수)간에는 1%와 5%의 유의성 차가 인정되나 표준품과 검사품간에 1%와 5% 수준에서 유의성 차가 있어서는 안된다.

<표2> Johnin PPD 반응치의 분산분석표

요 인	DF	SS	MS	F
전 체				
처리(회석)				
시험품(공시품, 표준품)(1)				
기니피 반복수(2)				
상호작용 1×2				
오 차				

3.3.6.3. 간이시험

감작 기니피 4마리의 등에 털을 깎고 등 한쪽에는 표준품을 다른 한쪽에는 검사품의 100배액을 각각 3개소에 0.1ml씩 피내접종하고 24시간 후의 반응치를 조사한다. 표준품과 검사품간의 반응차는 2mm 이내이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.8에 의하여 조정된 항원 농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 무색의 투명한 액체로서 소분용기마다 내용물의 성상이 균일하고 이물이나 침전물이 없어야한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 석탄산의 함유량은 0.5±0.05% 이어야 한다.

4.4. 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 안전시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.6에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 피내접종반응법

소는 원액 0.1ml를 미근부 추벽부 또는 경측부에 Johnin PPD원액 0.1ml를 접종한다.

6.2. 판정

양 성 : 접종후 48~72시간에 접종부위 종장차가 5mm 이상인 것

의양성 : 종장차가 3mm 이상 5mm 이하이며 양성인지 음성인지 확실치 않은 것

음 성 : 종장차가 3mm 이하인 것

※주의

- 사용시 흔들어서 사용할 것
- 접종 전에 접종부의 피부 두께를 정확하게 측정할 것
- 접종 부위를 알콜만으로 소독 후 완전히 건조된 후에 접종할 것

<별첨> 동정시험

1) 감작 기니픽

Paratuberculosis ATCC19698주의 건조사균체에, 멸균유동파라핀을 가하여 0.1mg/ml의 균 부유액을 만들고 이것을 체중 300~400g의 건강한 백색 기니픽의 양대퇴부 근육내에 0.3ml씩 주사한다. 감작 6주 후 표준품 100배 희석액을 기니픽의 견부에 0.1ml씩 피내 접종한다. 24 시간 후의 반응이 13~19mm 되는 것을 사용한다. 이와 같은 기니픽을 감작 기니픽이라 한다.

2) 0.5% 페놀가인산완충액(희석액)

인산제 2 칼륨(무수)	1.45g
인산제 1 나트륨(무수)	15.28g
염화나트륨	4.8g
페놀	5g

증류수를 가하여 1,000ml가 되도록 한 다음 여과하여 사용한다.

단, 제조에 특수 희석액을 사용시는 해당 희석액을 사용한다.

<부 기>

부기1. Löwenstein - Jensen(L-J) 사면배지

Mono potassium phosphate, anhydrous(KH_2PO_4)	2.4g
Magnesium sulfate($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.24g
Magnesium citrate($\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$)	0.6g
Asparagine	3.6g
Glycerol(reagent grade)	12ml
D.W	600ml
Potato flour	30gm
Homogenized whole egg	1,000ml
Malachite green(2% aqueous solution)	20ml

계란은 신선한 것으로 하며 난각파괴전 가-제로 잘 씻어 말린후 각반할 때 2% malachite green을 가하여 각반후 두겹의 멸균 가제로 여과하고 상기 시약을 녹힌 용액과 잘혼합하여 1/2 OZ 맥카트니병(McCattney bottle)에 약 7~8ml씩 분주하여 사면으로 제 1일에 85~90℃ 건열기내에서 50분간 소독하고 제 2일에 다시 80~85℃에서 50분간 소독하고 소독이 끝나면 37℃ 부란기내에서 48시간동안 무균검사를 실시한 후 사용한다.

부기2. Dorset-Henley(D-H) 배지

A. Asparagine	18g
Sodium citrate($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.9g
Potassium phosphate,dibasic($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	1.8g
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.5g
Glycerol(reagent grade)	100(79.4)ml
Ferric citrate(scales)	0.3g
Ammonium citrate($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7$)	0.3g
D.W	950ml

2-1-1-02

B. Trace element

Zinc sulfate($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	10mg
Magnesium chloride($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	2.5mg
Calcium chloride($CaCl_2$)	3.5mg
D.W	50ml

상기 A용액에 B액인 발육인자를 가하여 pH6.8~7.2가 되게 1N(Normal) NaOH나 HCl로 조정하고 여과지로 여과하여 1,000ml 룩스병 (Roux bottle)에 200ml씩 분주하여 15파운드에서 20~30분간 증기압멸균한 다음 50% 포도당(50% Glucose)용액을 사이츠(Seitz)여과하여 각 용기마다 4ml씩(배지량의 1/50 v/v) 가해준다.

다음 37°C 부란기내에서 2~3일간 무균검사를 실시한 후 사용한다.

부기3. PPD Johnin 희석액

Glycerol	300ml
Sodium chloride(NaCl)	15g
Phenol	15g
M/15 phosphate buffer solution(①+②)	300ml
① Na_2HPO_4 4.73g 증류수 500ml	183.3ml
② KH_2PO_4 4.53g 증류수 500ml	116.7ml
①183.3ml + ②116.7ml = 300ml	
Gelatin	0.6g

15Lb 30분간 멸균후 최종pH7.0 되게 조정 4°C 냉장고에 보존하면서 사용시에는 상기용액 1 volume + 멸균증류수 4 Volume을 혼합하여 사용한다.

부기4. Tween water (0.1% tween 80)

Tween 80	10ml
D.W	1,000ml

15Lb에서 15분간 멸균하여 사용한다.

부기5. 0.5% 페놀가 인산완충액

Potassium phosphate(KH_2PO_4)	41.45g
Sodium phosphate($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$)	7.6g
Sodium chloride(NaCl)	14.8g
Glycerin	30ml
Gelation	1.0ml
Phenol	5ml
D.W	1,000ml

요네병 항체 검사(ELISA)용 항원

Johnes's Disease Antigen, Enzyme-linked Immunosorbent Assay

1. 정의

Mycobacterium paratuberculosis 19698균을 배양하여 균체를 초음파분쇄기로 파쇄하고 단백질을 추출하여 만든 항원이며 소 요네병의 감염항체를 검출하기 위한 효소결합면역측정법에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ATCC 19698주 또는 국립수의 과학연구소에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

보존된 균주를 mycobactin를 첨가한 Löwenstein-Jensen 배지(부기1)에 이식하여 37°C에서 6~8주 배양한 후 4°C에 보존하며 6개월마다 계대 또는 균액에 보호제를 가하여 동결건조한 후 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Dorset-Henley(D-H) 배지(부기2)에 균질하게 자라며 Löwenstein-Jensen 배지 등 고체 배지에 배양 시 mycobactin이 첨가된 배지에서만 자라는 것이 다른 mycobacterium과 구별된다. 균은 다른 mycobacterium 같이 호기성, 항산성 단간균이며 표준한천배지 및 nutrient agar에 7일간 배양하였을 때 균 발육이 없어야 한다. 본 균은 소, 양에 주로 감염되며 어린 송아지가 감수성이 가장 높다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Dorset-hemley배지(부기2) 또는 이와 동등한 성능을 가진 본 균이 잘 자랄 수 있는 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

Mycobactin을 첨가한 Löwenstein-Jensen 배지(부기1)에 발육된 균을 백금이(spatula loop)로 따서 D-H 배지를 약 7ml씩 소분한 메카트니병(McCartney

bottle)의 벽에 문질러 액상 배지에 균체가 떠서 자라도록 균을 부유시켜 37~38℃ 배양기에서 8~10주간 배양하여 균막을 형성시키고 발육 왕성한 균막을 300ml 삼각 플라스크에 100ml씩 분주한 D-H 배지의 액면상에 균막을 이식하여 조용히 띄우고 6~8주간 37~38℃ 배양기에서 배양 관찰한다.

3.2.2. 본배양

종균배양에서 발육한 균막을 쿨로버엽상 loop으로 건져서 1,000ml 룩스병 (Roux bottle)에 200ml씩 분주한 D-H 배지의 액면상에 종균배양과 같은 방법으로 조용히 균막을 띄서 이식한 후 37~38℃ 배양기에서 8~10주간 배양한다.

3.2.3. 집균

본 배양 후 오염여부를 확인하여 순수배양된 것을 100℃ 증기압에서 10분간 살균한다. 살균된 균액을 고속원심기로 10,000rpm에서 30분간 원심하여 침전 균체를 집균하고 PBS로 2회 세척 후 소량의 PBS에 부유한다

3.2.4. 항원추출

부유된 균체를 초음파로 30분간 1회 파쇄한 다음 14Ti Rotor를 이용하여 12000rpm에 1시간 원심하여 상청액을 모으고 균체를 다시 PBS에 부유 후 동일한 방법으로 분쇄, 원심 후 상청액을 모은다. 모은 균체 상청액의 부피를 측정하고 1/10 volume되게 40% trichloroacetic acid (w/v in D.W)를 첨가하여 잘 섞은 후 4℃에서 2일간 방치한 후 14Ti Rotor를 이용하여 12,000rpm에 1시간 원심하여 항원을 침전시킨다. 침전된 항원이 부유되지 않도록 조심스럽게 1% TCA를 이용하여 동일한 원심조건으로 2번 원심세척한다. 침전된 항원을 소량의 1/15M PBS에 균질하게 부유시킨 후 다시 12,000rpm에 1시간 원심한 후 상청액을 0.22 μ m filter를 이용하여 여과한 후 thimerosal을 0.01%가 되도록 첨가한다.

3.2.5. 흡착항원제조

*Mycobacterium phlei*를 이용하여 위와 동일한 방법(3.2.1~3.2.3)으로 흡착항원을 제조한다.

3.2.6. 항원농도조절

준비된 항원을 16 μ g/ml부터 1 μ g/ml 되도록 2진 희석하여 U자 plate well에 coating하고 4℃에서 overnight incubation 하고 흡착항원은 1000 μ g/ml부터

2-1-1-03

62.5 μ g/ml 되도록 2진 희석하여 양성 control 및 음성 control 혈청과 반응 시킨다. 음성 control의 OD 값은 0.1 이하로, 양성 control은 0.2 이상이 되는 조건을 찾는다. Spectrophotometer를 이용하여 항원량을 측정 후 항원량을 1400 μ g/ml 되게 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

3.2.6에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 동결 건조 후 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동결 항원은 용해시 무색 투명하고 입자나 이물이 없으며 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가시험

4.4.1. 재료 및 시험

이미 알고있는 표준양성, 의양성, 음성혈청 각 5개 이상씩을 사용한다. 표준품(이미 국가검정에 합격한 것 등)과 같이 1:10으로 희석한 항원으로 간접효소결합면역측정법<별첨>을 실시한다.

4.4.2. 판정

모든 혈청이 이미 알고있는 항체를 나타내어야 하며 반응결과가 표준품과 80% 이상 일치하여야 한다. 또한 양성혈청가를 음성혈청가로 나눈 값이

(P/N.value)이 2.0이상이어야 하며 표준 음성혈청의 반응치는 비특이적으로 높지 않아서 0.3000이상을 초과하여서는 아니된다.

5. 저장 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시액

1) 항원 및 혈청

표준항원과 검사품에 대하여 소 요네병 양성 및 음성혈청을 각각 5개 이상과 가검혈청을 사용한다.(가검혈청은 56℃에서 30분간 비동화하여 사용한다.)

2) ELISA Reader

3) ELISA용 96well flat microplate(Nunc CERT Maxisorp #439454)

4) Bovine serum albumin(B.S.A), fraction V (USB, Cet. No. 10857)

5) 2차 항체 : Anti-bovine IgG HRP- conjugated (KPL, Cat. No. 14-12-06)

6) ABTS(발색제) stock solution (KPL, Cat. No. 50-66-00)

7) 30% H₂O₂

8) Coating Buffer

Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	1.59g
Sodium bicarbonate (Na ₂ CO ₃)	2.93g
Sodium azide (NaN ₃)	0.2g
D.W	1000ml.

반드시 pH를 9.6으로 조정 (멸균 후 4℃ 보관)

9) Tween-PBS(PBST)

PBS 1000ml에 Tween 20을 0.5ml 첨가하여 사용한다.

※ PBS

Sodium chloride (NaCl)	8.5g
Potassium phosphate (KH ₂ PO ₄)	0.22g
Sodium phosphate (Na ₂ HPO ₄)	1.15g
Potassium chloride (KCl)	0.2g
D.W up tp 1000ml	

pH를 7.4으로 조정 (멸균 후 4℃ 보관)

2-1-1-03

10) Blocking buffer

1%(w/v) bovine serum albumin, fraction V in Tween-PBS

11) Serum diluent buffer(흡착항원포함)

M.phlei 150 μ l./ml + 2% BSA in PBST

12) Working substrate solution (1 plate 분량)

Substrate solutions(1)의 용액 0.1ml + **(2)**의 용액 0.25ml + **working citrate buffer** 24.65ml

Note : 혹은 KPL ABTS substrate solution과 peroxidase solution B를 1:1로 섞은 후 100 μ l씩 분주

1) Substrate solutions

(1) 0.5M H₂O₂ stock 용액제조

8M H₂O₂ : H₂O₂ 원액 0.5ml + DW 1ml

0.5 H₂O₂ : 8M H₂O₂ 0.5ml + DW 7.5ml

(2) ABTS stock 용액제조(ABTS : Sigma A1888)

ABTS 0.54g, D.W 25ml(갈색병에 보관하거나 호일로 싸줌)

2) Citrate buffer

(1) Citric acid stock 용액제조 : citric acid 1.92g + D.W 100ml

(2) Na₂HPO₄ stock 용액제조 : Na₂HPO₄ 2.84g + D.W 100ml

※ **Working citrate buffer**(용기는 갈색병 혹은 호일로 싸줌)

(1)의 용액 24.3ml + (2)의 용액 25.7ml + D.W 50ml

pH를 5.0으로 조정 한 다음, 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 멸균

13) Stop solution (1M HCl)

HCl(Conc.) 36.46ml + 963ml D.W

6.2 검사방법

1) ELISA용 항원을 coating buffer로 희석하여 ELISA용 96 well flat microplate (Nunc CERT maxisorp, #439454)에 100 μ l(농도 1 μ g./ml)씩 분주한다.

2) Plate를 4 $^{\circ}$ C에서 overnight incubation한다.

3) 실험에 필요한 Tween-PBS, 혈청희석액 stock solution, ABTS stock solution 등의 시약을 실온에서 2시간 방치한다.

(시약의 equilibration to room temperature)

- 4) 항원을 흡착시킨 Plate를 꺼내어 항원을 털어버린 다음 100 μ l의 PBST를 넣고 titer plate shaker를 이용해 3회 세척한다.
- 5) BSA가 1%(w/v, fraction V, USB#10857)되도록 Tween-PBS에 첨가한 후 각well에 300 μ l씩 분주하여 실온에서 2시간 blocking한다.
- 6) Blocking한 다음 1시간 20분쯤 경과한 후, U plate를 이용해 가검혈청을 혈청 희석액에 20배 희석하여 30분간 흡착[혈청 12 μ l + 혈청 희석액(M. phlei 150 μ l/ml + 2% BSA in PBST)]시킨다.
- 7) Blocking된 plate를 꺼내어 각 Well에 100 μ l씩의 Tween-PBS으로 위의 4번 과정과 동일하게 4회 세척한다.
- 8) U plate에서 흡착된 가검혈청 및 표준 대조혈청(양성, 음성)을 ELISA plate의 각 well에 2반복하여 100 μ l씩 분주한다.
(45 samples, 1 양성, 1음성, 1 blank)
- 9) Plate를 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 10) 4번 과정과 동일하게 4회 세척한다.
- 11) HRP-conjugate(KPL 14-12-06)를 희석액(2% BSA in PBST용액으로 1500배 + 5% normal goat serum)으로 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주한 후, 실온에서 30분 반응시킨다.
- 12) 4번 과정과 동일하게 4회 세척한다.
- 13) Working substrate solution을 각 Well에 100 μ l씩 분주하여 실온에서 5~20분 발색시킨다.(working substrate solution은 첨가 직전에 제조)
주의 : 반응시간은 매번 달라질 수 있으며, 양성이 어느 정도 나오고 음성이 발색 되기 직전, 즉 발색이 끝난 즉시 반응 정지액(Stop solution)을 각 well에 50 μ l씩 분주하여 plate를 2~3회 tapping한다.
- 14) ELISA reader (405~410nm filter)의 전원 공급 및 working sheet를 입력하여 판독 준비를 한다.
- 15) Plate를 ELISA reader로 측정한다.

6.3 판정기준

양성 control 0.2-0.3 음성 control < 0.1로 한다.

음성 control + 0.1은 양성, 음성 control + (0.05~0.1)은 의양성으로 간주한다.

2-1-1-03

<별첨> 간접 효소결합면역측정법(indirect ELISA)

1) 항원희석

항원을(Coating buffer, pH 9.6)(부기3)으로 10배 희석하여 0.1ml씩 F형 마이크로플레이트 각 well에 넣는다.

2) 혈청희석

표준혈청은 이미 알고 있는 항체가가 나올 수 있도록 Tween-PBS(부기4)로 희석하여 0.1ml씩 각 well에 넣는다.

3) HRP-conjugate

Antibovine HRP-conjugate를 희석액(Tween-PBS)으로 2,000~3,000배 희석하여 0.1ml씩을 넣는다.

4) 기질(Substrate)

ABTS를 사용하여 0.1ml씩을 넣는다.

5) 반응정지액(stop solution)

0.5M HCl을 사용하며 0.05ml씩을 넣는다.

6) 시험과정

다음과정에 의하여 실시하며 혈청 당 2반복 이상하여야 하며, 과정 중 세척은 Tween-PBS로 3~4회 한다.

(5℃, 하룻밤)

(37℃, 1시간)

항원부착-----> 세척 후 혈청첨가-----> 세척 후 conjugate 첨가(실온, 30분)-----> 반응정지액 첨가 -----> ELISA 판독기로 405nm에서 측정

<부 기>

부기1. **Modified Löwenstein-Jensen Medium**

Monopotassium phosphate(anhydrous)	2.4mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.24g
Magnesium citrate	0.6g
Asparagine	3.6g
Glycerol (reagent grade)	12.0ml
D.W	600ml
Potato flour	30g
Homogenized whole eggs	1.000ml
Malachite green(2%)	
2% aqueous solution (should be prepared freshly)	20ml
Added Mycobactin	2mg

Dispense 6~8ml of the medium into 20×150mm screw capped tubes.

Inspissate the medium with the tubes in a slanted position at 85°C for 50 minutes with caps loose.

Checked for sterility by incubation at 37°C for 48 hrs.

부기2. **Dorset and Henley medium**

L-Asparagine	9.0g
Sodium citrate	4.5g
K ₂ HPO ₄ -3H ₂ O	9.0g
MgSO ₄ -7H ₂ O	7.5g
Glycerine	500ml
Ferric citrate (scales)	1.5g
Double distilled water	4,750ml
Zinc sulfate-7H ₂ O	50mg
Magnesium chloride-4H ₂ O	12.5mg
Cobalt chloride-6H ₂ O	17.5mg

2-1-1-03

Double distilled water 250ml
autoclave

부기3. Coating buffer

1M NaHCO₃ 50.9ml
1M Na₂CO₃·10H₂O 16.3ml
D.W 933ml

부기4. Tween-PBS

NaCl 8.0g
KH₂PO₄ 0.2g
Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g
KCl 0.2g
NaN₃ 2g
Tween-20 0.5ml
D.W 1,000ml

요네병 보체결합반응 검사용 항원

Johne's Disease Antigen, Complement Fixation Test

1. 정의

요네병균을 액체 배지에 배양하여 그 배양 균체를 초음파 분쇄기로 파쇄하여 만든 항원이며 요네병의 감염항체를 검출하기 위한 보체결합 반응검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis ATCC 19698주 또는 국립수의 과학연구소에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

보존된 균주를 mycobactin를 첨가한 Löwenstein-Jensen(L-J) 배지(부기1)에 이식하여 37℃에서 6~8주 배양한 후 4℃에 보존하며 6개월마다 계대 또는 균액에 보호제를 가하여 동결건조한 후 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Dorset-Henley(D-H)배지(부기2)에 균질하게 자라며 Löwenstein-Jensen 배지 등 고체 배지에 배양 시 mycobactin이 첨가된 배지에서만 자라는 것이 다른 mycobacterium과 구별된다. 균은 다른 mycobacterium 같이 호기성, 항산성 단간균이며 표준한천배지 및 nutrient agar에 7일간 배양하였을 때 균 발육이 없어야한다. 본 균은 소, 양에 주로 감염되며 어린 송아지가 감수성이 가장 높다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Dorset-Henley(D-H)배지(부기2) 또는 이와 동등한 성능을 가진 본 균이 잘 자랄 수 있는 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

Mycobactin을 첨가한 Löwenstein-Jensen 배지(부기1)에 발육된 균을 백금이 (spatula loop)로 따서 D-H 배지를 약 7ml씩 소분한 메카트니병(McCartney bottle)의 벽에 문질러 액상 배지에 균체가 떠서 자라도록 균을 부유시켜

2-1-1-04

37~38℃ 배양기에서 8~10주간 배양하여 균막을 형성시키고 발육 왕성한 균막을 300ml 삼각 플라스크에 100ml씩 분주한 D-H 배지의 액면상에 균막을 이식하여 조용히 띄우고 6~8주간 37~38℃ 배양기에서 배양 관찰한다.

3.2.2. 본배양

종균배양에서 발육한 균막을 클로버엽상 (spatula loop)으로 건져서 1,000ml 룩스병(Roux bottle)에 200ml씩 넣은 D-H배지 액면상에 종균배양과 같은 방법으로 조용히 이식한 후 37~38℃ 부란기에서 8~10주간 배양한다.

3.2.3. 살균 및 집균

8~10주간 본배양후에 잡균오염 유무를 경검 확인하여 오염된 것은 살균 후 버리고 잡균오염이 없는 것은 잘 흔들어서 균막을 배지중에 완전히 가라앉혀 진탕 부유시키고 100℃에서 30분간 살균한다. 살균 된 것은 실온에서 냉각 후 60~80목 동망과 여과지로 여과하여 균체를 수집한다.

3.2.4. 균체처리

수집한 균체의 일정량에 5배(v/w)의 ether를 가하여 1일 2회 진탕하면서 실온에서 15일간 정치 후 3000rpm에서 30분간 원심 침전하고 2배량(v/w)의 acetone를 가하여 30분간 진탕하고 5℃ 냉장고에 12일간 정치 후 3000rpm에서 30분간 침전한다. 침전된 균체(Whole cell)를 37℃부란기에서 건조한 후 건조균을 사용하여 항원을 만든다.

3.2.5. 항원정제(crude lipopolysaccharide antigen, LPS antigen)

균체량(100g) 2배(v/w)의 멸균 증류수(200ml)에 부유하여 원심(8000rpm, 30분간) 세척한 후 침전된 균체를 200ml의 증류수에 재부유하여 세포 파쇄(Cell pressur)기로 균체를 3회 파쇄(20,000ps)하여 부유액을 121℃에서 15분간 멸균한 후 30분간 20micron wave lengths에서 sonication(in rosett flask)한다. 초음파 파쇄된 균 부유액을 15분간 원심(15,000G)분리 후 pellet을 10ml tris-saline buffer(pH8.0)에 재부유하여 다시 30분간 sonication하고 4℃에서 하룻밤 동안 정치한다.

정치 후 상층액을 취하여 thiomorsalate의 농도가 1:10,000되게 첨가하여 항원 역가를 측정하고 농도를 조정한다.

3.2.6. 항원농도조절

정제된 항원은 보체결합 반응의 checker board titration에 의하여 0.5ml 중에 2단위 항원이 함유되도록 0.5% phenol saline으로 항원 농도를 조정하여 -70℃에 보관한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 요네균 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른 수소 이온 농도는 6.4~7.0이어야 한다.

3.3.4. 동정 및 역가시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

표준항원(기존 알고있는 역가의 항원)을 대조로 하고 검사품에 대하여 요네병 강양성, 약양성 및 음성혈청 각각 2종 이상을 사용하며 보체결합반응<별첨> 시험을 실시한다.

3.3.4.2. 판정

시험결과 표준항원의 역가와 일치하여야 하며 음성 혈청에 대한 반응은 음성이어야 한다. 또 검사품은 40 μ l중에 2단위 이상을 함유하고 있으며 4단위에서 항보체 작용이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.3.6에 의하여 조정된 항원 농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물, 이취가 없고 소분용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 시험의 결과 요네병 균 이외의 균이 인정되어서는 아니된다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 페놀 함유량은

2-1-1-04

0.5±0.05%이어야 한다.

4.4. 동정 및 역가시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.5. 아크라프라빈(acriflavine)응집시험

관액에 동량의 500배 희석 acriflavine 수용액을 가하여 37℃에서 18~24시간 감작하여도 응집이 일어나지 않아야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

6개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

1) 혈청

가검혈청은 BBS(barbital buffered saline solution)희석액으로 4배 희석하여 56℃ 30분간 가온 비동화 한다.

2) 항원

보체결합 반응용 항원 40μl를 각 혈청 희석별로 넣는다.

3) 용혈소 및 보체

용혈소와 보체는 본 시험에 2단위를 사용하고, 면양 혈구액은 3%로 하여 사용한다.

4) 본시험

다음 술식에 의하여 실시한다.

well 번호	1	2	3	4	5	대 조			
						1	2	3	4
혈청희석	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/4	-	-	-
혈 청	40μl	40	40	40	40	40	-	-	-
항 원	40μl	40	40	40	40	-	40	-	-
보체(2단위)	40μl	40	40	40	40	40	40	40	-
희석액	-	-	-	-	-	40	40	80	120
37℃ 30분간 감작									
감 작	80μl	80	80	80	80	80	80	80	80
혈구액									
37℃ 1시간 감작 후 4℃ 1야 보존 후 관찰									
판 정									

6.2 판정

가검혈청 16배 희석에서 75%이상 용혈저지를 보이면 양성반응으로 판정하고 32배 또는 32배 이상의 희석에서 100% 용혈저지를 나타내면 양성으로 판정한다.

※ 주의사항

항원은 사용전에 충분히 흔들어서 균등액을 만들어 사용한다.

2-1-1-04

<별첨> 보체결합반응(standardization of CFT antigen)

가. 재료

- 1) Alserver solution(부기3)
- 2) Barbita buffered saline solution(부기4)
- 3) 감작혈구 : 면양혈구(부기5)와 2단위 용소소 용액을 동량 혼합하여 실온에서 30분 이상 감작한 후에 사용한다.
- 4) 보체(Complement)
- 5) 표준항원
- 6) 표준 양성혈청 및 음성혈청(56℃, 30분간 비동화하여 사용한다)

나. 시험

- 1) 용혈소 사용량 측정(hemolysin titration)

Well No.	1	2	3	4	5	6	7	Control		
								8	9	
Hemolysion dil	1/100	1/500	1/1000	1/1500	1/2000	1/2500	1/3000	1/100	-	
Reagente										
Hemolysin	80 μ l	80	80	80	80	80	80	80	-	
SRBC(3%)	80 μ l	80	80	80	80	80	80	80	80	
C'(20 ^x)	80 μ l	80	80	80	80	80	80	-	80	
VBD	-	-	-	-	-	-	-	80	80	
Incubated at 37℃ for 30minutes										
Reading	1	0	0	0	0	0	T	2	4	4
	2	0	0	0	0	0	T	2	4	4

$$2IU = 2,000 \div 2 = 1,000^x$$

- 용혈소는 56℃에 30분간, 비동화 한 것을 사용한다.
- 용혈소는 2단위를 사용한다.

2) 보체사용량 측정(complement titration test)

Well No. Reagente	1	2	3	4	5	Control 6
C' (20 ^x)	20 μ l	40	60	80	-	-
VBD	60 μ l	40	20	-	-	40
Incubation at 37°C for 30minutes						
EA	80 μ l	80	80	80	80	80
Incubation at 37°C for 30minutes						
Reading 1	0	0	0	3	4	4
2	0	0	1	3	4	4

$$2U = 80\mu l \times 20^x / 40\mu l \times 2IU = 20^x$$

- 건강한 기니픽(체중400g이상) 4~5두의 심장에서 채혈하여 1시간 이내에 혈청을 분리해서 사용한다.
- 보체는 완전 용혈한 최소 용혈량을 1단위로 하고 본 시험에서는 2단위를 사용한다.

3) 항원역가측정(checkerboard titration of Johne's disease antigen)

Antiserum(+ve/-ve) 40 μ lAntigen 40 μ lC'(2U) 40 μ l

Incubated at 37°C for 30min

EA 80 μ l

Incubated at 37°C for 30minutes

Well No.	1	2	3	4	5	6	Ag. Control
serum dil	4 ^x	8 ^x	16 ^x	32 ^x	64 ^x	128 ^x	-
Antigen							
원액	4	4	3	3	1	0	
2 ^x	4	3	3	2	0	0	
3 ^x	4	3	T	0	0	0	
4 ^x	3	3	T	0	0	0	
5 ^x	2	2	0	0	0	0	
10 ^x	2	1	0	0	0	0	
93-2	4	3	2	0	0	0	
st	4	4	3	3	2	0	
serum cont.							

$$2U = 1$$

2-1-1-04

4) 항보체 사용시험(anticomplementary activity of paratuberculosis antigen)

Tube No. Reagente	1	2	3	4	5	Control				
						1	2	3	4	
Antigen(2U)	50 μ l	40	30	20	10	40	30	-	-	
VBD	30 μ l	40	50	60	70	80	110	120	80	
C' (2U)	40 μ l	40	40	40	40	-	-	-	40	
Incubate at 37°C for 30minutes										
EA	80	80	80	80	80	80	80	80	80	
Incubate at 37°C for 30minutes										
Reading	1	0	0	0	0	0	4	4	4	0
	2	0	0	0	0	0	4	4	4	0

판정 : 항원은 항보체 작용이 없어야 한다.

5) 항원의 특이성 시험(specific test for paratuberculosis antigen)

Well No. Reagente	1	2	3	4	5	Control			
						1	2	3	
Antigen(2U)	50 μ l	40	30	20	10	-	-	-	
VBD	10	20	30	40	50	60	100	80	
+ve serum(10%)	20	20	20	20	20	20	20	-	
C'	40	40	40	40	40	40	-	40	
Incubated at 37°C 30minutes									
EA	80	80	80	80	80	80	80	80	
Incubated at 37°C 30minutes									
Reading	1	4	4	4	4	4	0	4	0
	2	4	4	4	4	4	0	4	0

6) 항원의 비특이성 시험(non-specific test for paratuberculosis)

Well No. Reagente	1	2	3	4	5	Contol		
						1	2	3
Antigen(2U)	50 μ l	40	30	20	10	-	-	-
VBD	10	20	30	40	50	60	50	40
-ve serum(10 ^x)	20	20	20	20	20	20	20	-
C'	40	40	40	40	40	40	-	40
Incubated at 37°C 30minutes								
EA	80	80	80	80	80	80	80	80
Incubated at 37°C 30minutes								
Reading	1	0	0	0	0	0	4	0
	2	0	0	0	0	0	4	0

7) 본시험(proper test)

serum dil Reagente	1	2	3	4	5	6	7	8	Control serum antigen		
	serum(+/-ve)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	-
antigen(St./Pr.)	40	40	40	40	40	40	40	40	-	40	
C'(2U)	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
VBD	-	-	-	-	-	-	-	-	40	40	
Incubated at 37°C for 30minutes											
EA	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	
Incubated at 37°C for 30minutes											
St.	+ve	4	4	4	4	3	2	1	1	0	0
	-ve	1	T	0	0	0	0	0	0	0	0
Pr.	+ve	4	4	4	3	3	2	1	T	0	0
	-ve	T	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<부 기>

부기1. Löwenstein - Jensen(L-J) 사면배지

Mono potassium phosphate, anhydrous(KH_2PO_4)	2.4g
Magnesium sulfate($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.24g
Magnesium citrate($\text{Mg}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2$)	0.6g
Asparagine	3.6g
Glycerol(Reagent grade)	12ml
D.W	600ml
Potato flour	30gm
Homogenized whole egg	1,000ml
Malachite green(2% Aqueous solution)	20ml

계란은 신선한 것으로 하며 난각파괴전 가-제로 잘 씻어 말린후 각반할 때 2% malachite green을 가하여 각반후 두겹의 멸균 가제로 여과하고 상기 시약을 녹힌 용액과 잘혼합하여 1/2 OZ 맥카트니병(McCattney bottle)에 약 7~8ml씩 분주하여 사면으로 제 1일에 85~90℃ 건열기내에서 50분간 소독하고 제 2일에 다시 80~85℃에서 50분간 소독하고 소독이 끝나면 37℃ 부란기내에서 48시간동안 무균검사를 실시한 후 사용한다.

부기2. Dorset-Henley(D-H) 배지

A. Asparagine	18g
Sodium citrate($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.9g
Potassium phosphate,dibasic($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)	1.8g
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.5g
Glycerol(reagent grade)	100(79.4)ml
Ferric citrate(scales)	0.3g
Ammonium citrate($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7$)	0.3g
D.W	950ml

B. Trace element

Zinc sulfate($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	10mg
Magnesium chloride($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)	2.5mg
Calcium chloride($CaCl_2$)	3.5mg
D.W	50ml

상기 A용액에 B액인 발육인자를 가하여 pH6.8~7.2가 되게 1N(Normal) NaOH나 HCl로 조정하고 여과지로 여과하여 1,000ml 룩스병 (Roux bottle)에 200ml씩 분주하여 15파운드에서 20~30분간 증기고압멸균한 다음 50% 포도당 (50% glucose)용액을 싸이츠(Seitz)여과하여 각 용기마다 4ml씩(배지량의 1/50 v/v) 가해준다.

다음 37℃ 부란기내에서 2~3일간 무균검사를 실시한 후 사용한다.

부기3. Alsever's solution

Glucose	18.66g
Sodium chloride	4.18g
Sodium citrate	8.0g
Citric acid	0.55g
D.W	1000ml

고압멸균(121℃, 15분) 또는 여과멸균(0.22 μ l필터) 한 다음 냉장고에 보관 사용한다.

부기4. Barbital-buffered saline solution(BBS)

1) Stock $MgCl_2$, $CaCl_2$ (0.3M) solution

Magnesium chloride, anhydrous	9.5g
Calcium chloride, anhydrate	3.7g
D.W	100ml

0.22 μ l 필터로 여과하여 냉장보관한다.

2) Barbital sodium stock solution

Sodium chloride	85g
-----------------------	-----

2-1-1-04

Sodium 5,5-diethyl barbiturate(barbital sodium) 3.75g
D.W 1400ml

3) Barbital stock solution

5,5-diethyl barbituric acid(barbital) 5.75g
D.W 500ml

가열된 D.W를 이용하여 완전히 용해시킨다.

4) Concentrated barbital buffer solution(CBBS)

2)의 Stock solution 1400ml

3)의 Stock solution 500ml

1)의 Stock solution 5ml

전체 용량이 2,000ml가 되도록 증류수를 첨가한다.

5) BBS working solution

상기 4)의 CBBS 용액을 차가운 증류수로 5X 희석(pH 7.3~7.4)하여 냉장고에 보관하며 사용한다.(희석용액은 당일 만들어 사용)

부기5. 면양혈구

- 1) 면양혈액을 무균적으로 채취하여 즉시 Alsever's 용액과 혼합하여 아주 천천히 섞음 다음 냉장고에 보관(Alsever's 용액 30ml+면양혈액 15~20ml)한다.
- 2) 정치된 혈액을 일회용 15ml 원심분리관에 4ml정도씩 분주하여 BBS 희석용액을 적당량(9~10ml) 첨가하여 혼합한다.
- 3) 3,000rpm에서 5분간 원심하여 모세피펫을 사용하여 상층액과 buffy coat층을 제거한다.
- 4) BBS 희석용액을 첨가하여 혼합한 다음 3,000rpm에서 5분간 원심하여 상층액과 buffy coat층을 제거하며 이와 같은 방법으로 2회 반복한다.
- 5) BBS 희석용액을 시험관에 15ml씩 첨가하여 잘 혼합한 다음 정확하게 1,000g에서 10분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거한다.
- 6) 침전된 혈구를 사용하여 3% RBC 부유액을 제조한다.

소 브루셀라병 평판응집반응 검사용 항원

Brucella Antigen, Plate Agglutination Test

1. 정의

브루셀라 아보투스(*Brucella abortus*)균을 감자 한천배지에 만든 배양하여 집균하고 살균 후 크리스탈 바이올렛 (crystal violet)와 부릴리언트 그린(brilliant green)으로 염색하여 만든 항원이며 브루셀라병 감염 항체 검출을 위한 평판응집반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Brucella abortus 1119-3균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 항원성이 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

2.3. 성장 및 독력

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

감자 한천배지(1)또는 이와 대등한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

감자 한천배지의 사면에 제조용 균주의 S형 집락을 이식하여 37.5℃에서 48시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

감자 한천배지를 32 OZ배양병(Roux flask)에 적당량(125ml) 분주하여 고압

멸균(15Lb 40분간)한 감자 한천사면에 0.85% NaCl 수용액에 희석된 종균 배양액을 이식하여 37.5℃에서 72시간 배양한다.

3.2.3. 집균 및 살균

잡균 혼입여부를 확인 후 배양병의 응고수를 제거하고 병당 초자구를 넣어 흔들다음 균을 배양한 배양사면에 0.5% 석탄산가 생리적 식염수 10~20ml를 가하고 균부유액을 수집하여 100목 망위에 가제(gauge)와 탈지면으로 여과하여 한천편과 기타 이물을 제거한 다음 100℃에서 45분간 가열살균하고 흐르는 물로서 급냉시킨다. 살균된 균액을 3,000rpm에서 75분간 원심하고 침전된 균을 0.5% 석탄가 생리식염수로 재 부유시키며 이 조작을 2회 반복한다.

3.2.4. 농도조절

호프킨스 백신 시험관(Hopkin's vaccine tube)를 이용하여 2,750rpm 75분간 원심하여 표준항원(11.0% 균액)과 동일한 농도로 조정한다.

3.2.5. 균액염색

조제된 균액 1,000ml에 대하여 crystal violet-brillrant green 염색액(부기2) 6ml을 가하여 잘 혼합한후 멸균 탈지면과 동망으로 여과하여 5℃에서 조용히 각 반하여 균등액이 되게한 다음 냉암소에 7일간 정치한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 브루셀라 균 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한검사에 따라 감자한천배지의 사면과 dextrose andrades broth(부기3)에 균액 0.1ml를 접종하여 37℃에서 7일간 배양검사하여 어떠한 균의 증식도 인정되어서는 안된다.

3.3.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다. 검사품의 수소이온 농도는 6.4~7.0이어야 한다.

3.3.4. 변이시험

3.3.4.1. 산 반응

균액을 생리적 식염수로 맥파랜드(McFarland) 표준혼탁관 No.1의 10배 농

후한 균액에 일치하는 혼탁액의 균액을 만든다. 그의 0.5ml에 동량의 크락크 엔드 러브스(Clark and lubs) 완충액(pH 2.4~6.8)을 가하여 37℃에 18~24시간 감작하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.2. 열 반응

위의 균액을 100℃에서 30분 가열하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.3. 아크라프라빈(Acriflavine) 응집시험

0.1% w/v의 아크라프라빈 수용액에 동량의 검사품을 가하여 37℃에서 18~24시간 감작 후 응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 농도시험

6개의 흡킨스 시험관에 4.8ml의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 검사품을 각각 3개의 시험관에 0.2ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축용액의 농도가 11.0%가 되어야 한다.

3.3.6. 역가시험

브루셀라 양성, 의양성, 음성혈청 20개에 대하여 검사품과 표준품 항원과의 비교시험(평판 응집반응) 결과 양성을 1점, 의양성을 0.5점으로 계산하여 표준항원과의 역가점수차가 ± 3 점 이내이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원 농도를 최종농도로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 청자색의 균등한 균액으로써 이물, 이취가 없고 소분된 용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 방부제 정량시험

2-1-1-05

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 석탄산의 함유량이 $0.5 \pm 0.05\%$ 이어야 한다.

4.5. 농도시험

6개의 흡킨스 시험관에 4.8ml의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 공시품을 각각 3개의 시험관에 0.2ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축 용액의 농도가 11.0%가 되어야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 재료 및 시험

음성으로부터 400배까지의 양성 역가를 가진 20개 이상의 소 혈청으로 표준품 항원과 검사품 항원에 대한 응집반응을 실시하여 그의 성적을 비교한다. 항원과 각 혈청에 대한 응집반응이 양성일 때 1점, 의양성일 때 0.5점으로 계산하여 수치의 총화를 얻는다.

<평 판 응 집 반 응 술 식>

구 별	1	2	3	4	5
혈청량(ml)	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
항원량(ml)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
작용시간	실온에서 4분간 혼합 후 응집 유무를 판독한다.				

4.6.2. 판정

표준품 항원에 대한 검사품 항원의 총 반응 점수차가 ± 3 이내 이어야 한다. 또한 표준품 항원과 검사품 항원에 대한 동일혈청의 역가 차이는 희석배수로서 1/2을 넘지 않아야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

6개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 평판 응집반응 항원은 아래와 같은 방법으로 사용한다.

가검혈청 ml	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
항 원 ml	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
배 수	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400

이상과 같은 요령으로 배수, 희석배수 별로 평판에 가검혈청과 진단액을 혼합하여 4분간 실온(20℃전후)에서 작용시킨 후 응집유무 및 상태를 판독한다.

6.2. 판정

관인예방접종우(official vaccinated)				기 타			
1/50	1/100	1/200	판정	1/50	1/100	1/200	판정
-	-	-	음성	-	-	-	음성
1	-	-	"	1	-	-	의양성
+	-	-	"	+	-	-	"
+	1	-	의양성	+	1	-	"
+	+	-	"	+	+	-	양성
+	+	1	"	+	+	1	"
+	+	+	양성	+	+	+	"

<부 기>

부기1. Potato infusion agar

Potato infusion	1,000ml
Agar	30g
Peptone	10g
Beef extract	5g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Glycerine	20ml

위의 조성성분을 가운용해 후 pH를 6.8~7.2로 조절하여 15Lb에서 30~40분간 고압 멸균한다.

부기2. Crytal violet-brilliant green 염색액

Brilliant green	20g
Crytal violet	10g
D.W	3,000ml

5℃의 냉암소에 보존하면서 사용한다.

부기3. Dextrose andrades broth

Beef infusion	1,000ml
Peptone	10g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Dextrose	10g
Andrades indicator	10ml

위의 조성성분을 가운 용해후 pH를 7.4로 조절하여 100℃에 20분간 3회 멸균한다.

*Andrades indicator

Acid fushin	0.5g
1.0 N NaOH	16.0ml
D.W	100ml

5℃ 냉암소에서 보존하면서 사용한다.

소 브루셀라병 시험관 혈청응집반응 검사용 항원

Brucella Antigen, Tube Agglutination Test

1. 정의

브루셀라 아보투스(*Brucella abortus*)균을 감자 한천 배지에 배양하여 집균하고 살균 후 방부제를 가하여 만든 항원이며 브루셀라병 감염 항체검출을 위한 시험관 응집반응검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Brucella abortus 1119-3균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 항원성이 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

2.3. 성상 및 독력

집락은 난원형이며 S형 집락을 형성한다. S형균 집락을 생리적 식염수에 부유시켜 맥파렌드(McFarland)표준 혼탁관 No.1의 농도액을 만들어 이균액 0.5ml에 500배의 아크리프라빈(acriflavine)수용액 0.5ml를 가하고 37.5℃에서 18~24시간 감작시켜도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

감자 한천배지(1)또는 이와 대등한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

감자 한천배지의 사면에 제조용 균주의 S형 집락을 이식하여 37.5℃에서 48시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

감자 한천배지를 32 OZ배양병(Roux flask)에 적당량(125ml) 분주하여 고압

멸균(15Lb 40분간)한 감자 한천사면에 0.85% NaCl 수용액에 희석된 종균배양액을 이식하여 37.5℃에서 72시간 배양한다.

3.2.3. 집균 및 살균

잡균 혼입여부를 확인 후 배양병의 응고수를 제거하고 병당 초자구를 넣어 흔들다음 균을 배양한 배양사면에 0.5% 석탄산가 생리적 식염수 10~20ml를 가하고 균부유액을 수집하여 100목 망위에 가제(gauge)와 탈지면으로 여과하여 한천편과 기타 이물을 제거한 다음 100℃에서 45분간 가열살균하고 흐르는 물로서 급냉시킨다. 살균된 균액을 3,000rpm에서 75분간 원심하고 침전된 균을 0.5% 석탄가 생리식염수로 재 부유시키며 이 조작을 2회 반복한다.

3.2.4. 농도조절

호프킨스 백신시험관(Hopkin's vaccine tube)를 이용하여 2,750rpm 75분간 원심하여 표준항원(4.5% 균액)과 동일한 농도로 조정하여 4℃에서 7일간 정치한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 브루셀라 균 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한검사에 따라 감자한천배지의 사면과 dextrose andrades broth(부기3)에 균액 0.1ml를 접종하여 37℃에서 7일간 배양검사하여 어떠한 균의 증식도 인정되어서는 안된다.

3.3.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다. 검사품의 수소이온 농도는 6.4~7.0이어야 한다.

3.3.4. 변이시험

3.3.4.1. 산 반응

균액을 생리적 식염수로 맥파랜드(McFarland) 표준혼탁관 No.1의 10배 농후한 균액에 일치하는 혼탁액의 균액을 만든다. 그의 0.5ml에 동량의 크락크 엔드 러브스(Clark and lubs) 완충액(pH 2.4~6.8)을 가하여 37℃에 18~24시간 감작하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.2. 열 반응

위의 균액을 100℃에서 30분 가열하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.3. 아크라프라빈(acriflavine) 응집시험

0.1% w/v의 아크라프라빈 수용액에 동량의 검사품을 가하여 37℃에서 18~24시간 감작 후 응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 농도시험

6개의 Hopkin's vaccine tube 시험관에 증류수 4ml와 검사품 1ml를 넣고 국제적 원심기(모델V)로 2,750rpm에 75분간 원심한 후 6개의 시험관 균체량의 평균을 낸 후 100을 곱한다. 균체농도는 $4.5 \pm 0.45\%$ 이어야 한다.

3.3.6. 역가시험

브루셀라 양성, 의양성, 음성혈청 20개에 대하여 검사품과 표준품 항원과의 비교시험(시험관 응집반응) 결과 양성을 1점, 의양성을 0.5점으로 계산하여 표준항원과의 역가점수차가 ± 3 점 이내이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원 농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물, 이취가 없는 균등한 균액으로 소분된 용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 석탄산의 함유량이 $0.5 \pm 0.05\%$ 이어야 한다.

4.5. 농도시험

2-1-1-06

6개의 흡킨스 시험관에 4.0ml씩의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 검사품을 각각 3개의 시험관에 1.0ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축용액의 농도가 4.5%가 되어야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 재료 및 시험

20개 이상의 양성혈청으로 표준품 항원과 검사품의 응집 반응을 아래와 같이 실시하여 그 성적을 비교한다. 이때 항원의 각혈청에 대한 응집반응이 양성 일때는 1점 의양성일때는 0.5점으로 하여 수치의 총화를 얻는다.

시 험 관 응 집 반 응 술 식

시험관	1	2	3	4	5
혈청량ml	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
항원량ml	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
혈청희석 배수	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400

감작시간 : 37.5℃에서 48(±3)시간

4.6.2. 판정

표준품 항원에 대한 검사품 항원의 총 반응치의 총합이 ±3이내 이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

6개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

시험관 응집반응 항원은 사용전에 0.5% 석탄산가 생리적 식염수로 1:100으로 희석한 항원 부유액을 사용하여 다음 방법 ①②중 하나를 선택하여 반응을 실시한다.

방법①

가검혈청ml	0.16	2	2	2	2
항 원ml	4	2	2	2	2
배 수	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400

방법②

가검혈청ml	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
항 원ml	2	2	2	2	2
배 수	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400

이상과 같은 요령으로 배수 희석 별로 가검혈청과 항원을 혼합하여 37℃에서 48시간 작용시킨 후 반응결과를 판독한다.

6.2. 판정

관인예방접종우(official vaccinated)				기 타			
1/50	1/100	1/200	판정	1/50	1/100	1/200	판정
-	-	-	음성	-	-	-	음성
1	-	-	"	1	-	-	의양성
+	-	-	"	+	-	-	"
+	1	-	의양성	+	1	-	"
+	+	-	"	+	+	-	양성
+	+	1	"	+	+	1	"
+	+	+	양성	+	+	+	"

<부 기>

부기1. Potato infusion agar

Potato infusion	1,000ml
Agar	30g
Peptone	10g
Beef extract	5g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Glycerine	20ml

위의 조성성분을 가온용해 후 pH를 6.8~7.2로 조절하여 15Lb에서 30-40분간 고압 멸균한다.

부기2. Dextrose andrades broth

Beef infusion	1,000ml
Peptone	10g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Dextrose	10g
Andrades indicator	10ml

위의 조성성분을 가온 용해후 pH를 7.4로 조절하여 100℃에 20분간 3회 멸균한다.

*Andrades indicator

Acid fushin	0.5g
1.0 N NaOH	16.0ml
D.W	100ml

5℃ 냉암소에서 보존하면서 사용한다.

소 브루셀라병 우유유회환반응 검사용 항원

Brucella Antigen, Milk Ring Test

1. 정의

브루셀라 아보투스(*Brucella abortus*)균을 감자 한천배지에 배양하여 헤마 톡시린으로 염색하여 만든 항원이며 브루셀라병 감염항체 검출을 위한 우유유회환 반응검사(Milk ring test)에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Brucella abortus 1119-3균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 항원성이 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

2.3. 성장 및 독력

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

감자 한천배지(1)또는 이와 대등한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

감자 한천배지의 사면에 제조용 균주의 S형 집락을 이식하여 37.5℃에서 48시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

감자 한천배지를 32 OZ배양병(Roux flask)에 적당량(125ml) 분주하여 고압 멸균(15Lb 40분간)한 감자 한천사면에 0.85% NaCl 수용액에 희석된 종균배

양액을 이식하여 37.5℃에서 72시간 배양한다.

3.2.3. 집균 및 살균

잡균 혼입여부를 확인한 후 배양병내의 응고수를 제거하고, 한 개의 룩스병당 0.5% dml 석탄산을 가한 생리식염수 10~20ml와 초자구를 넣어 흔든 다음 채균하고, 멸균 탈지면과 동망으로 여과한 후 100℃에서 3시간 가온한 후 식혀 하룻밤 진탕한 다음 2,750rpm에서 75분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, 침전된 균체를 0.5%의 석탄산을 가한 생리식염수에 재부유 시키고 다시 2,750rpm에서 75분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 침전된 균체를 0.5%의 석탄산을 가한 생리식염수에 재부유시켜 5℃에 보관한다.

3.2.4. 균액염색

균액을 2,750rpm에서 75분간 원심하여 침전균을 얻는다. MRT염색액(부기2) 1,000ml에 원심침전균 45g을 넣고 실온에서 48시간 교반하면서 염색한다. 염색되어진 균부유액을 12,000rpm에 30분간 원심 침전시키고 상층액은 버린다. 4,000ml의 세척용액(부기3)을 침전염색균액에 넣고 4시간 교반한 후 12,000ml의 세척용액을 첨가하고 다시 16시간 교반시킨 다음 12,000rpm에 30분간 원심침전 시킨다. 원심침전된 균 1g당 희석액(부기4) 27ml 비율로 가하여 4시간 동안 각반하고 4℃dptj 24시간 정치 시킨다. 멸균 탈지면과 동망으로 여과하여 다시 4℃에 보관한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 브루셀라 균 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따라 감사한천배지의 사면과 dextrose andrades broth(부기3)에 균액 0.1ml를 접종하여 37℃에서 7일간 배양검사하여 어떠한 균의 증식도 인정되어서는 안된다.

3.3.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다. 검사품의 수소이온 농도는 6.4~7.0이어야 한다.

3.3.4. 변이시험

3.3.4.1. 산 반응

균액을 생리적 식염수로 맥파렌드(McFarland) 표준혼탁관 No.1의 10배 농후한 균액에 일치하는 혼탁액의 균액을 만든다. 그의 0.5ml에 동량의 크락크 엔드 러브스(Clark and lubs) 완충액(pH 2.4~6.8)을 가하여 37℃에 18~24시간 감작하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.2. 열 반응

위의 균액을 100℃에서 30분 가열하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.3. 아크라프라빈(acriflavine) 응집시험

0.1% w/v의 아크라프라빈 수용액에 동량의 검사품을 가하여 37℃에서 18~24시간 감작 후 응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 농도시험

6개의 흡킨스 튜브에 각각 증류수 4ml를 넣고 염색 세척되어진 부류셀라균 항원 1ml를 각각 흡킨스 튜브에 첨가하여 2,750rpm에서 75분간 원심한 후 균의 용량이 4%되게 조정한다.

3.3.6. 역가시험

브루셀라 양성, 의양성, 음성혈청 20개에 대하여 검사품과 표준품 항원과의 비교시험(평균 응집반응) 결과 양성을 1점, 의양성을 0.5점으로 계산하여 표준항원과의 역가점수차가 ± 3 점 이내이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원 농도를 최종농도로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 암자색의 현탁액이며 이물, 이취가 없고 소분된 용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

2-1-1-07

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-7에 의한 검사에 따라 페놀 함유량은 $0.5 \pm 0.05\%$ 이어야 한다.

4.5. 농도시험

6개의 흡킨스 시험관에 4.8ml의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 검사품을 각각 3개의 시험관에 0.2ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축 용액의 농도가 11.0%가 되어야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 재료 및 시험

음성으로부터 400배까지의 역가를 가진 20개의 소혈청을 우유 9ml에 혈청 1ml씩을 넣고 계단 희석하고 각각 희석된 우유를 시험관에 1ml씩 분주한 후 표준진단액과 공시품을 0.03ml씩 넣고 시험을 실시하여 성적을 비교한다.

우유유회환 반응 술식

구 별	1	2	3	4	5
혈청희석배수	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400
혈 청 량(ml)	0.08	0.04	0.02	0.01	0.005
항 원 량(ml)	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03

진단액의 각 혈청에 대한 반응이 양성일 때 1점, 의양성일때 0.5점으로 하여 수치의 총합을 얻는다.

4.6.2. 판정

표준품 항원에 대한 검사품 반응 차이의 총합이 ± 3 이내 이어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

6개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

숙성시킨 우유와 우유유회환 반응검사용 진단액은 실온에서 1시간 정도 방치한 다음

숙성시킨 우유 1ml와 진단액 30ml를 4부 시험관에 넣고 잘 혼합하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 판정한다.

6.2. 판정

우유크림층과 하층의 색깔로 판정한다.

판정		크림층	하층
음 성	-	백 색	청 색
의양성	±	약청색	크림층과 같은 청색
양 성	+	청 색	크림층보다 약간 연한 청색
양 성	++	청 색	아주 연한 청색
양 성	+++	청 색	백 색

<부 기>

부기1. Potato infusion agar

Potato infusion	1,000ml
Agar	30g
Peptone	10g
Beef extract	5g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Glycerine	20ml

위의 조성성분을 가온용해 후 pH를 6.8~7.2로 조절하여 15Lb에서 30-40분간 고압 멸균한다.

부기2. M.R.T(milk ring test)용 염색액

A. 용액

D.W	1,000ml
$AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$	90g
Glycerine	300ml

90℃로 가열시켜 녹인다음 Glycerine 300ml를 가함

B. 용액

Haematoxylin	19g
95% alcohol	100ml
D.W	900ml

50~60℃로 가열시켜 녹인다음 증류수로 1000ml를 가함

C. 용액

Sodium Iodate($NaIO_3$)	2g
D.W	20ml

90℃로 가열시켜 녹임

D. 용액

$\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 940g

D.W 5,000ml

90℃로 가운 후 D.W to 전체량이 9,400ml

E. 용액

NaOH 10g

D.W 100ml

1) A, B, C 용액을 혼합한 후 30분간 정치

산화반응이 계속 색의 변화로서 일어남

최종색은 “concord grape” purple색

2) “D”용액과 1)혼합용액을 혼합하고 “E”용액으로 pH3.0로 조정한다.

3) 위의 혼합 조정된 용액을 45~90일간 어두운 곳에서 숙성시킨다.

사용하기전에 진탕에 의해 혼합하고 불용성물질과 침전물을 여과한다.

부기3. 세척용액

NaCl 64g

Lactic acid 15ml

10% NaOH 44ml

D.W 16,000ml

부기4. 희석액

A. 용액

D.W 500ml

Citric acid 96g

B. 용액

D.W 500ml

Na_2HPO_4 35.8g

C. 용액

0.5% phenol saline 8,000ml

A용액 21ml와 B용액 8ml를 C용액에 혼합하여 pH 4.0으로 조정한다.

소 브루셀라병 로즈벵갈 검사용 항원

Brucella Antigen, Rose Bengal Test

1. 정의

브루셀라 아보투스(*Brucella abortus*)균을 감자 한천배지에 배양하여 집균하고 살균한 후 균 부유액에 색소를 가하여 만든 항원이며 브루셀라 감염 항체를 검출하기 위한 로즈벵갈(Rose bengal test) 평판응집 반응검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Brucella abortus 1119-3균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 항원성이 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

2.3. 성상 및 독력

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

감자 한천배지(1)또는 이와 대등한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

감자 한천배지의 사면에 제조용 균주의 S형 집락을 이식하여 37.5℃에서 48시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

감자 한천배지를 32 OZ배양병(Roux flask)에 적당량(125ml) 분주하여 고압 멸균(15Lb 40분간)한 감자 한천사면에 0.85% NaCl 수용액에 희석된 종균배

양액을 이식하여 37.5℃에서 72시간 배양한다.

3.2.3. 집균 및 살균

잡균 혼합여부를 확인한 후 배양병내의 응고수와 이식 종균액을 제거하고 룩스병당 0.5% 석탄산을 가한 생리식염수 10~20ml와 초자구를 넣어 흔든 다음 채균하고 멸균 탈지면과 동망으로 여과한 후 100℃에서 1시간 가열한 후 식혀 하룻밤 진탕한 다음 10,000rpm에서 40분간 원심침전하고 침전된 균액을 재 부유시켜 이 조작을 2회 반복한다.

3.2.4. 균액염색

원심하여 집균한 균을 0.5% phenol saline으로 균농도를 4.5%되게 부유하여 부유액 35ml에 rose bengal염색액(부기2)을 1ml 가하여 2시간 동안 염색하고 10,000rpm으로 40분간 원심하여 집균액 1g당 buffered diluent(부기3)를 2ml 가하여 2시간 동안 교반한다.

염색균액에 buffered diluent를 가하여 균농도가 8% pH가 3.65±0.5 되게 조정 한 후 탈지면과 동망으로 여과하여 4℃에 보관한다.

3.2.5. 농도조절

흡킨스 튜브에 진단액 0.5ml과 식염수 4.5ml를 혼합하여 2750rpm에서 75분간 원심하여 표준항원농도(8%)와 동일한 농도로 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 브루셀라 균 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한검사에 따라 감자한천배지(부기1)의 사면과 dextrose andrades broth(부기4)에 균액 0.1ml를 접종하여 37℃에서 7일간 배양검사하여 어떠한 균의 증식도 인정되어서는 안된다.

3.3.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다. 검사품의 수소 이온 농도는 6.4~7.0이어야 한다.

3.3.4. 변이시험

3.3.4.1. 산 반응

2-1-1-08

균액을 생리적 식염수로 맥파렌드(McFarland) 표준혼탁관 No.1의 10배 농후한 균액에 일치하는 혼탁액의 균액을 만든다. 그의 0.5ml에 동량의 크락크 엔드 리브스(Clark and lubs) 완충액(pH 2.4~6.8)을 가하여 37℃에 18~24시간 감작하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.2. 열 반응

위의 균액을 100℃에서 30분 가열하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.3. 아크라프라빈(acriflavine) 응집시험

0.1% w/v의 아크라프라빈 수용액에 동량의 검사품을 가하여 37℃에서 18~24시간 감작 후 응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 농도시험

6개의 흡킨스 시험관에 4.8ml의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 검사품을 각각 3개의 시험관에 0.2ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축용액의 농도가 11.0%가 되어야 한다.

3.3.6. 역가시험

브루셀라 양성, 의양성, 음성혈청 20개에 대하여 검사품과 표준품 항원과의 비교시험(평균 응집반응) 결과 양성을 1점, 의양성을 0.5점으로 계산하여 표준항원과의 역가점수차가 ± 3 점 이내이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5.에 의하여 조정된 항원 농도를 최종농도로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 청자색의 균등한 균액으로써 이물, 이취가 없고 소분된 용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 브루셀라 균 이외의 세균이 없어야 한다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한검사에 따라 감자한천배지(부기1)

의 사면과 dextrose andrades broth(부기4)에 균액 0.1ml를 접종하여 37℃에서 7일간 배양검사하여 어떠한 균의 증식도 인정되어서는 안된다.

4.4. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법Ⅳ-7에 의한 검사에 따라 석탄산의 함유량이 $0.5 \pm 0.05\%$ 이어야 한다.

4.5. 농도시험

6개의 흡킨스 시험관에 4.8ml의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 검사품을 각각 3개의 시험관에 0.2ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축 용액의 농도가 8.0%가 되어야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 재료 및 시험

음성으로부터 양성까지의 역가를 가진 20개 이상의 소 혈청으로 표준진단액과 검사품의 평판응집반응을 실시하여 그 성적을 비교한다. 가검혈청 0.03ml와 동량의 진단액을 평판 위에 떨어뜨린 후 충분히 혼합하여 실온에서 4분간 반응시킨 후 응집유무를 판독한다.

4.6.2. 판정

표준품에 대한 검사품의 총반응(20개)은 모두 일치하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

6개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 비동화(56℃, 30분)한 가검혈청과 로즈벵갈 평판용 진단액은 실온에 1시간 정도 방치한 다음 사용한다.
- 2) 응집반응용 평판에 가검혈청 및 진단액을 섞이지 않게 각각 30 μ l씩 분주한다.
- 3) 유리막대로 잘 혼합한 후 4분 동안 잘 흔들어서 반응시킨 후에 즉시 응집상을 판독한다.
- 4) 표준 양성혈청과 표준 음성혈청을 대조군으로 사용해야 한다.

6.2. 판정

응집이 일어나면 양성, 응집이 일어나지 않을 경우 음성으로 판정한다.

* 유의사항

진단액은 얼리지 말 것

개 브루셀라에는 적용하지 않음

<부 기>

부기1. Potato infusion agar

Potato infusion	1,000ml
Agar	30g
Peptone	10g
Beef extract	5g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Glycerine	20ml

위의 조성성분을 가온용해 후 pH를 6.8~7.2로 조절하여 15Lb에서 30-40분간 고압 멸균한다.

부기2. Rose bengal 염색액

Rose bengal	4g
Sterile D.W	386ml

부기3. Buffered diluent

A. Sodium hydroxide	120g
0.5% phenol saline 2,000ml	
B. Lactic acid	540ml
C. 0.5% phenol saline	6,000ml

A,B,C를 혼합한 후 pH를 3.65±0.5로 조정

부기4. Alsever's solution

Glucose	18.66g
Sodium chloride	4.18g
Sodium citrate	8.0g
Citric acid	0.55g
D.W	1000ml

고압멸균(121℃, 15분) 또는 여과멸균(0.22 μ m필터) 한 다음 냉장고에 보관 사용한다.

소 브루셀라병 보체결합반응 검사용 항원

Brucella Antigen, Complement Fixation Test

1. 정의

브루셀라 아보투스(*Brucella abortus*)균 부유액에 페놀을 가하여 만든 항원이며 브루셀라병 감염항체를 검출하기 위한 보체결합반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Brucella abortus 1119-3균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 항원성이 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

2.3. 성장 및 독력

균주는 감자 한천사면배지(potato infusion agar)(부기1)에 이식 하여서 37.5℃ 부란기 내에서 48시간 배양한 균을 동결건조하여 4℃이하의 냉암소에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에 1회 계대하여야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

감자 한천배지(1)또는 이와 대등한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

감자 한천배지의 사면에 제조용 균주의 S형 집락을 이식하여 37.5℃에서 48시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

감자 한천배지를 32 OZ배양병(Roux flask)에 적당량(125ml) 분주하여 고압 멸균(15Lb 40분간)한 감자 한천사면에 0.85% NaCl 수용액에 희석된 종균 배양액을 이식하여 37.5℃에서 72시간 배양한다.

3.2.3. 집균 및 살균

잡균 혼입여부를 확인 후 배양병의 응고수를 제거하고 병당 초자구를 넣어 흔든다음 균을 배양한 배양사면에 0.5% 석탄산가 생리적 식염수 10~20ml를 가하고 균부유액을 수집하여 100목 망위에 가제(gauge)와 탈지면으로 여과하여 한천편과 기타 이물을 제거한 다음 100℃에서 45분간 가열살균하고 흐르는 물로서 급냉시킨다. 살균된 균액을 3,000rpm에서 75분간 원심하고 침전된 균을 0.5% 석탄가 생리식염수로 재 부유시키며 이 조작을 2회 반복한다.

3.2.4. 항원 농도조절

호프킨스 백신 시험관(Hopkin's vaccine tube)를 이용하여 2,750rpm 75분간 원심하여 표준항원(4.5% 균액)과 동일한 농도로 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 브루셀라 균 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한검사에 따라 감자한천배지(부기1)의 사면과 dextrose andrades broth(부기3)에 균액 0.1ml를 접종하여 37℃에서 7일간 배양검사하여 어떠한 균의 증식도 인정되어서는 안된다.

3.3.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다. 검사품의 수소이온 농도는 6.4~7.0이어야 한다.

3.3.4. 변이시험

3.3.4.1. 산 반응

균액을 생리적 식염수로 맥파렌드(McFarland) 표준혼탁관 No.1의 10배 농후한 균액에 일치하는 혼탁액의 균액을 만든다. 그의 0.5ml에 동량의 크락크 엔드 러브스(Clark and lubs) 완충액(pH 2.4~6.8)을 가하여 37℃에 18~24시간 감작하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.2. 열 반응

위의 균액을 100℃에서 30분 가열하여도 균응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.4.3. 아크라프라빈(acriflavine) 응집시험

0.1% w/v의 아크라프라빈 수용액에 동량의 검사품을 가하여 37°C에서 18~24시간 감작 후 응집이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 농도시험

6개의 흡킨스 시험관에 4.8ml의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 검사품을 각각 3개의 시험관에 0.2ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축용액의 농도가 11.0%가 되어야 한다.

3.3.6. 역가시험

브루셀라 양성, 의양성, 음성혈청 20개에 대하여 검사품과 표준품 항원과의 비교시험(평판 응집반응) 결과 양성을 1점, 의양성을 0.5점으로 계산하여 표준항원과의 역가점수차가 ± 3 점 이내이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원 농도를 최종농도로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물, 이취가 없는 균등한 균액으로 소분된 용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 브루셀라 균 이외의 세균이 없어야 한다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한검사에 따라 감자한천배지(부기1)의 사면과 dextrose andrades broth(부기3)에 균액 0.1ml를 접종하여 37°C에서 7일간 배양검사하여 어떠한 균의 증식도 인정되어서는 안된다.

4.4. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법IV-7에 의한검사에 따라 석탄산의 함유량이 $0.5 \pm 0.05\%$ 이어야 한다.

4.5. 농도시험

6개의 Hopkin's vaccine 시험관에 4.0ml씩의 증류수를 각각 붓고 표준품 및 검사품을 각각 3개의 시험관에 1.0ml씩 첨가한 후 2,750rpm에서 75분간 원심분리한다. 농축용액의 농도가 4.5%가 되어야 한다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 재료 및 시험

보체결합반응용 항원을 사용전에 barbital buffer saline solution(부기5)으로 1:200배 희석하여 사용하며 가검혈청을 1:5부터 1:80까지 배수희석하여 25 μ l를 U형 마이크로플레이트에 넣고 동량의 보체결합반응용 진단액 및 1.25단위 보체를 가하여 혼합한 뒤 37.5 $^{\circ}$ C 항온기에서 30분 동안 작용시킨다. 4단위 용혈소와 3% 면양 적혈구를 15분간 감작시킨 후 50 μ l씩 각 마이크로플레이트에 첨가하여 충분히 혼합한 다음 37.5 $^{\circ}$ C에서 30분간 작용시킨 후 판정한다. 단 이러한 방법은 시험관에서도 사용할 수 있다.

4.6.2. 판정

브루셀라 양성, 의양성, 음성혈청 20예에 대하여 조제된 진단액과 표준 진단액과의 비교시험 결과 양성을 1점, 의양성을 0.5점으로 계산하여 수치의 총합을 얻는다. 표준품과 검정품의 총 반응치의 차이가 ± 3 점 이내이어야 한다.

혈청희석배수				판정	
5	10	20	40	독우예방접종우	기 타 우
+	+	+	+	양 성	양 성
+	+	+	+/-	의양성	양 성
+	+	+	-	의양성	양 성
+	+	-	-	의양성	의양성
+	-	-	-	음 성	음 성

+ : 50%이상 용혈억제, +/- : 25%~50% 용혈억제, - : 25% 이하 용혈억제

4.7. 아크라프라빈(Acridlavine) 응집시험

균액에 동량의 500배 희석 acridlavine 수용액을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 감작하여도 응집이 일어나지 않아야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

6개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 소 브루셀라 보체결합반응 검사용 항원, 표준 양성혈청, 표준 음성혈청 및 alsever's solution(부기4), barbital-buffered saline solution(BBS)(부기5), 면양혈구(부기6), 보체를 사용한다.
- 2) Hemolysin titration(Round bottom 96 well plate)
 - ① Hemolysin 100배 및 200배 희석액 제조
Hemolysin 0.1ml + BBS 9.9ml(100X)
Hemolysin 0.05ml + BBS 9.95ml(200X)
 - ② Complement 20배 희석액 제조
원액보체 0.1ml + BBS 1.9ml
 - ③ Hemolysin titration (100배와 200배를 동시에 실시)

well번호 구분	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BBS	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Hemolysin (100X 및 200X)	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Complement	80	80	80	80	80	80	80	80	80
RBC(3%)	80	80	80	80	80	80	80	80	80

- ④ 37℃ 30분간 감작(Shaking)시킨 다음 판정한다.(하룻밤 냉장고 정치 또는 1840g 4분 원심 후 판정이 가장 정확함)
- ⑤ CF 본 시험에서는 hemolysin 4 Unit을 사용함.

※ 4 Unit의 계산법

(Exact unit가 hemolysin 200X 희석액의 30 μ l일 때)

$\Rightarrow 100/200 \times 30/80 \times 4 = 0.76\% \Rightarrow$ Hemolysin 0.76ml + BBS 99.24ml

\Rightarrow Hemolysin 1ml + BBS 131ml \Rightarrow 0.1ml + 13.1ml

3) Complement titration

- ① 각 희석배수의 보체 제조(10X, 15X, 20X)

2-1-1-09

10배의 희석보체 ⇒ 보체 0.1ml + BBS 0.9ml

15배의 희석보체 ⇒ 보체 0.1ml + BBS 1.4ml

20배의 희석보체 ⇒ 보체 0.05ml + BBS 0.95ml

② Hemolysin 4 unit의 제조

③ Complement titration(10X, 15X, 20X를 동시에 실시)

well번호 구분	1	2	3	4	5	6	7	8	9
BBS	0	10	20	30	40	50	60	70	80
Complement (10X, 15X, 20X)	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Hemolysin(4Unit)	80	80	80	80	80	80	80	80	80
RBC(3%)	80	80	80	80	80	80	80	80	80

④ 37℃ 30분간 감작시킨 다음 판정(하룻밤 냉장고 정치 또는 1840g 4분 원심 후 판정이 가장 정확함)

⑤ CF 분 시험에서는 complement 1.25Unit을 사용함.

※ Complement 1.25unit의 계산법

(Exact unit가 complement 10X 희석액중의 40μl일 때)

⇒ $100/10 \times 40/80 \times 1.25 = 6.25\%$ ⇒ Complement 6.25ml+BBS 93.75ml

⇒ Complement 1ml+BBS 15ml

4) 보체결합반응용 항원을 사용전에 BBS로 1:200배 희석하여 사용하며, 보체는 비동화(56℃, 30분)하여 사용한다.

5) 아래와 같이 U-form 96well 플레이트에 14개의 시료를 검사할 수 있다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	시료1					시료9					혈 청	보 체
B	2					10						

2-1-1-09

Well 번호	1	2	3	4	5
혈청희석배수	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
혈청	25	25	25	25	25
항원	25	25	25	25	25
보체(1.25U)	25	25	25	25	25
37°C에서 30분간 감작					
감작혈구(4U)	50	50	50	50	50
37°C에서 30분 감작 후 4°C에서 하룻밤 보존 후 관찰					

6.2. 판정

50%이상 용혈이 억제되었을 때 (+)로, 25%~50% 용혈이 억제되었을 때 (±)로, 25%이하 용혈이 억제되었을 때 (-)로 판정한다.

혈청희석배수				판정	
5X	10X	20X	40X	브루셀라 아보터스 19형 예방접종 송아지	기타소
+	+	+	+	양 성	양 성
+	+	+	±	의양성	양 성
+	+	+	-	의양성	양 성
+	+	-	-	의양성	의양성
+	-	-	-	음 성	음 성

※ 유의사항

항원은 사용전에 충분히 흔들어서 균등액을 만들어 사용할 것
4°C에 보관하고 절대 얼리지 말 것

<부 기>**부기1. Potato infusion agar**

Potato infusion	1,000ml
Agar	30g
Peptone	10g
Beef extract	5g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Glycerine	20ml

위의 조성성분을 가온용해 후 pH를 6.8~7.2로 조절하여 15Lb에서 30-40분간 고압 멸균한다.

부기2. Crytal violet-brilliant green 염색액

Brilliant green	20g
Crytal violet	10g
D.W	3,000ml

5℃의 냉암소에 보존하면서 사용한다.

부기3. Dextrose andrades broth

Beef infusion	1,000ml
Peptone	10g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Dextrose	10g
Andrades indicator	10ml

위의 조성성분을 가온 용해후 pH를 7.4로 조절하여 100℃에 20분간 3회 멸균한다.

부기4. Alsever's solution

Glucose	18.66g
Sodium chloride	4.18g

2-1-1-09

Sodium citrate	8.0g
Citric acid	0.55g
D.W	1000ml

고압멸균(121℃, 15분) 또는 여과멸균(0.22 μ m필터) 한 다음 냉장고에 보관 사용한다.

부기5. Barbital-buffered saline solution(BBS)

1) Stock MgCl₂, CaCl₂(0.3M) solution

Magnesium chloride, anhydrous	9.5g
Calcium chloride, anhydrate	3.7g
D.W	100ml

0.22 μ m 필터로 여과하여 냉장보관한다.

2) Barbital sodium stock solution

Sodium chloride	85g
Sodium 5,5-diethyl barbiturate(barbital sodium)	3.75g
D.W	1400ml

3) Barbital stock solution

5,5-diethyl barbituric acid(Barbital)	5.75g
D.W	500ml

가열된 D.W를 이용하여 완전히 용해시킨다.

4) Concentrated barbital buffer solution(CBBS)

2)의 stock solution	1400ml
3)의 stock solution	500ml
1)의 stock solution	5ml

전체 용량이 2,000ml가 되도록 증류수를 첨가한다.

5) BBS working solution

상기 4)의 CBBS 용액을 차가운 증류수로 5X 희석(pH 7.3~7.4)하여 냉장고에 보관하며 사용한다(희석용액은 당일 만들어 사용).

부기6. 면양혈구

- 1) 면양혈액을 무균적으로 채취하여 즉시 alsever's 용액과 혼합하여 아주 천천히 섞음 다음 냉장고에 보관(Alsever's 용액 30ml+면양혈액 15~20ml)한다.
- 2) 정치된 혈액을 일회용 15ml 원심분리관에 4ml정도씩 분주하여 BBS 희석용액을 적당량(9~10ml) 첨가하여 혼합한다.
- 3) 3,000rpm에서 5분간 원심하여 모세피펫을 사용하여 상층액과 buffy coat층을 제거한다.
- 4) BBS 희석용액을 첨가하여 혼합한 다음 3,000rpm에서 5분간 원심하여 상층액과 buffy coat층을 제거하며 이와 같은 방법으로 2회 반복한다.
- 5) BBS 희석용액을 시험관에 15ml씩 첨가하여 잘 혼합한 다음 정확하게 1,000g에서 10분간 원심분리 시킨 후 상층액을 제거한다.
- 6) 침전된 혈구를 사용하여 3% RBC 부유액을 제조한다.

우폐역 보체결합반응 검사용 항원

Cotagious Bovine Pleuropneumonia Antigen, Complement Fixation Test

1. 정의

우폐역균을 배양하여 만든 사균 부유액의 항원이며 우폐역에 대한 항체검출을 위한 보체결합반응검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Mycoplasma mycoides V₅주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

10% 말혈청을 첨가한 우폐역균 배지(부기1)에 접종한 후 37℃에서 5~7일간 배양한 것을 동결건조하여 4℃이하에서 보존하며 1년마다 계대한다.

2.3. 성상 및 독력

10% 말혈청을 첨가한 한천평판배지에 우폐역균을 배양하여 집락이 유두형(nipple-like center)을 나타내고 그람 음성균이며 혈액배지상에서 알파 용혈을 일으킨다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

PPLO broth를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

동결건조된 종균을 PPLO broth에 접종하여 37℃에서 3~5일간 배양한 후 PPLO agar 평판상에 이식하여 4~5일간 배양하여 *Mycoplasma mycoides* V₅ 집락을 선발하여 다시 PPLO broth에 접종하여 37℃에서 5~7일간 배양한 것을 종균으로 사용한다.

3.2.2. 본배양

10% 말혈청이 첨가된 우폐역균 배지에 종균배양액을 배지량의 약 1/30량을 접종하여 37℃에서 7~10일간 배양한다.

3.2.3. 집균

배양된 균액을 6,000rpm에서 30분간 원심침전하여 집균하고 균체는 원배지량의 약 1/20량의 0.15M saline으로 부유시킨다.

3.2.4. 불활화

균 부유액을 100℃에서 10분간 가열 살균한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균검사

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 동정 및 역가시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

이미 알고 있는 역가의 항원을 대조로 하고 검사품에 대하여 우폐역 강양성, 약양성 및 음성혈청 각각 2개 이상을 사용하여 보체결합반응<별첨>을 실시한다.

3.3.3.2. 판정

양성혈청은 이미 알고있는 역가와 일치하여야 하며 음성혈청에 대한 반응은 음성이어야 한다. 또한 검사품은 0.1ml중에 2단위를 함유하고 있으며 4단위에서 항보체 작용이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

살균이 끝난 균부유액을 보체결합반응의 checkerboard 희석에 의하여 0.1ml중에 2단위 항원이 함유되도록 0.5%석탄산가 0.15M saline으로 희석한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물, 이취가 없고 소분용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

2-1-1-10

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 시험의 결과 마이코플라즈마 이외의 균이 인정되어서는 아니된다.

4.3. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 페놀 함유량은 $0.5 \pm 0.05\%$ 이어야 한다.

4.4. 동정 및 역가시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 보체결합반응

1) 용혈소 사용량 측정

용혈소는 56°C 30분간 비동화하여 2단위를 사용하며 용혈소를 veronal buffer saline에 희석한다. 각 용혈소 희석액과 20배 희석한 보체, 그리고 2.5%면양혈액을 각각 0.5ml씩 넣은 후 37°C 에서 1시간 반응시킨 후 용혈소 단위를 측정한다.

2) 보체 사용량 측정

건강한 기니픽 4~5수(체중 400g이상)의 심장에서 채혈하여 1시간 이내에 혈청을 분리해서 사용량을 측정한다. 보체는 완전 용혈을 나타낸 희석배수를 최소용혈량의 1단위로 하고 본시험에는 2단위를 사용한다.

3) 항원역가측정

항원은 각 희석별로 0.1ml를 사용하고 용혈소, 보체는 각각 2단위 사용하여 각 시험관마다 0.5ml씩 넣는다. 강양성혈청, 약양성혈청, 음성혈청을 각각 2종 이상 희석별로 0.5ml을 사용하고 면양혈구량은 2.5%를 0.5ml 사용한다.

6.2. 동정시험

1) 항보체성 시험

항원, 용혈소, 보체는 각각 2단위를 사용한다. 완전용혈량이 항원량 0.2ml이상이어야 하고 항원을 넣지 않는 대조는 완전용혈을 나타내야 한다.

2) 비특이성 시험

완전용혈이 항원실량의 0.2ml이상에서 나타나고 대조는 완전용혈 또는 완

전용혈방지를 나타내야한다.

3) 특이성 시험

항원실량 0.05ml이하는 완전용혈방지를 나타내고 대조는 완전용혈 또는 완전용혈방지를 나타내야한다.

6.3. 본시험

<별첨 4)항>

6.4. 판정

1) 가검혈청 0.05ml~0.02ml(혈청희석 20~50배)이하의 양에서 완전 혹은 계단적으로 혈구가 남을 시는 양성반응으로 인정한다.

2) 가검혈청 0.1ml(혈청희석 10배)에서 용혈이 저지되면 의양성으로 인정한다.

* 주의

- 보체와 혈구액은 항상 신선한 것으로 사용한다.
- 가검혈청은 투명하고 비동화(56℃에서 30분)한 것을 사용한다.

<별첨>보체결합반응

1) 감작혈구

2.5% 면양혈구액과 2단위 용혈소용액을 동량 혼합하여 사용한다.

2) 가검혈청은 56℃, 30분간 비동화하여 사용한다.

3) 희석액은 veronal buffer saline(부기2)을 사용한다.

4) 본시험

시험관번호	1	2	3	4	5	대조			
						1	2	3	4
혈청희석	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/10			
희석액	-	0.5)\	0.5)\	0.5)\	0.5)\	0.1)\	0.5	0.6	1.1
혈청(1/10)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-
항원	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	-	0.1	-	-
보체	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-
감작	37℃ 30분간								
감작혈구	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
가온	37℃ 30분간								
판정	하룻밤 4~5℃에 보존 후 육안으로 용혈저지도 판정								

5) 반응의 관찰과 판정

보통광선에서 용혈도를 판정하며 25%용혈저지가 인정된 것을 종말가로 한다.

6) 항보체성 시험

항원, 용혈소, 보체는 각각 2단위를 사용한다.

7) 판정

완전 용혈량의 항원 실량이 0.2ml 이상이어야 하고 대조 1,2 및 3은 완전 용혈저지를 나타내고 4는 완전용혈을 나타내어야 한다.

시험관번호	1	2	3	4	5	대조			
						1	2	3	4
항원	0.25	0.2	0.15	0.1	0.05	0.2	0.05	-	-
희석액	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.9	1.05	1.1	0.6
보체	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	-	-	-	0.5
감작	37°C 30분간								
감작혈구	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
감작	37°C 30분간								

<부 기>

부기1. 우폐역 배지

Beef infusion	1,000ml
Pepton	10.0gm
Yeast extract	1.0gm
Sodium chloride	5.0gm
Horse serum	100.0ml

용액을 pH7.6이 되도록 조정하고 0.45um filter에 여과하여 사용한다.

부기2. Veronal buffer saline

Sodium chloride	42.5g
Diethyl barbituric acid	2.875g
Sodium diethyl barbiturate	1.845g
Magnesium sulphate 7H ₂ O	1.018g
Calcium chloride	0.147g
D.W	1,000ml

Buffer는 냉장고에 보존하고 사용 시 0.1%되게 gelatin를 첨가하고 1:4로 비율로 증류수를 가하여 사용한다.

탄저 가열 침강반응 검사용 항혈청

Anthrax Antiserum, Precipitation Test

1. 정의

탄저 약독균주인 제2묘주로 토끼에 고도 면역시킨 혈청에 방부제를 가하여 만든 담홍색의 투명한 혈청이며 탄저 진단을 위한 가열침강반응검사(thermo-precipitation test, Ascoli test)에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

탄저균 제2묘주(육균) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

균주는 2년 간격으로 보통한천 배지에 배양, 계대하며 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

그람(Gram) 양성의 간균이고 운동성이 없다.

마우스(15g), 기니픽(250~300g), 토끼(2kg), 산양(25~30kg)의 피하에 0.2ml 씩 접종(산양은 피내주사) 하였을 때 마우스는 100%, 기니픽은 50% 이상 폐사하고 토끼, 산양은 전부 내과생존 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료 및 동물

중조한천배지(부기1) 및 토끼를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 항원생산

3.2.1.1. 종균배양

한천평판상의 한 개 집락을 선정하여 중조한천배지 사면에 이식하여 37℃에서 5% CO₂분압에 24~48시간 배양한다.

3.2.1.2. 본배양

종균배양을 한 균을 중조한천배지에 이식하여 37℃배양기에서 24~48시간

배양한다.

3.2.2.3. 집균

배양상태 및 잡균의 혼입 유무 등을 확인한 후 배양병 내의 응고수를 제거하고 10% 포르말린 생리식염수와 멸균 초사구를 가하여 집균한다. 집균된 원액의 한천편과 이물을 제거하기 위하여 멸균가제를 놓은 100목 동망에서 여과한 균액을 37℃ 진탕항온수조에서 2시간 반응시켜 18~24시간, 4℃ 냉장고에 정치한다.

3.2.3.4. 항원농도조절

집균된 균액을 3,000rpm에서 30분간 원심침전하여 세척한 다음 침전된 균체에 0.5% 포르말린 생리식염수를 가하여 최종농도 60mg(wet weight)/ml로 조절하여, 4℃의 냉장고에 보존하며 토끼접종용 항원으로 사용한다.

3.2.3. 항혈청 생산

3.2.3.1. 동물접종 및 혈청분리

체중 2.0~2.5kg의 건강한 토끼를 사용하며 항원을 토끼의 이정맥내에 4일간격으로 0.5ml, 1.0ml, 2.0ml, 4.0ml, 5.0ml씩 접종하고 최종접종일로 부터 7일경에 무균적으로 전 채혈한다. 채혈된 혈액을 4℃ 냉장고에 18~24시간 정치하여 혈청을 분리하고 침전물을 제거하기 위해 3,000rpm, 30분간 원심분리하여 상층액을 회수하고 무균적으로 0.45 μ m필터로 여과하여 4℃에 보존한다.

3.2.3.2. 혈청농도조절 및 방부제 처리

3.3.3의 혈청역가 시험결과에 의하여 침강원과의 반응이 3,200배 이상 되도록 조절하고 방부제로 치메로살(Merthiolate)를 0.01% 되게 가한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 혈청 역가시험

3.3.3.1. 침강원 제조

탄저균 제2묘주를 중조한천배지에 심고 37℃에서 18~24시간 배양하고

배지의 응고수를 제거한 후 집균하여 생리식염수로 균등한 부유액을 만든다. 이것을 120℃에서 1시간 동안 멸균한 다음 건조시켜 균분으로 보존한다.

3.3.3.2. 침강원 농도조절

균분을 생리식염수로 100배 희석하여 부유시키고 37℃에서 24시간 방치한 후 3,000rpm으로 20분간 원심하여 투명한 상층액을 100배 항원액으로 사용한다.

3.3.3.3. 혈청 반응시험(항원과 혈청의 중층법)

2진법으로 배수희석한 침강원과 혈청을 중층하여 실온에서 반응시킨다. 무라다시험관 또는 그와 같은 정도의 시험관에 5~10mm의 높이까지 혈청을 주입한 다음 희석된 침강원을 시험관 선단의 관벽을 따라 혈청과 거의 같은 양을 서서히 넣어 중층시킨 후 혈청과 침강원의 접촉면에 백색륜을 확인한다.

3.3.3.4. 판정

항원과 혈청의 접촉면에 3분 이내에 백색륜이 생기는 것을 양성으로 판정하며 3,200배 이상의 침강원까지 양성반응을 나타내어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 혈청농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 담홍색의 맑은 혈청으로 시일이 경과함에 따라 약간의 침전이 인정된다. 이물 또는 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 탄저 또는 탄저로 의심되는 가축의 비장, 간장 또는 혈액 1~2g을 유발에 갈아서 멸균식염수를 5배 가하여 유재화하여 시험관에 옮긴다.
- 2) 시험관을 100℃ 항온수조에 넣어 20~30분간 증탕한 다음 급냉시켜 석면 또는 여과지에 여과하여 황색의 투명한 액을 침강원으로 사용하여 3.3.3과 같은 방법으로 반응시켜 백색륜을 확인한다.

6.2. 판정

중층 후 수분 내에 항혈청과 시료의 침강원과의 접촉면에 백색륜이 생길 때 양성으로 판정한다.

* 유의사항

보존 중 침전물이 생길 경우 원심분리하여 상층액을 사용하며 사용 시 거품이 생기지 않도록 주의한다.

<부 기>

부기1. 중조한천 배지

Nutrient broth	8g
Yeast extract	3g
Glucose	5g
Agar	30g
D.W	1,000ml

고압멸균하여 배지가 굳기 전에 무균적으로 7% sodium bicarbonate(중조액)을 100ml를 첨가하여 잘 혼합한 다음 배지를 분주한다.

렙토스피라 현미경 응집반응 검사용 항원

Leptospira Antigen, Microscopic Agglutination Lysis Test

1. 정의

렙토스피라 캐니콜라 등 4종의 주요 혈청형의 균을 배양하여 얻은 항원이며 이를 직접 이용하여 암시야 현미경하에서 렙토스피라 감염의 혈중 항체를 검출하기 위한 응집 용균반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

렙토스피라의 주요 혈청형인 *Leptospira canicola*, *Leptospira hardjo*, *Leptospira pomona*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* 균주의 4종 또는 국립수의 과학검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Leptospira 증균용 배지(부기1)의 15ml 캡 시험관(Cap tube)에 자라고 있는 렙토스피라 균주를 0.2~0.3ml를 취하여 1~2개월에 한 번씩 새로운 계대 보존용 배지(부기2)에 접종하여 28℃의 항온실에서 배양, 보존하며 4주 간격으로 계대배양하고 6개월에 1회씩 실험동물에 통과시켜 균 활력을 유지한다.

2.3. 성상 및 독력

암시야 장치 현미경으로 균을 검사하면 나선형이며 균체의 양끝은 갈고리 모양으로 구부러져 있거나 회전, 사행운동을 한다. 생후 1~4년 된 개에 감염발병이 쉬우며 뇨에서 균이 검출, 배양된다. 56℃에서 20분 안에 사멸되며 동물체 밖에서는 오래 생존하지 못한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

Leptospira 증균용 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 증균배양

증균배양은 계대 보존용 배지인 semisolid agar(부기2)에서 배양되고 있는 균주 중 맑고 선명한 라인을 형성한 균주를 선택하여 200~300 μ l를 취하고

증균용 배지에 접종하여 28℃ 항온실에 1주일간 배양한다.

3.2.2. 본배양

증균배양 1주일 후 균의 활력과 숫자를 암시야 현미경으로 확인하고, 의뢰 시료수에 맞게 증균용 배지에 다시 접종하여 PBS(부기3)으로 항원 농도를 조절한다.

3.2.3. 항원농도 조절

증균용 배지에 배양중인 균액을 마이크로 피펫(micro pipet)을 이용하여 20 μ l을 취하고, 슬라이드글라스(slide glass)와 커버글라스(cover glass)를 이용하여 암시야 현미경으로 확인하여야 한다. 균수 확인은 한 시야 당 300~500 마리 2×10^8 개/ml정도 되어야 한다. 적절한 항원 농도의 판정은 표준 양성 및 음성 혈청과 응집용균 반응여부를 비교하여 균의 활력, 생존 균수로 판정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 동정 및 역가시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

레프트스피라 표준 양성(혈청역가 100배 이상 양성) 및 음성 혈청을 이용하여 항원의 응집 용균반응 여부를 암시야 현미경하에 검사한다.

3.3.2.2. 판정

양성(혈청역가 100배 이상 양성) 혈청에서는 응집반응이 일어나고 음성 혈청에서는 응집반응이 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

2-1-1-12

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 균 배양액의 육안적 관찰시 균등한 현탁액으로서 이물, 이취가 없고 소분된 용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다. 또한 순수 배양시 semisolid가 있는 시험관 배지의 성상이 매우 맑고 투명하며, 배지 부분과 균이 자라고 있는 부분에 선명한 라인이 형성된다.

4.3. 동정 및 역가시험

3.2.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

28℃의 항온실에 보존하며, 제조완료일로 부터 1주일간 유효하다.

6. 사용 방법

6.1. 혈청응집반응 시험

1. 혈청은 PBS(부기3)을 사용하여 12.5배로 희석한다.
2. 96 well plate에 1번 well를 제외한 well에 인산완충식염액을 25ul씩 분주한다.
3. 1번, 2번 well에 12.5배로 희석된 시료를 25 μ l을 넣은 후 2번 well부터 단계 희석한다.
4. 항원은 균의 활력이나 숫자(2×10^8 개/ml)를 암시야 현미경을 이용하여 확인 후 사용한다.
5. 희석이 완료된 각 well에 항원을 25 μ l씩 접종한다.
6. 접종 후 혼합하여 28℃ 항온기에 2시간 동안 감작시킨다.
7. 암시야 현미경으로 양성 및 음성 혈청에 대한 균 활력, 숫자의 차이를 확인한다.
8. 시료검사의 판정은 암시야 현미경으로 균활력 및 생존한 균 숫자의 차이로 아래와 같이 실시한다.

6.2. 판정 (숫자의 변화)

- Leptospira 균이 음성(negative) 혈청과 같다
- + Leptospira 균이 음성(negative) 혈청 대비 75% 생존
- ++ Leptospira 균이 음성(negative) 혈청 대비 50% 생존
- +++ Leptospira 균이 음성(negative) 혈청 대비 25% 생존
- ++++ Leptospira 균이 양성(positive) 혈청과 같다.

<부 기>

부기1. *Lepospira* 증균용 배지

<i>Lepospira</i> medium base, EMJH	2.3g
증류수(Distilled water)	900ml
15Lb에 15분간 고압 멸균후	
<i>Lepospira</i> enrichment, EMJH	100ml
첨가 50ml 시험관에 25ml씩 분주해서 사용한다.	

부기2. *Lepospira* 계대 보존용 배지 (semisolid agar)

<i>Lepospira</i> EMJH	2.3g
Agar	2g
D.W	900ml
15Lb에 15분간 고압 멸균후	
<i>Lepospira</i> enrichment, EMJH	100ml
첨가, 15ml 캡 시험관에 7ml 씩 분주 후 37℃ 항온병에서 7일간 무균시험 확인 후 사용한다.	

부기3. 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Nacl	8g
KCl	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
D.W	1,000ml

소 생식기 캄필로박터감염증 시험관응집반응 검사용 항원

Bovine Genital Campylobacteriosis Antigen, Tube Agglutination Test

1. 정의

Campylobacter fetus subspecies *venerealis*균을 혈액한천배지 또는 캄필로박터 선택배지에 배양하여 균 부유액을 불활화하여 만든 항원이며 소 생식기 캄필로박터감염항체를 검출하기 위한 시험관응집반응검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Campylobacter fetus subspecies *venerealis*균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Campylobacter fetus subspecies *venerealis*인 표준균주를 혈액한천배지에 도말하여 캔들자에 *Campylobacter* gas pak(for 3.0~3.5 liter jars)을 넣고, 37°C에서 3일 이상 배양하며, 배양된 균은 무균상태에서 수집하여 균액과 혈액의 비율을 1:1로 첨가하여 -70°C 냉동상태에서 보존하며, 6개월 간격으로 균의 생존 여부를 확인하여 균을 지속적으로 유지한다.

2.3. 성상 및 독력

캄필로박터균은 아포를 생성하지 않는 그람음성의 간균이며 만곡형의 S자 또는 나선형을 나타내며, 극성편모를 갖고 있어 운동성을 나타낸다. 또한, catalase(+), oxidase(+). 및 hippurate(+) 시험 등의 생화학적 시험을 통하여 균 성상을 확인한다.

면양이나 소에 감염되면 유산을 일으킬 수 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

5% 혈액한천배지 또는 시판되는 캄필로박터 선택배지(Skirrow selective medium 등)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균 배양

보존하고 있는 종균을 혈액한천배지에 접종하여 캔들자에 *Campylobacter gas pak*(for 3.0~3.5 liter jars)을 넣고, 37°C 항온실에서 3일 이상 배양한다.

3.2.2. 본배양

종균을 배양한 후 균의 성상을 확인하고, 특이집락을 선택하여 혈액한천평판배지에 이식하고 배양기를 캔들자에 *Campylobacter gas pak*(for 3.0~3.5 liter jars)을 넣고, 37°C 항온실에서 3일 이상 배양한다.

3.2.3. 불활화

균이 배양된 혈액한천평판배지에 포르말린(3~4%)을 가한 멸균된 생리식염수용액을 10ml씩 넣고 균을 불활화 시킨다.

3.2.4. 집균

불활화 된 균액을 멸균면봉을 이용하여 균을 수집하여 균액을 파이펫으로 50ml 원심튜브에 모은 후 2,500rpm에서 25분 동안 원심하고 침전된 균체를 3회 반복하여 원심 세척하고 세척이 완료된 균체를 집균한다.

3.2.5. 항원농도조절

집균된 균체량을 측정하고, 포르말린(3~4%)을 가한 생리식염수로 균 부유액이 전체량의 0.3%(v/v)정도 되도록 항원농도를 조절한 후 *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*의 표준양성 및 음성혈청을 사용하여 시험관응집 반응여부를 비교실시하고 항체역가를 측정한다. 표준음성혈청은 시험관응집 반응이 일어나지 않고 표준양성혈청은 혈청응집가가 400배 이상 되도록 항원 농도를 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 동정 및 역가시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

Campylobacter fetus subspecies *venerealis* 표준 양성 (혈청역가 400배 이상 양성) 및 음성 혈청을 이용하여 항원의 응집반응 여부를 검사한다.

2-1-1-13

3.3.3.2. 판정

표준양성혈청에서는 응집반응(혈청역가 400배 이상 양성)이 일어나고
표준음성혈청에서는 응집반응이 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여
봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 이물, 이취가 없고
소분된 용기마다 성상이 균일해야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 동정 및 역가시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

6개월간 유효하다.

6. 사용 방법

6.1. 혈청시험관응집반응 시험

- 1) 검사 시료(혈청) 당 4부 시험관을 6개씩 준비한다.
- 2) 첫번째 시험관을 제외한 모든 시험관에 생리식염수 0.5ml을 분주한다.
- 3) 첫번째 시험관에 생리식염수 0.96ml(960 μ l)과 가검 혈청 0.04ml(40 μ l)을 넣어
서 교반기로 혼합한다.
- 4) 1ml 피펫을 이용하여 1번째 시험관에서 희석된 용액(혈청) 0.5ml를 취하여 다
음 시험관으로 옮기고 다시 혼합한 후 같은 방법으로 6번째 시험관까지 단계
적으로 희석한다.(25배, 50배, 100배, 200배, 400배, 800배).
- 5) 혈청희석이 완료된 시험관에는 *Campylobacter* 항원을 각 시험관에 0.5ml씩
넣고 37 $^{\circ}$ C 항온실에서 18시간 동안 반응시킨다.

6) 시험관 아래쪽 부분의 응집된 정도(pin point)와 배지의 맑음 정도 유무에 의해서 양성 여부를 판정하며, 판정시기는 항온실에서 18시간 반응 후 1차 판정하고, 5℃ 냉장 상태에서 18시간 동안 보관한 다음 최종 판정을 실시한다.

<시험관 반응 술식>

시험관 번호	1	2	3	4	5	6	비고
식염수	0.96ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	
혈청(가검혈청, 대조양성 및 음성혈청)	0.04ml	→0.5ml	→0.5ml	→0.5ml	→0.5ml	→0.5ml	→0.5ml 버림
혈청희석배수	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	
항원	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	

6.2. 판정

가검혈청은 희석배수 400배 이상에서 응집되었을 때 소 생식기 캄필로박터감염증 양성으로 판정한다.

대조표준양성혈청은 400배 이상이어야 하며 대조음성혈청은 응집반응이 일어나지 않아야 한다.

* 유의사항

- 진단액이 오염되지 않도록 관리한다.
- 반드시 양성 및 음성 혈청을 대조군으로 사용하여 실험을 수행한다.
- 시료 희석과 표준 균주를 분주할 때 무균적으로 실시한다.
- 시험관을 비롯하여 모든 기구는 멸균해서 사용하고, 시험관은 마개를 사용하여 밀봉시키도록 한다.

소 백혈병 한천겔 면역확산반응 검사용 항원

Enzootic Bovine Leukosis Antigen, Agar Gel Immunodiffusion Test

1. 정의

소 백혈병 바이러스(Retrovirus)가 영구적으로 감염된 면양태아콩팥세포주를 증식용 배지에 배양하여 바이러스의 glycoprotein gp51을 추출하고 농축 조제한 항원이며 소 백혈병 바이러스의 감염항체를 검출하기 위한 한천겔면역확산 반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 바이러스(세포)

2.1. 바이러스주(세포주)

소 백혈병 바이러스가 영구적으로 감염(bovine leukemia virus persistently infected)된 면양태아 콩팥세포(fetal lamb kidney cell, FLK)주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

소백혈병 바이러스가 영구적으로 감염된 FLK 세포주를 $1\sim 2\times 10^6$ /ml 농도로 세포증식용 배지를 첨가하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후 7일 후에 trypsin 용액(부기3)을 이용하여 세포를 수집하고 이를 -70°C에서 하룻밤 얼린 후 액체 질소에 동결보존한다.

2.3. 성장 및 독력

세포는 통상 $1\sim 2\times 10^6$ /ml 의 세포 농도가가 유지되게 계대보존 되어야 하며 타 바이러스의 혼입여부를 확인하여 소 백혈병 바이러스가 감염된 순수한 세포인가를 확인한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

FLK 세포주를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

FLK세포주를 세포증식용 배지를 첨가하여 37℃에서 3~4일간 배양한 후 trypsin 용액(부기2)을 이용하여 1 : 3의 비율로 계대배양 한다.

3.2.2. 바이러스 수확

세포배양 3~4일째에 배양 상층액을 수확한다. 수확한 상층액은 3000rpm에서 30분간 원심하고 상층액을 zine acetate 방법으로 50~100정도 농축시킨다. 바이러스 농축액에 1M zine acetate을 적정량 넣고 난후 1N NaOH로 pH 7.0~7.5로 맞춘다. 4℃에서 1000g 30~40분 동안 원심 후 상층액은 제거하고 침전물(pellet)은 포화 disodium EDTA 용액에 녹인다. 다시 4℃에서 1000g 20분 동안 원심하여 상층액만 모아둔다. 이 상층액을 투석막에 넣어 4℃에서 3일 동안 PBS(부기3)에서 투석시킨다. 투석한 액을 원액으로 하며 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20℃이하의 냉장고에 보존한다.

3.2.3. 항원농도 조절

항원을 원액검사의 역가시험 결과에 의하여 항원가를 최종 희석배수의 2배 이상이 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 역가시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

검사품을 인산완충염식염액으로 2배수 단계별 희석하여 표준 양성혈청으로 면역확산반응(agar gel immuno diffusion test, AGID)을 실시하여 항원의 역가를 조절한다. 한천평판(부기4)에 겔 펀치를 이용하여 원둘레에 6개의 구멍을 뚫고 그 원의 중심에 1개의 구멍을 뚫고 중앙의 구멍에 검사품 항원 25 μ l를 넣고 주위의 대각 2구멍에 표준양성혈청을, 나머지 2구멍에 표준 음성혈청을 각각 25 μ l씩 넣는다. 수분이 충분히 있는 실온에서 72시간 동안 반응시킨 후 결과를 판독한다.

3.3.3.2. 판정

2-1-2-01

검사품의 항원역가는 최종 희석배수 2배 이상에서 양성반응을 나타내야 하며 항원을 넣은 구멍과 표준양성혈청을 넣은 구멍 중앙부위에 띠가 형성되고 표준 음성혈청을 넣은 구멍사이에는 띠가 형성되지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 적갈색의 부유액으로 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

3.3.3에 의한 검사에 따라 실시하며 표준항원과 표준 혈청간에는 띠를 이루고 표준 음성혈청간에는 띠가 형성되지 아니한 상태에서 표준 항원과 가검 혈청간에 띠를 이루면 양성으로 판정한다.

* 유의사항

비특이적으로 띠를 이루는 경우가 있다. 그러나 표준 양성혈청과 표준항원 사이에 부드러운 곡선형 형태의 띠를 이루면 양성이지만 비특이적인 반응은 판정기준과 다르게 서로 교차하여 x표 형태의 띠를 이룰 때에는 재시험을 실시하거나 표준항원 및 항체에 대한 정밀여부를 검사한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

α-MEM용해액	77%
Fetal calf serum	10%
T.P.B 29.5% solution.	10%
Streptomycin 50mg solution	1%
Penicillin 20,000IU solution	1%
증조7% 액	1%

부기2. TV액 (trypsin-versense solution)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
Dextrose	1.0g
NaHCO ₃	0.058g
Trypsin(1:250)	0.5g
EDTA	0.2g
D.W	1,000ml

부기3. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml

부기4. 한천평판(0.7% agar plate)

Noble agar	7g
Borate-NaCl buffer (pH 8.6)	1,000ml

2-1-2-01

* Borate-NaCl buffer

Sodium hydroxide(NaOH)	2g
Sodium chloride(NaCl)	70g
Boric acid(H ₃ BO ₃)	9g

10% NaOH로 pH 8.6으로 조절한 다음 최종 증류수를 가하여 1,000ml가 되도록 한다.

소간질 진단액

Fasciola hepatica Antigen

1. 정의

소 간질충체로부터 단백성분을 화학적으로 정제추출하여 만든 피내 반응용 항원이며 소 간질 진단에 사용한다.

2. 제조용충체

2.1. 충체

소간질충(*Fasciola hepatica*)

2.2. 채집

간질에 감염된 소간장의 담관으로부터 채집된 신선한 소간질충체를 사용한다.

2.3. 성상

성숙한 소 간질 충체의 크기는 13~30mm정도이며 회갈색을 띄고 간에 기생하여 질병을 일으킨다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

채취된 충체를 흐르는 물로 세조하여 부착물을 제거하고 멸균된 생리식염수로 4~5회 세조한 소 간질 충체를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 충체유제

소 간질 충체를 멸균된 생리식염수로 20% 유제액을 만들고 3,000rpm에서 20~30분간 원심하여 상청액을 채취한다.

3.2.2. 유제액의 염석 및 투석

20% 유제원심상청액에 암모니움 설페이트(ammonium sulfate) 포화액을 동량 가하여 2~3회 염석을 반복하고 침전물을 암모니움 설페이트가 없어질 때까지 투석한다.

3.2.3. 항원농도조절

투석액을 농축한 다음 멸균한 인산완충식염수(부기1)로 최초의 암모니움 설페이트에 의한 침출물의 320~640배 량이 되도록 희석하여 세균여과기로 여과하고 여기에

2-1-3-01

머치올레트(merthiolate)를 1/10,000이하가 되도록 가한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 비특이 반응시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

체중 350~400g의 건강한 기니픽 3마리의 배측부 피내에 검사품의 항원 0.2ml씩을 접종하고 15~30분 후와 24시간 후의 반응을 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

관찰 결과 항원에 의한 이상반응이 인정되지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 연한 담황백색의 투명액으로 이물과 이취가 없고 소분된 용기의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 균이 인정되지 않아야 한다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 안전시험

체중 350~400g의 건강한 기니픽(guinea pig) 3마리의 복강 내에 검사품인 항원 0.1ml씩을 주사하고 9~10일간의 관찰기간 중 이상이 없어야 한다.

4.5. 비특이 반응시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

검사품의 항원 0.2ml를 15마리 이상의 소의 미근부 추벽부 피내에 주사하고 15~30분간 종창의 크기를 측정한다. 종창의 직경이 15mm이상 되는 양성소 5마리와 10mm이하 되는 음성소 5마리를 선정 부검하여 간장으로부터 간질충체 또는 간질증의 특징적인 병변이 양성소에서 80%이상, 음성소에서는 20% 이하이어야 한다

5. 저장법 및 유효기간

7개월간 유효하다.

6. 사용방법

소 간질을 진단하기 위해 진단액 0.2ml를 소 미근부추벽의 피내에 주사하고 15~30분 후에 종창의 직경이 15mm이상은 양성, 10mm이하를 음성, 양성 및 음성이 아닌 것을 위양성으로 한다.

2-1-3-01

<부 기>

부기1. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Na ₂ HPO ₄	1.45g
KH ₂ PO ₄	0.2g
NaCl	8g
KCl	0.2g
D.W	1,000ml

상기 용액을 가열멸균 하여 사용한다(PH 7.4).

소 바베시아 간접형광항체 검사용 항원

Bovine Babesiosis Antigen, Indirect Fluorescent Antibody Test

1. 정의

바베시아 원충을 소에 감염시켜 감염된 소의 혈액을 채취하여 슬라이드 글라스에 도말하여 고정시켜 만든 항원이며 간접형광항체법을 이용하여 바베시아의 감염 항체검사에 사용한다.

2. 제조용 원충

2.1 원충주

국립수의과학검역원에서 계대중인 바베시아 원충(*Babesia ovata*)에 감염된 소의 혈액 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바베시아원충을 사용한다.

2.2 계대 및 보존

건강한 송아지의 비장을 적출한 후 바베시아 원충(감염율:2~5%)에 감염된 소의 혈액 10ml정도를 송아지의 정맥과 피하에 감염시켜 계대하며, 원충은 액체질소에 보관할 수 있다.

2.3. 성상 및 독력

바베시아 원충의 형태는 원형 내지 서양배 모양을 하며, 척추동물의 적혈구 내에서 기생하여 적혈구 내 무성생식으로 증가하며 2개, 4개 혹은 2개 이상의 색소가 없는 아메바 모양의 충체를 생산한다. 대형종은 길이 3 μ m이상, 소형종은 2~5 μ m 이하의 길이를 가진다. 진드기에 의해 매개되며 적혈구 내에 기생한 결과 발열, 빈혈, 황달 및 혈색소 뇨증을 일으킨다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

바베시아에 감염된 소의 혈액, 바베시아의 표준 양성혈청 및 표준 음성혈청, PBS(부기1), ice cold acetone 및 슬라이드 글라스를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 원충접종

비장을 적출한 건강한 송아지의 경정맥 또는 피하에 바베시아 원충(감염율:2~5%) 감염혈액 5ml를 접종하고 1주일 후에 재접종 한다.

2-1-3-02

3.2.2. 원충수확

재접종 2~3주 후에 채혈하여 감염율이 2~5%(혈액도말 표본을 검사하여 바베시아 원충수가 시야당 5개 이상)정도일 때 항응고제를 처리하여 채혈한다.

3.2.3. 항원정제(원충감염 혈구세척)

채혈한 혈액을 혈액량의 5~10배 정도의 PBS를 가하여 2000rpm에서 10분간 원심하여 혈구를 3회 이상 반복 세척한다.

3.2.4. 항원(원충감염혈구)농도조절

원심세척한 혈구는 1% bovine serum albumin이 첨가된 PBS로 혈구의 양이 15%(v/v)되게 재부유시킨다.

3.2.5. 항원흡착(도말표본작성)

항원(바베시아 원충이 감염된 혈구)을 슬라이드 글라스 전반에 고루 퍼지도록 얇게 도포, 풍건한 후 ice cold acetone으로 5~10분간 건조 시킨다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 특이성시험

3.3.1.1. 재료 및 시험

<별첨>의 방법에 따라 실시한다.

3.3.1.2. 판정

표준양성혈청은 적혈구 내에 특이 형광을 나타내는 황록색의 바베시아 원충이 관찰 되어야 하며 표준 음성혈청 및 식염수 대조군에서는 특이 형광을 나타내지 않아야 한다.

3.3.3. 역가시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

<별첨>의 방법에 따라 실시한다.

3.3.3.2. 판정

표준 양성혈청과 음성혈청의 차이가 명확하여야 하며 200배 희석된 표준 양성혈청에서도 특이 형광을 나타내어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원을 최종원액(혈액 슬라이드 도말표본)으로 한다.

3.5. 포장 및 보관

고정된 항원 슬라이드 글라스(혈액 도말표본)을 포장하여 -20℃에 보관한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

포장된 slide glass는 바베시아원충에 감염된 적혈구가 얇게 도말된 slide로 성상이 균일하고 이물질이 없어야 한다.

4.2. 역가시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 냉동고에 보관하여야 하며, 1년간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 진단용 slide를 냉동고로부터 꺼내 실온에 적응시킨다.
- 2) Oil pen 등을 이용하여 필요한 수만큼 구획을 만든다.
- 3) 가검혈청을 1:100으로 희석하여 각 구획에 떨어뜨린 후 37℃에서 1-2시간 반응시킨다. 이때 가검혈청이 마르지 않도록 주의한다.
- 4) PBS로 3회 반복 10분간 세척한다.
- 5) FITC anti-bovine conjugate (1:400)를 각 구획에 떨어뜨린 후 37℃에서 1시간 반응시킨다. 이때 가검혈청이 마르지 않도록 주의한다.
- 6) PBS로 3회 반복 10분간 세척한 후 FA mounting buffer를 떨어뜨린다.
- 7) 형광현미경으로 관찰한다.

6.2. 판정

형광현미경으로 관찰하여 표준 양성혈청 및 양성가검혈청은 적혈구내에 황록색의 바베시아 원충이 관찰되며(양성), 표준 음성혈청 및 음성가검혈청은 특이 형광을 나타내지 않는다(음성).

2-1-3-02

<별첨> 특이성 시험

- 1) 바베시아 원충이 감염된 혈액 표본 슬라이드 글라스에 oil pen등을 이용하여 구획을 만든다.
- 2) 바베시아 감염 표준 양성혈청(1:200희석), 표준 음성혈청과 식염수를 각 구획에 떨어뜨린 후 37℃에서 1~2시간 반응시킨다.
- 3) PBS로 3회 반복 10분간 세척한다.
- 4) FITC anti-bovine conjugate(1:400)를 각 구획에 떨어뜨린 후 37℃에서 1시간 반응시킨다.
- 5) PBS로 3회 반복 10분간 세척한 후 FA mounting buffer를 떨어뜨린다.
- 6) 형광 현미경으로 관찰한다.

<부 기>

부기1. PBS(posphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml
Streptomycin	2mg/ml
Penicillin	500unit/ml
Kanamysin	200unit/ml

소 네오스포라 간접형광항체 검사용 항원

Bovine Neosporosis Antigen, Indirect Fluorescent Antibody Test

1. 정의

Neospora caninum tachyzoite를 세포배양하여 만든 항원을 슬라이드 글라스에 흡착시킨 것으로 간접형광항체반응 검사법에 의한 소 네오스포라 감염항체 검사에 사용한다.

2. 제조용 원충

2.1. 원충주

Neospora caninum 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 원충주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Vero cell 배양세포에 *Neospora caninum*을 접종하여 37℃(5% CO₂)배양기에서 2~3일간 배양한 후 감염 배양액을 수확하여 액체질소에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

*Neospora caninum*은 동물에 감염되면 증식형원충(tachyzoite)과 조직포낭(Tissue cyst)의 두 가지 형태를 취하며 소, 개, 양, 산양 및 사슴 등에 자연 감염되며 그리고 마우스, 랫드, 개, 여우, 고양이, 돼지, 토끼, 원숭이에서 실험적으로 감염된다. 감염된 소의 경우 임신 3개월부터 분만 전까지 다양한 임신일령에 유산, 사산 등을 일으킨다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

Vero cell을 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

Vero cell 5ml(10^{50} 개/ml)를 175cm² culture flask에 접종한후 세포증식용 배지 50ml을 가하고 37°C(5% CO₂)배양기에서 7~10시간 배양한다.

3.2.2. 원충배양

배양세포가 70%이상 세포단층이 형성되었을 때 세포 증식용 배지를 제거한 후 *Neospora caninum*을 세포 유지용 배지에 풀어서 5ml(10^6 개/ml)를 접종한 다음 37°C(5% CO₂)배양기에서 2~3일간 배양한다.

3.2.3. 원충수확

Vero cell안에 증식한 후 밖으로 터져 나온 *Neospora caninum* tachyzoite를 무균적으로 수확한다.

3.2.4. 항원정제

Scraper로 긁어서 수거한 *Neospora caninum* tachyzoite를 2500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 pellet을 25-gauge needle로 *Neospora caninum* tachyzoite를 풀어준 후 5 μ m filter에 여과 후 *N. caninum* tachyzoite만 모아서 액체질소에 보존한다.

3.2.5. 항원흡착

수확한 *Neospora caninum* tachyzoite를 10^3 tachyzoite/slide well(13 μ l)이 될 수 있도록 serum dilution buffer(부기3)로 희석하여 13 μ l씩 IFA slide에 분주 후 완전히 말린 다음 메탄올로 고정 후 foil에 싸서 사용 전까지 -80°C에 보관한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 특이성시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

네오스포라 항원이 흡착된 slide well에 네오스포라의 표준양성혈청, 표준 음성혈청을 serum dilution buffer(부기3)로 200배 희석하여 각 slide well에 13 μ l씩 떨어뜨리고 식염수를 떨어뜨린 것을 대조군으로 하여 습윤 chamber에 slide를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 세척하고 fluorescein-labeled goat anti-bovine IgG(1:80)를 13 μ l씩 떨어 뜨린다.

3.3.2.2. 판정

형광현미경 검사에서 표준양성혈청을 처리한 표본은 특이형광이 인정되거나 음성혈청과 식염수대조군에서는 특이형광이 인정되지 않아야한다.

3.3.3. 역가시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

<별첨>의 방법에 따라 실시한다.

3.3.3.2. 판정

200배로 희석된 소 네오스포라병에 감염된 혈청이 표준양성혈청의 것과 비슷한 강도의 형광을 나타내야하며 음성혈청에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 원충부유항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따른다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 특이성시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.4. 항원저지시험

4.4.1. 재료 및 시험

Neospora caninum tachyzoite가 coating된 slide에 *Neospora caninum* tachyzoite로 면역된 양성혈청 그리고 대조로서 음성혈청을 전처리하고 세척, 건조한 후 각각 검사품으로 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

4.4.2. 판정

Neospora caninum tachyzoite가 혈청으로 전처리한 검사품에서는 특이형광이 전혀 인정되지 않거나, 현저하게 약화되어야 하고 음성혈청으로 전처리한

검사품에서는 특이형광이 인정되고 염색성에 이상이 없어야 한다.

4.5. 역가시험

4.5.1. 재료 및 시험

<별첨>의 방법에 따라 실시한다.

4.5.2. 판정

200배로 희석된 표준양성혈청은 형광을 나타내야 하며 음성혈청에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

5. 저장법 및 유효기간

-80℃ 냉동고에 보관하여야 하며, 1년간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 네오스포라 항원이 흡착된 slide
- 2) 네오스포라 표준양성혈청, 표준음성혈청 및 가검혈청
- 3) -70℃에 보관중인 IFA antigen coating slide를 꺼내 foil 포장을 벗긴 후 후 10분간 풍건한다.
- 4) 비동화시킨 가검 혈청을 serum dilution buffer(부기3)로 단계 희석한다.
- 5) 200배 희석된 표준양성혈청, 음성혈청 및 가검혈청을 각 well에 13 μ l씩 떨어뜨린다.
- 6) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨다.
- 7) 반응 후 1×FA rinse buffer에 10분간 담그고 가끔 흔들어준다.
- 8) 세척 후 test well에는 fluorescein-labeled goat anti-bovine IgG(1:80)를 13 μ l씩 떨어뜨린다.
- 9) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37℃에서 30분간 단계희석한다.
- 10) 반응 후 1×FA rinse buffer(부기4)에 10분간 담그고 가끔 흔들어준다.
- 11) 세척 후 mounting fluid(부기5)를 2~3방울 떨어뜨린 후 cover glass로 덮고 형광현미경으로 관찰한다.(X200, X400)

6.2. 판정

Control well의 표준양성혈청과 음성혈청의 차이가 명확하여야 하며, 200배 희석된 가검혈청이 표준양성혈청의 것과 비슷한 강도의 형광을 나타내면 양성으로 판정한다.

2-1-3-03

※ 유의사항

- 항원 항체 반응 중 혈청이 마르지 않도록 한다.
- 표준혈청과 fluorescein-labeled혈청은 반복적인 얼림과 녹임을 피하고, 반드시 소량씩 미리 분주하여 필요한 만큼씩 꺼내 쓴다.
- 공급된 네오스포라 항원 slide는 날개 포장되어 있으므로 한 장씩 꺼내어 사용하고 일단 사용한 slide는 재사용하지 않는다.

<별첨> 역가시험

가. 재료 및 시험

- 1) -80°C 에 보관중인 IFA antigen coating slide를 꺼낸 후 10분간 풍건한다.
- 2) 200배 희석된 표준양성혈청 및 표준음성혈청을 각 well에 $13\mu\text{l}$ 씩 떨어뜨린다.
- 3) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37°C 에서 30분간 반응시킨다.
- 4) 반응 후 1X FA rinse buffer(부기4)에 10분간 담귀 놓고 가끔 흔들어준다.
- 5) 세척 후 slide를 꺼내어 물기를 최대한 털어내고 Fluorescein-labeled goat anti-bovine IgG(1:80)를 $13\mu\text{l}$ 씩 떨어뜨린다.
- 6) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37°C 에서 30분간 반응시킨다.
-이때부터는 foil로 습윤 chamber를 덮어 형광이 날아가지 않도록 해야 한다.
- 7) 반응 후 1X FA rinse buffer(부기4)에 10분간 담귀 놓고 가끔 흔들어준다.
-형광이 날아가지 않도록 foil이나 기타 용기 사용하여 덮어준다.
- 8) 세척 후 slide를 꺼내어 물기를 최대한 털어내고, 항원이 coating되지 않은 반대면과 coating면의 가장자리 물기를 paper towel로 제거한다.
- 9) Slide에 FA mounting fluid(부기5)를 2~3방울 떨어뜨린 후 cover glass를 덮고 형광현미경으로 관찰한다(X200, X400).

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지(pH 7.2)

Alpha-MEM	500ml
Heat inactivated horse serum	3%
Penicillin	100unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지(pH 7.2)

Alpha-MEM	500ml
Heat inactivated horse serum	10%
Penicillin	100unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
L-Glutamine-200mM	5ml
MEM Vitamin solution 100X	5ml
MEM Amino acid solution 50X	5ml
MEM Non-essential amino acid solution 100X	5ml

부기3. Serum dilution buffer (pH 7.2) 4℃ 보관

Na ₂ HPO ₄	1.19g
NaH ₂ PO ₄	0.22g
NaCl	8.55g
BSA (bovine serum albumin)	10.0g
D.W	200ml

부기4. 4X FA rinse buffer (pH 9.0) 4℃ 보관 (1×로 희석하여 사용)

Na ₂ CO ₃	11.4g
NaHCO ₃	33.6g

NaCl 8.55g
D.W 200ml

부기5. FA mounting fluid

시판되는 buffer 또는 FA rinse buffer와 glycerol를 동량으로 혼합하여 사용한다.

소 네오스포라 항체 검사(ELISA) 키트

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit against Bovine Neosporosis

1. 정의

*Neospora caninum*을 조직 배양세포에 배양하여 만든 항원을 마이크로 플레이트에 흡착시키고 효소와 기질을 이용하여 만든 효소결합면역측정법 키트이며 소의 네오스포라 감염항체 검사에 사용한다.

2. 제조용 원충

2.1. 원충주

Neospora caninum 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 원충주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Vero cell 배양세포에 *Neospora caninum*을 접종하여 37℃(5% CO₂)배양기에서 2~3일간 배양한 후 감염 배양액을 수확하여 -80℃에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

*Neospora caninum*은 동물에 감염되면 증식형원충(Tachyzoite)과 조직포낭(Tissue cyst)의 두 가지 형태를 취하며 소, 개, 양, 산양 및 사슴 등에 자연 감염되며 그리고 마우스, 랫드, 개, 여우, 고양이, 돼지, 토끼, 원숭이에서 실험적으로 감염된다. 감염된 소의 경우 임신 3개월부터 분만 전까지 다양한 임신일령에 유산, 사산 등을 일으킨다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

Vero cell을 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

Vero cell 5ml(10^{30} 개/ml)를 175cm² culture flask에 접종한후 세포증식용 배지 20ml을 가하고 37°C(5% CO₂)배양기에서 7~10시간 배양한다.

3.2.2. 원충배양

배양세포가 70%이상 세포단층이 형성되었을 때 세포 증식용 배지를 제거한 후 *Neospora caninum*을 세포 유지용 배지에 풀어서 5ml(10^6 개/ml)를 접종한 다음 37°C(5% CO₂)배양기에서 2~3일간 배양한다.

3.2.3. 원충수확

Vero cell안에 증식한 후 밖으로 터져 나온 *Neospora caninum* tachyzoite를 무균적으로 수확한다.

3.2.4. 항원정제

Scraper로 긁어서 수거한 *Neospora caninum* tachyzoite를 2500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 pellet을 25-gauge needle로 *Neospora caninum* tachyzoite를 풀어준 후 5 μ m filter에 여과 후 *N. caninum* tachyzoite만 모아서 -80°C에 보관한다.

3.2.5. 항원농도조절

-80°C에 얼려진 항원을 PBS로 부유시킨 다음 freezing/thawing을 3회 반복 후 sonication을 10분간 실시하여 non-soluble부분을 16000rpm에서 35분간 원심분리 하여 제거한 후 단백질을 정량하여 2 μ g/well의 농도로 희석하여 사용한다.

3.2.6. 항원흡착

Coating buffer(부기3)를 사용하여 항원을 2 μ g/well의 농도로 희석하여 96well plate에 분주하고 37°C에서 2시간 coating하고 0.5% gelatin으로 1시간동안 blocking 한 후 건조시켜 밀봉하여 4°C에서 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 진단반응 확인시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

<별첨1>의 방법에 따라 실시한다.

3.3.2.2. 판정

2-1-3-04

<별첨2>의 흡광도를 산출한다.

음성혈청대조의 평균 흡광도는 0.200이하이어야 하며 양성혈청대조의 평균 흡광도(P)와 음성혈청대조의 평균흡광도(N)의 비율(P/N)이 3이상 이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 검사키트 포장

아래 사항의 자재를 비닐봉지에 동봉 포장하여 4℃ 냉암소에 보관한다.

- 1) 항원 coating plate 5개
 - 2) 혈청희석용 플레이트(serum dilution plate) 5개
 - 3) 10X 세척액(10X washing solution) 200ml
 - 4) 혈청희석액(serum dilution buffer) 200ml
 - 5) 100X HRPO conjugate (horseradish-peroxidase anti-swine IgG) 500 μ m
 - 6) 양성혈청대조(positive control) 100 μ l
 - 7) 음성혈청대조(negative control) 100 μ l
 - 8) 발색제(ABTS substrate) 50ml
 - 9) 정지액(stop solution) 50ml
- 상기의 시액들은 각각 1병

4. 검사방법

4.1. 특성시험

포장된 96well plate는 *Neospora* soluble protein을 coating한 plate로 성상이 균일하고 이물질이 없어야한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 유효성시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

<별첨1> 및 <별첨2> 참조

<별첨1> 진단반응 확인시험

가. 재료 및 시약

- 1) *Neospora* soluble protein,
- 2) Coating buffer(부기3),
- 3) Blocking buffer(부기4),
- 4) Washing buffer
- 5) Goat anti-bovine IgG conjugate(Peroxidase),
- 6) ABTS Peroxidase substrate(KPL),
- 7) Stop solution(1% Sodium dodecyl sulfate, SDS),
- 8) EIA plate

나. 시험

1) 항원 coating

항원량이 $2\mu\text{g}/\text{well}$ 되게 coating buffer에 항원을 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 37°C 배양기에서 2시간 반응시킨다.

2) PBST로 4회 세척한다.

3) Blocking

Blocking buffer를 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 37°C 에서 1시간 반응시킨다.

4) PBST 로 4회 세척한다.

5) 혈청반응(1st antibody)

가검혈청과 표준양성, 표준음성혈청을 100배 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩(두칸씩) 분주한 다음 37°C 배양기에서 2시간 반응시킨다.

6) PBST로 4회 세척한다..

7) Conjugate(2nd antibody)

Anti-bovine IgG peroxidase conjugate를 10,000배 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 37°C 에서 1시간동안 반응시킨다.

8) PBST로 4회 세척한다.

9) Substrate

ABTS peroxidase substrate를 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 실온에서 15분 동안 반응시킨다.

10) Stopping

2-1-3-04

1% SDS를 100 μ l씩 분주하여 반응을 정지시킨다.

- 11) 1% SDS를 넣은 plate를 살짝 흔들어서 잘 섞어준 다음 흡광도 450nm에서 OD값을 측정한다.

<별첨2> 흡광도산출법

- 1) 양성혈청대조 및 음성혈청대조의 OD 평균값을 산출한다.
- 2) 양성혈청대조 평균 OD값에서 음성혈청대조 평균 OD값을 빼서 corrected positive control(CPC)을 산출한다.
* $CPC = \text{양성혈청대조 평균 OD} - \text{음성혈청대조 평균 OD}$
- 3) 아래이 식에 따라 sample to positive(S/P) ratio를 산출하여 그 값이 0.5이상인 것을 양성으로 판정한다.

$$* S/P \text{ ratio} = \frac{\text{가검혈청 평균 OD} - \text{음성혈청대조 평균 OD}}{\text{corrected positive serum control(CPC)}}$$

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지(pH 7.2)

Alpha-MEM	500ml
Heat inactivated horse serum	3%
Penicillin	100unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지(pH 7.2)

Alpha-MEM	500ml
Heat inactivated horse serum	10%
Penicillin	100unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
L-Glutamine-200mM	5ml
MEM Vitamin solution 100X	5ml
MEM Amino acid solution 50X	5ml
MEM Non-essential amino acid solution 100X	5ml

부기3. Coating buffer(pH 9.6), 4℃ 보관

Na ₂ CO ₃	74.2g
NaHCO ₃	25.2g
D.W	1000ml

부기4. Blocking buffer, 4℃ 보관

Gelatin	5g
D.W	1000ml

여 백

2-2 돼 지

여 백

돼지 위축성비염 마이크로플레이트 혈청응집반응 검사용 항원

Porcine Atrophic Rhinitis Antigen, Microplate Agglutination Test

1. 정의

돼지 위축성 비염 원인균인 *Bordetella bronchiseptica*를 배양하여 얻은 균체를 이용하여 불활화하여 만든 항원이며 돼지 위축성 비염의 항체를 검출하기 위한 마이크로 플레이트 응집반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Bordetella bronchiseptica P4의 일상균 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다

2.2. 계대 및 보존

Bordetella bronchiseptica P4주의 1상균를 Bordet Gengou blood agar (BGBA) 배지에 이식하여 37℃에서 24시간 배양, *B. bronchiseptica*의 전형적인 단독 집락을 선택하여 brain heart infusion(BHI)broth배지에 계대 배양하여 배양한 균액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Bordetella bronchiseptica P4주 1상균의 성장검사는 혈액배지에서 용혈성(+), MacConkey agar(+), nitrate 환원성(+), urea분해능(6시간이내+), glucose(-), lactose(-), malonate(-) 선택배지(G20G)에서의 특유(small colony, blue color change)의 배양성과 독신(Dermonecrototoxin : DNT)의 산생능을 가진다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

BHI broth배지 또는 이와 동등한 성능을 가진 배지를 사용한다. 균의 배양에 사용하는 배지에는 돼지에 고도의 알러지 현상을 일으킬 우려가 있는 것을 사용하여서는 아니된다.

3.2. 원액제조

2-2-1-01

3.2.1. 종균배양

보관된 종균주를 멸균 BHI broth배지 또는 이와 동등한 배지 등으로 부유시킨 후 혈액배지에 접종하여 37℃에서 2일간 호기 배양한다. 혈액배지에 발육한 집락을 취하여 6부 시험관 10ml BHI broth배지에 접종하여 37℃의 진탕배양기에서 6~8시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

본 배양용 배지는 BHI broth배지 또는 이와 동등한 배지를 사용한다. 2리터 플라스크에 1리터 BHI broth배지에 종균주로 배양된 균액 10ml를 접종하여 37℃에서 48~56시간 정치 배양한다.

3.2.3. 불활화

배양된 균액에 포르말린 0.3%가 되게 넣은 후 실온에서 24시간 정치하여 불활화 시킨다.

3.2.4. 집균

불활화된 균액을 7,000 rpm에서 30분간 원심후 상층액을 버리고 침전된 균체에 다시 멸균식염수로 1회 원심수세를 실시하여 집균한다.

3.2.5. 항원 농도조절

집균된 균체에 멸균 식염수로 희석하여 흡광광도계로 410 nm파장에서 흡광도가 1.6으로 조정한다. 표준 양성, 음성 혈청으로 마이크로플레이트에서 응집반응 유무를 확인하고, 포르말린 0.1%, 치메로살 0.01%가 되게 첨가한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉진한다.

4. 검사방법

4.1. 특성 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 현탁액이며 이물 및 이취가 없는 균등한 균액으로 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제의 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.4. 방부제 정량시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량은 0.2% 이하이어야 한다.

4.5. 역가 시험

4.5.1. 재료 및 시험

균체항원을 PBS로 MacFarland NO.2의 혼탁도에 일치하게 부유시킨 것을 표준항원으로 이용하며 검사품 항원도 동일조건으로 부유시킨 항원이어야 한다. 양성 및 음성혈청을 각각 5개이상 시료로 사용하고 혈청희석을 PBS로 각각 10배부터 시작하여 2진 계단(0.5ml) 희석법으로 희석한 후 표준항원과 검사품 항원의 양을 혈청 희석량과 동량으로 가하여 37℃의 항원수조에 24시간 반응시킨다.

4.5.2. 판정

양성혈청에서 검사항원의 역가는 표준항원의 역가와 희석 1단계 이상 차이가 나서는 아니된다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시액

- 1) U형 마이크로 plate
- 2) Micropipette (25 μ l, 50 μ l 용), 12 channel multipipette(20-200 μ l 용)
- 3) Mixer(microplate 용)
- 4) 봉합테이프, 흑지, 램프 등

2-2-1-01

5) 희석액 (0.01M PBS, pH 7.2)

Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	2.85g
KH ₂ PO ₄	0.38g
NaCl	8.5g
D.W.	1,000ml

121 °C에서 30분간 고압멸균하여 사용한다.

6.2. 검사방법

1) Microplate에 혈청명 및 희석배수를 기입한다.

(처음 희석배수는1:10)

2) 희석액을 첫 번째 well에 90μl씩 분주하고 전 well에 50μl씩 분주한다.

3) 마이크로피펫을 사용하여 가검혈청을 첫 번째 well에 10μl씩 분주한다.

4) 양성과 음성 대조혈청 10μl를 대조군 첫 well에 분주한다.

5) 50μl multipipette으로 항원대조 well을 제외한 나머지를 위(A)에서 아래(H)로 2배수 단계희석한다.

6) 응집항원을 50μl씩 모든 well에 분주한다.

7) Microplate용 믹서로 잘 혼합시킨 후, plate를 랩 등으로 봉하여 37°C에서 하룻밤을 정치시킨다.

8) Plate를 실온에서 15분간 정치시킨다.

9) 밝고 편평한 장소에서 아래에 흑지를 깔고, 그 위에 plate를 놓고 충분한 광량하에서 응집을 관찰한다.

well번호	1	2	3	4-10	11	12
혈청(ul)	10↘	50↘	50↘	50↘	50↘	양성혈청
식염수(ul)	90	50	50	50	50	음성혈청(50)
희석배수	1:10	1:20	1:40	1:10240	
항원	50	50	50	50	50	50
혈청 + 항원	100	100	100	100	100	100

6.3. 판정기준

응집상태를 판정하여 기록한다.

※ 실험시 주의사항

반드시 양성대조혈청을 사용하여, 확실한 상태를 확인한다.

이전에 검사하여 역가를 알고 있는 혈청을 6개 정도 공시하여 같이 검사하여 실험의 정확도를 매번 확인하는 것이 좋다.

돼지 마이코플라스마 폐렴 항체검사(ELISA)용 항원

Porcine Mycoplasma Pneumonia Antigen, Enzyme-linked Immunosorbent Assay

1. 정의

돼지 마이코플라스마 폐렴균을 배양하여 균체를 초음파분쇄기로 파쇄하고 균체의 외막 단백질을 추출하여 만든 항원이며 돼지 마이코플라스마 폐렴의 감염항체 검출을 위한 효소결합면역측정법에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Mycoplasma hyopneumoniae J/101주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 이용한다.

2.2. 계대 및 보존

Mycoplasma 배지(부기1)에 3~5일간 단계별로 계대배양한 배양액을 -80℃ 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Friis 한천배지에 균을 접종하여 37℃에서 2주 동안 배양하면서 집락형태 및 그람 염색을 실시하여 성상을 확인한다. 이 균의 집락은 Mycoplasma 특유의 성상(fried egg)을 나타내지 않고, 표면에 추상(구름모양)또는 포상의 구조를 가진 비전형적인 형상을 나타낸다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

FF 배지(부기1) 또는 이와 동등한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보관된 종균주 (-70℃ 냉동실 보관)를 10ml 용량의 마개가 있는 시험관에 배지 5ml을 넣고 37℃에서 배양한다.

3.2.2. 본배양

5~7일 간격으로 새로운 배지를 배양액의 3배수로 계대배양한다. 배양액의

2-2-1-02

pH가 6.8 정도로 항원의 생산량이 가장 많을 때 10,000 rpm, 50분간 원심하여 균을 회수한다. 매 계대배양 시 마다 5%의 혈액배지에서 잡균의 오염여부를 확인한다. 10,000rpm, 50분으로 원심 후 균을 수거한다.

3.2.3. 집균

배양액을 10,000 rpm, 50분간 원심한 후 pellet을 10mM HEPES에 부유시킨 뒤 원심을 2회 반복하여 침전된 균체를 세척한다.

3.2.4. 항원추출.

세척된 균체를 10mM HEPES에 최종적으로 부유시킨다. 부유된 균액을 초음파분쇄기로 균체를 파쇄하고 7,000rpm, 30분간 원심하여 상층액을 얻는다. 얻어진 상층액을 15,000×g, 30분간 원심하여 침전물을 적당량의 10mM HEPES에 희석 후 0.45 μ m filter로 여과한다.

3.2.5. 항원농도조절

여과된 항원액의 단백질 함량을 측정하여 항원농도를 100 μ g/ml 되게 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 무색 투명한 액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제의 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가 시험

4.4.1. 재료 및 시험

표준 항원과 검사품에 대하여 돼지 마이코플라스마병 양성혈청 및 음성혈청 각각 5개 이상을 동시에 사용하여 간접효소결합면역측정법<별첨>을 실시한다.

4.4.2. 판정

표준항원과 검사품 항원에 대한 양성 및 음성항체가를 비교해서 1단계이상 차이가 나지 않아야 하며 양성혈청 항체가의 판정은 음성혈청 항체가 1배로 해서 판정한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시액

- 1) ELISA용 마이크로 plate(costar 3590)
- 2) Micropipette (10 μ l, 50 μ l용), 12 channel multipipette(20-200 μ l용)
- 3) Mixer(microplate 용)
- 4) 봉합테이프, 흑지, 램프 등
- 5) ELISA reader
- 6) 완충액 및 용액의 조성
- 7) Carbonate coating buffer (0.1M, pH 9.6)

NaHCO₃2.93g

Na₂CO₃1.59g

1,000ml D.W에서 교반하면서 pH가 9.6이 되도록 조절한다.

(4℃보관)

- 8) Phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4

NaCl(8g), KH₂PO₄(0.2g), Na₂HPO₄(1.19g), KCl(0.2g)

D.W 1,000ml에 용해한 다음 pH를 7.4에 맞춘다

- 9) Washing buffer(PBS Tween 20)

PBS 2000ml에 tween 20을 1ml첨가한다

- 10) Blocking buffer : 2% BSA(bovine serum albumin) in PBS

2-2-1-02

11) AP substrate solution (0.05M carbonate, pH 9.8)

· A solution

NaHCO_3 4.2g + $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.203g → 1000ml D.W

· B solution

Na_2CO_3 5.3g + $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.203g → 1000ml D.W

교반하면서 pH가 9.8이 될 때까지 B용액에 A용액을 천천히 가한다 (4°C 보관)

12) HRP substrate solution(0.1M phosphate - citrate pH 5)

0.1M citric acid : citric acid 19.21g을 1000ml D.W에 녹인다.

0.2M Na_2HPO_4 : Na_2HPO_4 28.4g을 1000ml D.W에 녹인다.

0.1M citric acid 12.5ml + Na_2HPO_4 12.85ml + D.W 25ml

이 용액에 OPD(Sigma P7288) 20mg을 녹인 후 마지막으로 30% H_2O_2 (시판되는 용액의 원액에 해당됨) 20ul을 넣는다

* 만든 즉시 사용

13) Stop solution : AP → 1M NaOH

HRP → 2.5M H_2SO_4

6.2. 검사방법

- 1) 항원을 coating buffer에 적정농도로 희석한다.
- 2) ELISA plate 각 well에 coating buffer로 희석된 항원 100 μl 씩 분주한 다음 4°C에 overnight시킨다.
- 3) Washing buffer를 각 well에 200 μl 씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 4) 각 well에 blocking buffer 200 μl 씩 분주한 다음 37°C, 1시간 정치시킨다.
- 5) Washing buffer를 각 well에 200 μl 씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 6) 다른 U-form microplate를 이용하여 첫 well에 PBS 180 μl 에 가검혈청 20 μl 를 혼합하고 나머지 well에 PBS 100 μl 씩 분주 후 첫 well의 혼합액 100 μl 를 11번 well 까지 2배수 계단 희석하여 옮긴 다음 마지막 well의 100 μl 는 버린다. 12번 well은 양성과 음성혈청을 설명서대로 희석하여 100 μl 을 넣는다. 항원이 흡착된 ELISA plate에 2진 희석된 가검혈청과 양성, 음성혈청을 각 Well에 옮긴 후 37°C, 2시간 반응시킨다.

<혈청희석방법>

well 번호	1	2	3	4-10	11	12
혈청(ul)	20\	100\	100\	100\	100\	양성혈청
PBS(ul)	180	100	100	1000	100	음성혈청 (100)
희석배수	1:10	1:20	1:40	1:10,240	

Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.

- 7) Conjugate(Anti-swine IgG peroxidase, KPL 14-14-08)을 PBS에 적정량 (각 제조회사 설명서참조)희석(500배)하여 각 Well에 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 1시간 반응시킨다.
- 8) Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 4회 세척한다.
- 9) Substrate(OPD)를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 실온에서 정확히 10분간 반응시킨다.
- 10) Stopping solution 50 μ l를 가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader(492nm)로 흡광도를 측정한다.

6.3. 판정기준

P/N(가검혈청/음성혈청)값이 2이상인 최대 혈청희석배수를 항체가로 판정한다

※ 실험시 주의사항

단, 시험결과의 판정은 매 시험할 때마다 양성혈청과 음성혈청을 대조로 두어 양성혈청의 항체가가 표시된 항체가와 차이를 보이지 않아야만 유효하다.

양성혈청의 항체가는 OD치로 1.3~1.6, 음성혈청의 OD치는 0.3이하이어야 실험이 제대로 수행된 것으로 인정한다

<별첨> 간접효소결합 면역측정법(indirect ELISA)

- 1) 항원을 coating buffer(부기2)로 100배 희석($1\mu\text{g}/\text{ml}$)하여 각 홀(well)에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4°C 에서 16~18시간 항원을 부착한다.
- 2) 0.05% PBS-T(부기3)을 각 홀에 $150\mu\text{l}$ 씩 분주하여 3회 세척한다.
- 3) Blocking buffer(부기4)을 각 홀에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 37°C 에서 1시간 반응시킨다.
- 4) 혈청을 2진 계단법으로 희석하기 위하여 인산완충액을 첫 홀에 $180\mu\text{l}$, 그 다음 홀에는 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 혈청을 첫 홀에 $20\mu\text{l}$ 을 가하고 그 다음 홀에는 2진 계단 희석한 후 37°C 에서 2시간 감작시킨다.
- 5) 0.05% PBS-T를 각 홀에 $150\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4회 이상 세척한다.
- 6) Conjugate(goat anti-swine IgG peroxidase)을 인산완충액으로 2000배 희석한 후 각 홀에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4°C 에서 1시간 반응시킨다.
- 7) 0.05% PBS-T를 각 홀에 $150\mu\text{l}$ 씩 분주하여 4회 이상 세척한다.
- 8) Substrate(OPD)(부기5)를 각 홀에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 실온에 30분간 반응시킨다.
- 9) Stopping solution $50\mu\text{l}$ (부기6)를 가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader (492nm)를 흡광도를 측정한다.
- 10) 반응이 끝난 후 3M H_2SO_4 를 각 홀에 $50\mu\text{l}$ 씩 분주하여 492nm 에서 흡광도를 측정한다.

<부 기>

부기1. **FF배지**

10X HBSS (Hank's balanced salt sol.)	50ml
BHI	8.2g
PPLO	8.7g
Lactalbumin hydrolysate	2.0g
Yeast extract	4.5g
Phenol red	0.02g
D.W	1,200ml
pH를 7.8로 조정하고 고압멸균한다. (121℃, 15 lb, 15분)	
고압멸균 후 다음의 보충제를 무균적으로 첨가한다:	
Fresh yeast extract (25%)	60ml
Porcine serum (inactivated)	100ml
Horse serum (inactivated)	100ml
Glucose	1.875g
Thallium acetate	0.25g

부기2. **Coating buffer**

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
D.W	to 1,000ml
adjusted pH 9.6±0.1, Store at 4℃	

부기3. **Washing buffer**

Tween 20	0.50ml
PBS	to 1,000ml
※ Phosphate buffered saline(PBS)	
NaCl	8.00g
KH ₂ PO ₄	0.20g

2-2-1-02

Na₂HPO₄ 1.19g
KCl 0.20g
D.W to 1,000ml
adjusted pH 7.2±0.2

부기4. Blocking buffer

Bovine serum albumin 2.00g
PBS to 100ml

부기5. Substrate solution(100ml용)

0.1M citric acid(19.2g/L) 24.30ml
0.2M Na₂HPO₄(28.4g/L) 25.70ml
D.W 50.00ml
OPD(O-Phenylenediamine) 40.00mg
30% H₂O₂ 40.00μl

부기6. Stopping solution

2.5M H₂SO₄

돼지 파스튜렐라페렴 항체검사(ELISA)용 항원

Porcine *Pasteurella pneumonia* Antigen, Enzyme-linked Immunosorbent Assay

1. 정의

돼지 파스튜렐라 페렴균을 배양하여 균체를 초음파분쇄기로 파쇄하고 균체의 외막 단백질을 추출하여 만든 항원이며 돼지 파스튜렐라페렴의 감염항체검출을 위한 효소 결합면역측정법에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Pasteurella multocida 3A균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Pasteurella multocida 3A균을 tryptose agar(TA)배지에 각각 이식한 후 37℃에서 18~20시간 배양한 후 전형적인 Pm 균주의 단독집락을 선택하여 TSB배지에 계대 배양하여 각각 배양한 균액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Tryptic soy agar(TSA)배지에 16~18시간 배양 시 진주빛을 띠고 협막을 형성하며, 이들 균은 각각 그람 음성 구간균으로 마우스에 접종 시 24~48시간 내에 마우스가 폐사되고 기니피크 피내에 접종했을 때 심한 괴사를 형성한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

BHI broth 또는 이와 동등한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 3A형 균주를 T.A.배지에 이식하여 37℃에서 18~20시간 배양하고 집락을 선발하여 BHI broth에 이식 18~20시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

BHI 배지를 룩스병 또는 플라스크에 적정량 분병 15Lb 에서 30분간 고압멸

2-2-1-03

균하여 사용한다. 배양된 A형 종균액을 룩스병 당 5ml씩 각각 이식하고 37°C에서 24시간 진탕배양한다.

3.2.3. 집균

배양액을 8,000rpm, 30분간 원심하여 상층액을 제거한다. PBS(pH 7.2)로 2회 원심세척한다.

3.2.4. 항원추출

10mM HEPES(Sigma H3375, autoclaved, pH 7.4)buffer 적정량(약 200ml)에 부유한 후 균액이 맑아질 때까지 초음파분쇄를 실시한 후, formalin 0.1% (v/v)을 첨가하여 5,000×g, 20분간 원심한 후 상층액을 회수한다. 회수된 상층액에 1% N-lauroylsarcosine (Sigma L-5125)을 1/10 vol. 첨가하여 실온에서 1~2분간 방치한다. 20,000×g, 2시간 원심하여 상층액을 버리고 멸균증류수로 가볍게 원심튜브를 1회 세척한 후, 투명한 침전물을 멸균증류수로 녹인 후 20,000×g, 2시간 원심하여 상층액을 버리고 침전물을 멸균증류수에 풀어준다.

3.2.5. 항원농도조절

치메로살 0.05%, 포르말린 0.05%를 첨가하여 단백질 양을 측정하여 항원농도를 100ng/ml되게 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성 시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 무색 투명한 액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제의 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가시험

4.4.1. 재료 및 시험

표준 항원과 검사품에 대하여 돼지 파스튜렐라병 양성혈청 및 음성혈청 각각 5개 이상을 동시에 사용하여 간접효소결합면역측정법<별첨>을 실시한다.

4.4.2. 판정

표준항원과 검사품 항원에 대한 양성 및 음성항체가를 비교해서 차이를 보이지 않아야 하며 양성혈청 항체가의 판정은 음성혈청 항체가 1배로 해서 판정한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시액

가검혈청은 56℃, 30분 불활화시킨다.

- 1) 항원 및 혈청 표준양성혈청, 음성혈청 및 가검혈청을 사용한다.
- 2) ELISA용 마이크로 Plate (costar 3590)
- 3) Micropipette (10ul, 50 μ l 용), 12 channel multipipette(20~200 μ l 용)
- 4) Mixer(microplate 용)
- 5) 봉합테이프, 흑지, 램프 등
- 6) ELISA reader

Carbonate coating buffer (0.1M, pH 9.6)

NaHCO₃2.93g

Na₂CO₃1.59g

1000ml D.W에서 교반하면서 pH가 9.6이 되도록 조절한다(4℃보관)

- 7) Phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4

NaCl(8g), KH₂PO₄(0.2g), Na₂HPO₄(1.19g), KCl(0.2g)

DW 1000ml에 용해한 다음 pH를 7.4에 맞춘다

8) Washing buffer(PBS tween 20)

PBS 2000ml에 tween 20을 1ml첨가한다

9) Blocking buffer

2% BSA(Bovine serum albumin) in PBS

10) AP substrate solution (0.05M carbonate, pH 9.8)

· A solution

NaHCO_3 4.2g + $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.203g → 1000ml D.W

· B solution

Na_2CO_3 5.3g + $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.203g → 1000ml D.W

교반하면서 pH가 9.8이 될 때까지 B용액에 A용액을 천천히 가한다.(4°C 보관)

11) HRP substrate solution(0.1M phosphate - citrate pH 5)

0.1M citric acid : Citric acid 19.21g을 1000ml D.W에 녹인다.

0.2M Na_2HPO_4 : Na_2HPO_4 28.4g을 1000ml D.W에 녹인다.

0.1M citric acid 12.5ml + Na_2HPO_4 12.85ml + DW 25ml

이 용액에 OPD(Sigma P7288) 20mg을 녹인 후 마지막으로 30% H_2O_2

(시판되는 용액의 원액에 해당됨) 20ul을 넣는다.

* 만든 즉시 사용

12) Stop solution : AP → 1M NaOH

HRP → 2.5M H_2SO_4

6.2. 검사방법

1) 항원을 coating buffer에 적정농도로 희석한다.

2) ELISA plate 각 well에 coating buffer로 희석된 항원 100 μl 씩 분주한 다음 4°C에 overnight시킨다.

3) Washing buffer를 각 well에 200 μl 씩 분주한 다음 3회 세척한다.

4) 각 well에 blocking buffer 200 μl 씩 분주한 다음 37°C, 1시간 정치시킨다.

5) Washing buffer를 각 well에 200 μl 씩 분주한 다음 3회 세척한다.

6) 다른 U-form microplate를 이용하여 첫 well에 PBS 180 μl 에 가검혈청 20 μl 를 혼합하고 나머지 well에 PBS 100 μl 씩 분주 후 첫 well의 혼합액 100 μl 를 11번 well 까지 2배수 계단 희석하여 옮긴 다음 마지막 well의 100 μl 는 버린다.

12번 well은 양성과 음성혈청을 설명서대로 희석하여 100 μ l을 넣는다. 항원이 흡착된 ELISA plate에 2진 희석된 가검혈청과 양성, 음성혈청을 각 well에 옮긴 후 37 $^{\circ}$ C, 2시간 반응시킨다.

<혈청희석방법>

well 번호	1	2	3	4-10	11	12
혈청(ul)	20\	100\	100\	100\	100\	양성혈청
PBS(ul)	180	100	100	1000	100	음성혈청(100)
희석배수	1:10	1:20	1:40	1:10240	

Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.

- 7) Conjugate(anti-swine IgG peroxidase, KPL 14-14-08)을 PBS에 적정량 (각 제조회사 설명서 참조) 희석(500배)하여 각 Well에 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 1시간 반응시킨다.
- 8) Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 4회 세척한다.
- 9) Substrate(OPD)를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 실온에서 정확히 10분간 반응시킨다.
- 10) Stopping solution 50 μ l를 가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader(492nm)로 흡광도를 측정한다.

6.3. 판정기준

P/N(가검혈청/음성혈청)값이 2이상인 혈청희석배수를 항체가로 판정한다

※ 실험시 주의사항

단, 시험결과의 판정은 매 시험할 때마다 양성혈청과 음성혈청을 대조로 두어 양성혈청의 항체가가 표시된 항체가와 차이를 보이지 않아야만 유효하다.
양성혈청의 항체가는 OD치로 1.3 - 1.6, 음성혈청의 OD치는 0.3이하이어야 실험이 제대로 수행된 것으로 인정한다.

<별첨> 역가시험

- 1) 항원을 coating buffer(부기1)에 적정농도로 희석한다.
- 2) ELISA plate 각 well에 coating buffer로 희석된 항원 100 μ l씩 분주한 다음 4 $^{\circ}$ C에 Overnight시킨다.
- 3) Washing buffer(부기2)를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 4) 각 well에 blocking buffer(부기3)를 200 μ l씩 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C, 1시간 정치시킨다.
- 5) Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 6) 다른 U-form microplate를 이용하여 첫 well에 PBS 180 μ l에 가검혈청 20 μ l를 혼합하고 나머지 well에 PBS 100 μ l씩 분주후 첫 well의 혼합액 100 μ l를 11번 well 까지 2배 수 계단 희석하여 옮긴 다음 마지막 well의 100 μ l는 버린다. 12번 well은 양성과 음성혈청을 설명서대로 희석하여 100 μ l을 넣는다. 항원이 흡착된 ELISA plate에 2진 희석된 가검혈청과 양성, 음성혈청을 각 well에 옮긴 후 37 $^{\circ}$ C, 2시간 반응시킨다.

<혈청희석방법>

well 번호	1	2	3	4-10	11	12
혈청(ul)	20\	100\	100\	100\	100\	양성혈청
PBS(ul)	180	100	100	1000	100	음성혈청(100)
희석배수	1:10	1:20	1:40	1:10240	

Washing buffer를 각 Well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.

- 7) Conjugate(anti-swine IgG peroxidase, KPL 14-14-08)을 PBS에 적정량 (각 제조회사 설명서 참조) 희석(500배)하여 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 1시간 반응시킨다.
- 8) Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 4회 세척한다.
- 9) Substrate(OPD)(부기4)를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 실온에서 정확히 10분간 반응시킨다.
- 10) Stopping solution(부기5)50 μ l를 가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader(492nm)로 흡광도를 측정한다.

<부 기>

부기1. Coating buffer

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
D.W	to 1,000ml
adjusted pH 9.6±0.1, Store at 4°C	

부기2. Washing buffer

Tween 20	0.50ml
PBS	to 1,000ml

※ Phosphate buffered saline(PBS)

NaCl	8.00g
KH ₂ PO ₄	0.20g
Na ₂ HPO ₄	1.19g
KCl	0.20g
D.W	to 1,000ml
adjusted pH 7.2±0.2	

부기3. Blocking buffer

Bovine serum albumin	2.00g
PBS	to 100ml

부기4. Substrate solution(100ml용)

0.1M Citric acid(19.2g/L)	24.30ml
0.2M Na ₂ HPO ₄ (28.4g/L)	25.70ml
D.W	50.00ml
OPD(o-Phenylenediamine)	40.00mg
30% H ₂ O ₂	40.00μl

부기5. Stopping solution

2.5M H₂SO₄

돼지 흉막폐렴 항체검사(ELISA)용 항원

Porcine Pleuropneumonia Antigen, Enzyme-linked Immunosorbent Assay

1. 정의

돼지 흉막폐렴(*Actinobacillus pleuropneumoniae* sero type 2, 5)균을 배양하여 균체를 초음파분쇄기로 파쇄하고 균체의 외막단백질을 추출하여 만든 항원이며 돼지 흉막폐렴의 감염항체를 검출하기 위한 효소결합면역측정법에 사용한다.

2. 제조용 균

2.1. 균주

Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 2, 5의 균주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Actinobacillus pleuropneumoniae S-2 및 S-5형의 균주는 PPLO agar에 V-factor(NAD; Nicotinamide-adenine-dinucleotide)를 3~5 μ g/ml 첨가한 배지상에서 37 $^{\circ}$ C에서 16~18시간 배양하여 전형적인 단독집락을 선택하여 tryptic soy broth(V-fator첨가)에 이식, 16~18시간 배양한 균액을 -80 $^{\circ}$ C이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4 $^{\circ}$ C이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

Actinobacillus pleuropneumoniae S-2 및 S-5형의 균주는 초코렛 한천 배지상에서 Pin point의 집락을 나타내고 혈액배지상에서 용혈을 나타내며 협막을 형성한다. 이들 균은 그람 음성 구간균으로 마우스에 접종 시 24~48시간 내에 폐사되고 기니피그 피내에 접종했을 때 심한 괴사를 형성한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

NAD 첨가된 TSA, NAD 첨가된 BHI broth 등의 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

동결건조된 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2, 5의 균주를 NAD 첨가된 TSA에 35시간 배양한다. 배양된 균괴를 10ml NAD 첨가된 (40

ng/ml) BHI broth에 18시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

NAD 첨가된 BHI broth 1L에 계대배양한다. 24~36시간 진탕배양한다.

3.2.3. 집균

NAD 첨가(40 ng/ml)된 BHI broth에 배양된 균체를 8,000 rpm, 30분간 원심한다. 0.85% NaCl로 2회 원심세척한다.

3.2.4. 항원추출

세척된 균체를 10 mM HEPES (pH 7.4) 완충액에 부유한다. 부유액을 초음파 분쇄한다. 8,000 rpm, 30분 원심침전시킨 후 상층액을 수집한다. 상층액을 100,000×g, 60분간 원심한다. 회수한 침전액을 10mM HEPES 완충액 (pH 7.4)에 부유한다. 부유액에 sodium lauryl sarcosinate가 1%되게 첨가한 후 37℃, 30분간 방치한다. 100,000×g, 60분간 원심한다. 회수된 침전액을 멸균 증류수로 2회 세척한다. 침전액을 멸균 증류수에 부유한다. 멸균증류수를 이용하여 48시간 투석한다.(MW: 10,000).

3.2.5. 항원농도조절

투석액을 단백질 정량검사법(예, BCA protein assay reagent kit)으로 단백질함량을 측정한다. 0.2um filter로 여과 후 항원농도를 50ug/ml 되게 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성 시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 무색 투명한 액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제의 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가 시험

4.4.1. 재료 및 시험

표준 항원과 검사품에 대하여 돼지 흉막페렴 양성혈청 및 음성혈청 각각 5개 이상을 동시에 사용하여 간접효소결합면역측정법<별첨>을 실시한다.

4.4.2. 판정

표준항원과 검사품 항원에 대한 양성 및 음성항체가를 비교해서 차이를 보이지 않아야 하며 양성혈청 항체가의 판정은 음성혈청 항체가 1배로 해서 판정한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시액

1) 항원 및 혈청

가검혈청은 56℃에서 30분간 불활화 시킨다.

2) ELISA용 마이크로 plate(Costar 3590)

3) Micropipette(10ul,50μl-용), 12 channel multipipette(20~200μl-용)

4) Mixer(microplate 용)

5) 봉합테이프, 흑지, 램프 등

6) 완충액 및 용액의 조성

7) Carbonate coating buffer(0.1M, pH 9.6)

NaHCO₃ 2.93g

Na₂CO₃ 1.59g

- 1,000ml D.W에서 교반하면서 pH가 9.6이 되도록 조절한다. (4℃보관)
- 8) Phosphate buffered saline(PBS), pH 7.4
 NaCl(8g), KH_2PO_4 (0.2g), Na_2HPO_4 (1.19g), KCl(0.2g)
 D.W 1,000ml에 용해한 다음 pH를 7.4에 맞춘다
- 9) Washing buffer(PBS Tween 20)
 PBS 2,000ml에 tween-20을 1ml첨가한다
- 10) Blocking buffer : 2% BSA(Bovine serum albumin) in PBS
- 11) AP Substrate solution(0.05M carbonate, pH 9.8)
 · A solution
 NaHCO_3 4.2g + $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.203g → 1,000ml D.W
 · B solution
 Na_2CO_3 5.3g + $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.203g → 1,000ml D.W
 교반하면서 pH가 9.8이 될 때까지 B용액에 A용액을 천천히 가한다 (4℃보관)
- 12) HRP substrate solution(0.1M phosphate - citrate pH 5)
 0.1M citric acid : citric acid 19.21g을 1000ml D.W에 녹인다
 0.2M Na_2HPO_4 : Na_2HPO_4 28.4g을 1000ml D.W에 녹인다
 0.1M citric acid 12.5ml + Na_2HPO_4 12.85ml +D.W 25ml
 이 용액에 OPD(Sigma P7288) 20mg을 녹인 후 마지막으로 30% H_2O_2 (시판되는 용액의 원액에 해당됨) 20ul을 넣는다
 * 만든 즉시 사용
- 13) Stop solution : AP → 1M NaOH
 HRP → 2.5M H_2SO_4

6.2. 검사방법

- 1) 항원을 coating buffer에 적정농도로 희석한다.
- 2) ELISA plate 각 well에 coating buffer로 희석된 항원 100 μl 씩 분주한 다음 4℃에 overnight시킨다.
- 3) Washing buffer를 각 well에 200 μl 씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 4) 각 Well에 blocking buffer 200 μl 씩 분주한 다음 37℃, 1시간 정치시킨다.
- 5) Washing buffer를 각 well에 200 μl 씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 6) 다른 U-form microplate를 이용하여 첫 well에 PBS 180 μl 에 가검혈청 20 μl 를 혼

2-2-1-04

합하고 나머지 well에 PBS 100 μ l씩 분주 후 첫 well의 혼합액 100 μ l를 11번 well 까지 2배수 계단 희석하여 옮긴 다음 마지막 well의 100 μ l는 버린다. 12번 well은 양성과 음성혈청을 설명서대로 희석하여 100 μ l을 넣는다. 항원이 흡착된 ELISA plate에 2진 희석된 가검혈청과 양성, 음성혈청을 각 well에 옮긴 후 37 $^{\circ}$ C, 2시간 반응시킨다.

<혈청희석방법>

well 번호	1	2	3	4-10	11	12
혈청(ul)	20	100	100	100	100	양성혈청
PBS(ul)	180	100	100	1000	100	음성혈청 (100)
희석배수	1:10	1:20	1:40	1:10240	

Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.

- 7) Conjugate(anti-swine IgG peroxidase, KPL 14-14-08)을 PBS에 적정량(500배) 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 1시간 반응시킨다.
- 8) Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 4회 세척한다.
- 9) Substrate(OPD)를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 실온에서 정확히 10분간 반응시킨다.
- 10) Stopping solution 50 μ l를 가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader(492nm)로 흡광도를 측정한다.

6.3. 판정기준

P/N(가검혈청/음성혈청)값이 2이상인 혈청희석배수를 항체가로 판정한다

※ 실험시 주의사항

단, 시험결과의 판정은 매 시험할 때마다 양성혈청과 음성혈청을 대조로 두어 양성혈청의 항체가가 표시된 항체가와 차이를 보이지 않아야만 유효하다. 양성혈청의 항체가는 OD치로 1.3~1.6, 음성혈청의 OD치는 0.3이하이어야 실험이 제대로 수행된 것으로 인정한다

<별첨> 간접효소결합 면역측정법(Indirect Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

- 1) 항원을 coating buffer(부기1)에 적정농도로 희석한다.
- 2) ELISA plate 각 well에 coating buffer로 희석된 항원 100 μ l씩 분주한 다음 4 $^{\circ}$ C에 overnight시킨다.
- 3) Washing buffer(부기2)를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 4) 각 well에 blocking buffer(부기3) 200 μ l씩 분주한 다음 37 $^{\circ}$ C, 1시간 정치시킨다.
- 5) Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.
- 6) 다른 U-form microplate를 이용하여 첫 well에 PBS 180 μ l에 가검혈청 20 μ l를 혼합하고 나머지 well에 PBS 100 μ l씩 분주후 첫 Well의 혼합액 100 μ l를 11번 well 까지 2배수 계단 희석하여 옮긴 다음 마지막 Well의 100 μ l는 버린다. 12번 well은 양성과 음성혈청을 희석하여 100 μ l을 넣는다. 항원이 흡착된 ELISA plate에 2진 희석된 가검혈청과 양성, 음성혈청을 각 well에 옮긴 후 37 $^{\circ}$ C, 2시간 반응시킨다.

<혈청희석방법>

well 번호	1	2	3	4-10	11	12
혈청(ul)	20\	100\	100\	100\	100\	양성혈청
PBS(ul)	180	100	100	1000	100	음성혈청 (100)
희석배수	1:10	1:20	1:40	1:10240	

Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 3회 세척한다.

- 7) Conjugate(Anti-swine IgG peroxidase, KPL 14-14-08)을 PBS에 적정량(500배) 희석하여 각 well에 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 1시간 반응시킨다.
- 8) Washing buffer를 각 well에 200 μ l씩 분주한 다음 4회 세척한다.
- 9) Substrate(OPD)(부기4)를 각 well에 100 μ l씩 분주한 다음 실온에서 정확히 10분간 반응시킨다.
- 10) Stopping solution(부기5) 50 μ l를 가하여 반응을 중지시키고 ELISA reader(492nm)로 흡광도를 측정한다.

<부 기>

부기1. Coating buffer

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
D.W	to 1,000ml
adjusted pH 9.6±0.1, Store at 4℃	

부기2. Washing buffer

Tween 20	0.50ml
PBS	to 1,000ml

※ Phosphate buffered saline(PBS)

NaCl	8.00g
KH ₂ PO ₄	0.20g
Na ₂ HPO ₄	1.19g
KCl	0.20g
D.W	to 1,000ml
adjusted pH 7.2±0.2	

부기4. Blocking buffer

Bovine serum albumin	2.00g
PBS	to 100ml

부기5. Substrate solution(100ml용)

0.1M Citric acid(19.2g/L)	24.30ml
0.2M Na ₂ HPO ₄ (28.4g/L)	25.70ml
D.W	50.00ml
OPD(<i>o</i> -Phenylenediamine)	40.00mg
30% H ₂ O ₂	40.00μl

부기6. Stopping solution

2.5M H₂SO₄

돼지단독 시험관 발육응집반응 검사용 항원

Erysipelothrix Antigen, Tube Growth-Agglutination, Wachstumsprobe Test

1. 정의

돼지단독 균(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)을 배양하여 얻은 균체를 직접 이용하여 만든 항원이며 돼지 단독감염의 혈중 항체를 검출하기 위한 발육응집반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균주

2.1. 균주

E. rhusiopathiae serotype 2인 표준균주 S-192 또는 국립수의과학검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정하는 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 단독균 배지(부기1)에서 24~48시간 배양한 균액을 동결 건조하여 5℃ 이하에 보존한다. 동결건조하지 않고 보존할 경우 2개월에1회 계대한다.

2.3. 성상 및 독력

평판배지에 배양된 돼지 단독균의 형태는 원형의 편평한 집락(Smooth colony)을 형성하며 그람 염색(Gram stain)을 실시하면 그람 양성균의 간균이다. 균주는 혈구응집 작용이 있고 돼지 단독균의 일반적인 생화학적 성상을 가진다. 마우스에 극히 감수성이 높으며 돼지에는 병원성이 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 배지

돼지 단독균 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

동결건조된 종균을 생리식염수로 용해하여 10% 소 혈청을 첨가한 brain-heart infusion broth에 소량 접종하고 24~48시간 배양한 후 다시 10% 소 혈청을 첨가한 brain-heart infusion agar 평판배지에서 48~72시간 배양하여 편평한 집락(smooth colony)을 3~4개 채취하여 돼지 단독균 배지(부기1)에 이식하여 37℃에서 24~48시간 증식 배양한 것을 사용한다.

3.2.2. 본배양

돼지 단독균 배지(부기1)에 종균 배양액을 1/100량 접종하여 37. C에서 10~16시간 배양한 다음 표준 균주를 소 혈청을 5~10% 첨가하거나 Tween 80이 0.1%가 첨가된 TSB(trypticase soy broth)에 접종하여 37℃ 항온실에 48시간 배양한다.

3.2.3. 항원농도조절

오염 여부를 확인한 후 항원(균수)농도를 맥파랜드(McFarland) 표준 현탁관 No. 2의 농도액으로 맞추어 항원농도를 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 역가시험

각 혈청형별 AGID용 항원은 AGID시험에서 각 표준 양성혈청에 대해 침강선이 명확히 확인되어야 하며, 음성혈청에 대해서는 침강선이 형성되어서는 아니된다. <별첨>

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 회백색 또는 황갈색의 건조피이며, 용해용액으로 용해하면 균등한 현탁액이 되며, 조대입자, 이물, 이취가 없고 소분용기간의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

동결 건조된 항원은 4~5. C의 냉암소에 보존하며, 제조완료일로 부터 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 혈청 발육응집 반응용 진단액은 아래와 같은 방법으로 사용한다.

- 1) 검사 시료 당 4부 시험관을 6개 이상 준비한다.
- 2) 멸균된 TSB(Tween 80이 1% 또는 혈청이 5~10% 첨가된 것)를 각 시험관에 1ml씩 분주한다.
- 3) 1번째 시험관에 의뢰된 혈청 1ml를 넣어서 교반기로 혼합한다.
- 4) 1ml 피펫을 이용하여 1번째 시험관에서 희석된 용액을 1ml 취하여 다음 시험관으로 옮기고 다시 혼합한 후 반복 작업 6번까지 한다.
(2배, 4배, 8배, 16배, 32배, 64배, 128배...)
- 5) 희석이 완료된 시험관에는 혈청 발육응집 반응용 항원, 즉, 돼지 단독 균액을 30 μ l(0.03ml)를 넣어서 37 $^{\circ}$ C 항온실에서 18~24시간 동안 반응시킨 후 아래와 같이 판정한다

시험관번호	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TSB	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
혈청	1ml	→1ml	→1ml	→1ml	→1ml	→1ml	→1ml	→1ml	→1ml
희석배수	2배	4배	8배	16배	32배	64배	128배	256배	512배
항원	0.03ml	0.03ml	0.03ml	0.03ml	0.03ml	0.03ml	0.03ml	0.03ml	0.03ml
항원+균주	1.03ml	1.03ml	1.03ml	1.03ml	1.03ml	1.03ml	1.03ml	1.03ml	1.03ml

6.2. 판정기준

- 1) 시험관 아래쪽 부분에 응집된 정도(pin point)와 TSB에서 균의 발육 정도(배지의 맑음 정도)를 확인하여 판정한다.
- 2) 혈청희석배수 64배 이상에서 응집될 때 돼지 단독 양성으로 판정한다.

<별첨> 역가시험

1) 생균응집반응

시험 1일전에 동결건조된 돼지 단독균(혈청별 2)을 멸균 식염수로 용해하여 10% 소혈청 또는 0.1% tween 80이 함유된 tryptic soy broth 50ml에 1ml를 접종하고 37℃에서 24시간 배양한 것을 응집반응용 항원으로 사용한다. 가검혈청 1ml를 4부 시험관에 2배에서 1.024배까지 2단계 희석한 후 생균응집반응용 항원 0.03ml를 각 시험관에 가하여 37℃에서 18~24시간 반응한 다음 응집능을 검사하며 역가는 응집된 최고 혈청희석 배수로 표기한다. 판정은 응집역가가 8배이하이면 음성, 16배는 의양성, 32배 이상은 양성으로 판정한다.

2) 한천겔 면역확산법(Agar Gel Immunodiffusion, AGID)

AGID용 agarose gel plate는 2% agarose, 4% PEG 8000을 100℃에서 10분간 boiling 하여 55℃로 식힌 후 0.1% Sodium Azide를 가하고 평판 plate에 적당량을 분주한 후 균한 다음 직경 3mm되게 punching하여 항원 및 가검혈청과 표준양성 및 음성혈청을 각 well에 넣어 실온에서 24~48시간 반응 후 침강선 형성 유무로서 판독한다.

<부 기>

부기1. 돼지 단독균 배지

Beef infusion	82.2%
Liver infusion	3.5%
Peptone	2.0%
Sodium phosphate($\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	1.1%
Potassium phosphate ($\text{KH}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	0.1%
Ox-bile	0.1%

상기 조성성분을 혼합 용해하여 pH를 8.0으로 조절하고 15Lb 30분간고압 멸균한 다음 dextrose와 lactose의 최종 농도가 각각 0.5% 함유되도록 하고 또한 소 혈청을 10% 함유되도록 첨가한 후 배지의 최종 수소이온농도 (pH)가 7.4~7.6이 되도록 수정하여 사용한다.

돼지콜레라(열병) 바이러스 검사용 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Classical Swine Fever

1. 정의

돼지콜레라 바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성항체 생산을 마우스유래 세포융합세포를 증식시켜만든 단클론성항체이며 돼지콜레라 감염조직 및 감염세포에서 돼지콜레라 바이러스검사에 사용한다.

2. 사용세포

2.1. 세포주

돼지콜레라 바이러스 특이 단클론성항체를 생산하는 hybridoma 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Hybridoma는 DMEM배지(부기1)에서 우태아혈청 10%를 첨가하여 37℃에서 CO₂ 배양기에서 3~4일간 배양한 후 세포를 수집하여 MEM배지 10%, 소 태아혈청 90%를 함유한 배지에 부유시켜 액체 질소에 동결보존 한다.

2.3. 성장 및 독력

돼지콜레라 바이러스 특이 단클론성항체를 생산하는 세포는 마우스유래 Myeloma Cell과 돼지콜레라 바이러스 단백질로 면역된 마우스 비장세포를 세포융합을 통하여 새로이 제조된 세포로 hybridoma라 한다. hybridoma는 마우스 유래 항체를 배양 배지로 분비하며 분비된 항체는 돼지콜레라 바이러스에 특이적으로 반응하여 결합한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

돼지 콜레라바이러스의 특이항체를 생산하는 hybridoma를 사용한다.

3.1.2. 배지

소 태아 혈청이 10% 함유된 DMEM배지(부기1)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 1차 배양

동결보존된 hybridoma를 제조용 배지에 부유한 후 37°C의 CO₂ 배양기에서 3~4일간 배양한다. hybridoma가 증식되는 것이 현미경으로 확인되면 3~4일 간격으로 제조용 배지를 이용하여 1 : 3 비율로 계대배양한다.

3.3.2. 본배양

1차 배양에서 증식된 hybridoma는 돼지콜레라 바이러스의 항체를 함유한 마우스의 복수(Ascite)를 생산하기 위하여 1차 배양된 hybridoma를 1×10^4 /ml개 되게 농도를 조절하여 본배양 배지에 접종하고 37°C에서 4~5일간 배양한다. 배양 후 오염여부, 세포의 활성상태를 현미경으로 관찰한다.

3.2.3. 단클론성 항체생산을 위한 마우스 복수 생산

돼지 콜레라 바이러스의 항체를 함유한 마우스의 복수를 생산하기 위해 10~15g의 건강한 Balb/c 마우스에 5~10두를 선정하여 마리 당 0.5ml씩의 pristane을 복강 내에 접종하고 10~30일 후에 본 배양에서 증식된 hybridoma를 800rpm에서 10분간 원심하여 수확한 것을 무혈청 배지로 1회 세척한 후 무혈청 배지로 세포수가 1×10^6 /ml개의 농도로 희석하여 각 Balb/c 마우스 당 1ml씩 접종한다. 채취한 복수는 고속원심기로 6,000rpm에 30분간 원심하여 상층액을 수확한다. 수확한 원액(항체가 1,000배 이상)의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -70°C 이하의 냉장고에 보존한다.

3.2.4. 항체 농도조절

항체는 원액검사의 항체가 측정시험결과에 의하여 항체가가 4배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가 측정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

검사품(수확한 항체복수)을 PBS(부기2)를 이용하여 10배 단계 희석하여 돼지콜레라 바이러스를 증식한 후 아세톤으로 고정된 돼지 신장세포표본에 anti-mouse FITC conjugate를 반응한 후 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

역가는 특이형광이 인정되는 최종 희석배수의 역수를 환산하여 4배

이상이어야 한다.

3.3.3. 특이성 시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지콜레라 바이러스 감염배양세포의 카바스립표본 또는 돼지콜레라 감염 돼지의 편도선 조직의 동결박절표본과 대조로서 정상배양세포 또는 건강 돼지의 편도선 조직동결 박절표본을 직접법에 의하여 검사품으로 염색하고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

돼지콜레라 바이러스 감염세포와 감염조직의 상피세포 또는 세망세포의 세포질에서는 특이형광을 나타내나 대조세포와 조직표본에서는 이와 유사한 형광이 전혀 나타나지 않아야 한다.

3.3.4. 항원 저지시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

돼지콜레라 바이러스 감염세포 표본에 돼지콜레라 면역혈청을, 그리고 대조로서 돼지콜레라 중화항체 음성인 돼지 혈청을 전처리하고, 세척, 건조한 후 각각 검사품으로 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.4.2. 판정

돼지콜레라 면역혈청을 전처리한 표본에서는 특이형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화되어야 하고 중화항체 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항체농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전 한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 색조를 띤 균등한 항체액으로서 이물이취가 없고 소분된 용기마다 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온 농도는 7.0~7.2 이어야한다.

4.4. 특이성 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 항원저지시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃이하 냉장고에 보존하고 제조완료일로 부터 12개월간 유효하다.

사용 시 반복해서 동결융해 되지 않도록 사용량만큼 소분해서 보관한다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 돼지콜레라로 의심되는 가검조직의 동결절편을 만든다.
- 2) 아세톤으로 실온에서 10분간 고정한다.
- 3) 돼지콜레라 바이러스 단클론성항체를 2~3방울 점적한다.
- 4) 실온에서 1시간 반응한다. PBS로 10회이상 세척한다.
- 5) Anti-mouse IgG FITC conjugate를 실온에서 1시간 반응한다.
- 6) PBS로 10회 이상 세척한다.
- 7) Cover glass로 덮은 후 형광항체현미경으로 관찰한다.

6.2. 판정

선명한 형광이 조직의 세포질 내에서 관찰이 되면 돼지콜레라 바이러스 감염으로 판정한다.

<부 기>

부기1. DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)-배지

Beef infusium	100ml
Peptone	2.0%
Agar	2.5~3.0%
NaCl	0.5%
Clycerine	2.0%
Colloidal sulfar	0.1%

pH는 7.2 로한다.

부기2. 인산완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS)

Potassium phosphate	1.0%
NaCl	0.85%
D.W	100ml

돼지 일본뇌염 혈구응집억제반응 검사용 항원

Swine Japanese Encephalitis Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

돼지 일본뇌염 바이러스를 마우스 뇌 내에 접종 후 감염뇌조직을 유제액으로 만든 항원이며 돼지 일본뇌염 감염의 혈중 항체를 검출하기 위한 혈구응집 억제반응 검사(haemagglutination inhibition test ; HI test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

돼지 일본뇌염바이러스 Nakayama주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

4~5일령 포유 마우스(ICR)의 뇌 내에 Nakayama virus를 0.03ml씩 접종한 후 4~7일 사이에 포유마우스에 신경증상과 함께 폐사하게 된다. 이 마우스의 뇌를 세절하여 10%의 유제액을 만든다. 유제액을 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 -80°C 이하에 동결보존한다.

2.3. 성상 및 독력

포유 마우스의 뇌 내에 접종한 후 4~7일 사이에 후구마비 등 신경증상을 나타내며 폐사한다. 본 바이러스에 감염된 돼지나 말은 혈구응집억제 항체를 생산한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 동물

건강한 4~5일령의 포유마우스(ICR)10~15복(100~150두)를 사용하며 각 케이지별로 1복씩 둔다.

3.1.2. 재료

8.5% sucrose, aceton 및 normal saline를 사용한다.

3.2. 원액 제조

3.2.1. 바이러스 접종

건강한 4~5일령의 포유마우스에 일본뇌염 바이러스 Nakayama주를 0.03ml

2-2-2-02

씩 뇌 내에 접종한다. 접종 후 2일 이내에 폐사한 마우스는 항원생산에 사용하지 않는다.

3.2.2. 바이러스감염 마우스 수확

Nakayama 바이러스를 접종 후 4~7일 사이에 신경증상을 나타내는 마우스를 -70°C 에 보존한다(-20°C 보관시 바이러스항원이 자가용해됨).

3.2.3. 항원수집

- 1) 수확된 마우스의 뇌를 유발에 적출하여 8.5% Sucrose 를 이용하여 20% w/v의 뇌 유제액을 만든다. 즉 마우스 뇌의 무게가 20g이면 8.5% sucrose 80ml를 넣는다.
- 2) 이 유제액을 2,500rpm에서 10분간 원심한다. 상층액을 18개이지 바늘이 부착된 주사기를 이용하여 상층액을 흡입한 후 유제액의 20배량의 냉아세톤(-20°C)에 분출한다.
- 3) 유제액을 혼합하면서 아세톤을 철저하게 혼든다.
- 4) 이때 혼탁된 아세톤을 버리고 새로운 냉 아세톤을 20배 량을 더하여 다시 혼합한다.
- 5) 그 후 4°C 에서 1시간 동안 정치시킨 후 조심스럽게 아세톤을 버린다.
- 6) 남아있는 아세톤은 진공펌프를 이용하여 제거하고 건조시킨다.
- 7) 완전히 건조되면 처음 뇌 유제액의 2배가되는 normal saline으로 건조괴를 녹인다.
- 8) 4°C 에서 magnetic bar를 이용하여 제조된 항원을 완전히 하룻밤동안 (overnight) 용해한다.
- 9) 용해된 액을 10,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 취한다.
- 10) 이 상층액을 일본뇌염 혈구응집용 항원(8,000 HA unit 이상)의 원액으로 하며 일부는 원액검사로 사용하고 나머지는 -20°C 이하의 냉장고에 보존한다.

3.2.4. 항원농도조절

항원은 원액검사의 역가시험 결과에 의하여 512 HA unit이상이 되도록 항원농도를 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 동물 및 시험

검사품을 0.03ml를 5마리의 포유마우스 뇌 내에 접종하고 대조로 2마리의 포유마우스를 사용하여 1주일간 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

마우스는 관찰기간 중 이상이 없어야 한다.

3.3.4. 역가시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

항원역가를 측정하기 위하여 ACD(부기1), DGV(부기2), BABS(부기3), 25%kaoline(부기4), borate saline(부기5), 숫 거위혈구(부기7) 및 U type microplate 를 사용하여 항원의 혈구응집가 시험을 실시한다.

3.3.4.2. HA test (antigen titration)

- 1) 바이러스 항원을 96 well microplate 첫 번째 well에 50 μ l를 가한다.
- 2) 첫 번째 well부터 끝까지 0.4% BABS를 50 μ l씩 분주한다.
 - * 필요한 량에 따라서 1/5, 1/10로 줄일 수 있다.
 - * 5ml test tube에 pH별 표준화한 거위혈구(부기7)를 1 : 24로 희석한다. (일반적으로 pH 6.2에서 가장 높은 혈구응집이 된다.)
- 3) 50 μ l씩 첫 번째 well부터 11번까지 희석하고 마지막 50 μ l는 버린다. 12 번째 well은 거위 RBC control로 사용한다.
- 4) 1 : 24 로 희석한 50 μ l 거위혈구(부기7)를 가한다. (각 pH 별로 2줄씩 가한다.)
- 5) 잘 혼합한 후 tape으로 싸서 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 정치한 후 판독한다.

3.3.4.3. 판정

항원의 혈구응집역가는 512 HA unit이상이어야 하며, 대조는 혈구응집이 인정되어서는 아니 된다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전

한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 V-1에 의한 검사에 따른다. 불투명한 액체로 이물을 나타내서는 아니 되며, 소분용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH는 6.2~6.6 이어야 한다.

4.5. 불활화 확인시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 재료 및 시험

항원역가를 측정하기 위하여 숫 거위 적혈구를 이용하여 혈구응집 시험을 실시한다. 항원의 동정은 표준항원과 검사품을 이용하여 돼지 일본뇌염 양성 혈청 및 음성혈청을 이용하여 혈구응집억제시험을 실시한다.

4.6.2. 판정

검사품에 표시된 항원역가보다 2배 이상이어야 하며 양성혈청에 대해서는 표준품과 검사품의 혈구응집억제가 동일하여야 하며 음성혈청에 대해서는 역가가 인정되어서는 아니된다.

5. 저장법 및 유효기간

-70℃ 이하의 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) U plate를 사용한다.(V plate를 사용하는 것보다 판독하기 용이하다.)
- 2) 25 μ l의 혈청을 첫 번째, 두 번째 well에 넣는다.

- 3) 두 번째 well부터 12번째 well까지 0.4% BABS를 25 μ l를 넣는다.
- 4) 두 번째 well부터 11번째 well까지 2진 희석한다.
- 5) 8 HAunit의 돼지 일본뇌염바이러스항원을 25 μ l씩 첫 번째 well부터 11번째 well까지 넣는다. 12번째 well에는 BABS 25 μ l를 첨가한다.(serum control)
- 6) Wrap으로 싸서 4 $^{\circ}$ C에서 18~24시간 배양하거나 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양한다.
- 7) 돼지 일본뇌염 양성 및 음성혈청을 대조로 두며, back titration을 실시한다.
- 8) 적정 pH(즉 HA 시험시 가장 높은 역가를 나타내는 pH)용액에 표준화 된 RBC에 24배 희석한 것을 50 μ l를 각각의 well에 넣는다.
- 9) 37 $^{\circ}$ C에 30분간 정치 후 응집이 억제된 최고 희석배수의 역수를 역가로 계산한다.

6.2. 판정

혈구응집억제가가 10배 이상이면 항체 양성으로 판정한다.

* 유의사항

- 1) Back titration이 8 HA unit로 정확하여야 한다.
- 2) 양성혈청은 640배로 음성혈청은 10배 이하로 판독되어야 한다. 야외 바이러스에 의한 감염은 모든의 경우 640배 이상이다.
- 3) 돼지의 감염성 번식장애 진단 시 임신 70일령 이전(태아의 crown-rump의 길이가 16cm이하)태아는 항체 형성능이 없기 때문에 항원검출 또는 원인체 분리를 실시하여야 하며 임신 70일령 이후(17cm이상)는 태아의 혈청, 복수 등을 이용한 항체검출을 실시하여야 한다.

<부 기>

부기1. Acid-citrate-dextrose(ACD)

Sodium citrate($\text{Na}_3\text{O}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	11.26g
Citric acid($\text{H}_3\text{C}_6\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4g
Dextrose(Glucose)	11g
D.W	500ml

*autoclave :15 lb, 121℃ 15분

부기2. Dextrose-gelatin-veronal(DGV)

Veronal(barbital) sigma B075	0.58g
Gelatin	0.60g
Sodium veronal(sodium barbital)	
Sigma B 0500	0.38g
CaCl_2 (anhydrous)	0.02g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.12g
NaCl	8.5g
Dextrose	10.0g
D.W	1000ml

*Veronal과 gelatin을 250ml의 증류수에 녹여 가열하면서 녹인다.

이 용액을 다른 시약과 혼합한 후 멸균한다.

부기3. 4% Bovine albumin(fraction V) : BABS

Bovine albumin	4g
Borate saline solution(pH 9.0)	100ml

* ACD, DGV, 4% bovine albumin은 여과한 후 냉장보관 한다.

부기4. 25% Kaolin

Borate saline(pH 9.0) 100ml에 25g의 acid washed kaolin을 가하여 만든다.

부기5. Borate saline solution(pH 9.0)

1.5M NaCl	80ml
0.5M H ₃ BO ₃ (Boric acid)	100ml
1.0N NaOH	24ml
D.W	1000ml

부기6. Stock sodium solution**1.5M Sodium chloride**

◦ NaCl	87.675g
◦ D.W	1,000ml

2.0M Dibasic sodium phosphate

◦ Na ₂ HPO ₄	283.96g
◦ D.W	1,000ml

2.0M Monobasic sodium phosphate

◦ Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	276.02g
◦ D.W	1,000ml

0.5M Boric acid

◦ H ₃ BO ₃	30.92g
◦ Hot D.W	700ml
◦ D.W	1,000ml

부기6-1. Working sodium solution : Stock solution을 희석혼합하여 제조.**0.15M NaCl - 0.2M Na₂HPO₄**

◦ 1.5M NaCl	100ml
◦ 2.0M Na ₂ HPO ₄	100ml
◦ D.W	800ml

0.15M NaCl - 0.2M NaH₂PO₄

◦ 1.5M NaCl	100ml
◦ 2.0M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	100ml
◦ D.W	800ml

부기6-2. Table of pH values

Solution pH	A	B
	0.15M NaCl - 0.2M Na ₂ HPO ₄	0.15M NaCl - 0.2M NaH ₂ PO ₄
5.75	3.0ml	97.0ml
6.0	12.5ml	87.5ml
6.2	22.0ml	78.0ml
6.4	32.0ml	68.0ml
6.6	45.0ml	55.0ml
6.8	55.0ml	45.0ml
7.0	64.0ml	36.0ml
7.2	72.0ml	28.0ml
7.4	79.0ml	21.0ml

* 일반적으로 pH 6.2에서 가장 좋은 반응을 나타낸다.

부기7. 거위 혈구의 준비 및 표준화

- 1) 거위의 wing vein에서 채혈한다.
- 2) 10ml 주사기를 이용하여 ACD 1.5ml를 주사기내 주입하고 혈구액 8.5ml를 채혈한다.
- 3) ACD 함유혈액을 원심(1,500 rpm, 5min.)하여 상층부의 백혈구층을 건어낸다.
- 4) 침전적혈구에 DGV(10ml 정도)를 첨가하여 혼합한 다음, 다시 원심한 후, 상층부의 백혈구층을 건어낸다.
- 5) 4)항의 원심세척을 2회 더 반복한다.
- 6) Packed RBC(원심 세척후 가라앉은 혈구) 1ml에 13.3ml의 DGV를 가하여 표준화된 RBC를 제조한다.
- 7) 4℃에 보관하며 약 2주간 사용 가능하다.
- 8) 표준화 RBC를 일부 취하여 각각의 pH별 PBS(부기6-2)로 1:24 희석한 다음 HA test를 실시한다.

돼지 오제스키병 항체검사(RIDEA) 키트

Radial Immunodiffusion Enzymed Assay Kit against Porcine Aujeszky's Disease

1. 정의

돼지 오제스키병 바이러스를 조직 배양하여 그 배양액을 0.4% triton X-100 용액으로 처리하여 만든 항원이 흡착된 플라스틱 샤레에 0.7% 한천을 덮은 반투명한 키트이며 면역확산법의 원리를 이용하여 돼지 오제스키병 바이러스의 감염 항체를 검출하기 위해 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

국내에서 분리 동정한 오제스키병 바이러스 NYJ주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

NYJ 바이러스 주를 PK-15(porcine kidney cell line)배양세포의 단층이 형성되었을 때 접종하여 37℃에서 배양하면서 세포변성효과(cytopathic effect, CPE)와 70~80%이상 일어났을 때 감염 배양액을 -80℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

큰 돼지에서는 불현성 감염의 경우가 많으며 주로 어린 돼지에서 발병한다. 37℃에서 반감기 7시간, 56℃에서 15분, 100℃에서는 1분에서 불활화된다.

토끼의 피하에 접종하면 심한 소양증을 나타내며 피부가 박리출혈되고 2~3일에 폐사한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

PK-15 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포 증식용 배지(부기1) 및 세포 유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

2-2-2-03

3.2.1. 세포배양

세포 증식용 배지에 PK-15 배양세포를 분주하여 37°C에서 2~3일간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 배양

세포 배양 후 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 종독 바이러스를 세포유지용 배지에 종독 바이러스(NYJ바이러스주)를 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml를 접종하여 37°C에서 2~3일간 회전배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

회전배양한 후 접종바이러스에 의한 CPE가 약 80% 이상 일어났을 때 배양액 및 감염된 세포를 수확한다.

3.2.4. 항원정제

수확한 배양액을 2,000~3,000rpm에서 20분간 원심침전하여 상층액을 버리고 침전된 세포를 다시 부유시켜 2,000rpm에서 10분간 원심 침전시킨다. 침전된 세포를 tris EDTA buffer(부기3)로 10~20배로 분산시킨 다음 0.5% Triton X-100용액을 가하여 4°C에서 90분간 교반한 후 10,000rpm에서 2시간 원심 침전하여 상층액을 항원으로 사용한다.

3.2.5. 항원역가 확인 시험

3.2.5.1. 재료 및 시험

정제된 항원은 coating buffer(부기4)를 이용하여 10배 단계 희석한 후 각각의 희석액을 60x10mm tissue culture dish에 5ml씩 분주한 후 4°C에서 overnight 반응한다. Blocking solution(3% BSA in PBS)으로 2시간 실온에서 반응한다. 1% agarose용액을 6ml 분주한 후 굳힌다. 돼지오제스키 양성 및 음성혈청을 준비된 filter paper disc(지름 5ml)에 묻힌 후 각각 agarose 표면에 조심스럽게 올려놓는다. 37°C에서 2시간 반응한다. agarose를 제거하고 세척액(0.05% tween 20 in PBS)을 이용하여 3회 세척한다. anti-swine HRP conjugate를 첨가한다. 37°C에서 1시간 반응한다. 반응액을 버리고 세척액으로 3회 세척한다. PBS(부기4)에 agarose를 1% 되게 추가하고 전자렌지로 잘 녹인다. 45°C까지 식힌 후 발색제인 aminosallylic acid(ASA)를 첨가한 후 발색할 때까지 기다린 후 판정한다.

3.2.5.2. 판정

양성혈청 및 음성혈청의 반응환의 크기를 측정한 후 항원 coating 양 및

양성 및 음성 혈청 판정기준을 결정한다.

일반적으로 양성인 경우 한천이 굳어지는 때를 전후하여 갈색이 나타나기 시작하며, 시간이 경과함에 따라 색이 점차 진하게 된다. 정색반응을 나타내기 시작한 후 10~20분에 판정한다.

가) 정색반응이 양성대조와 같거나 진할 때는 양성으로 판정한다.

나) 정색반응이 양성대조보다 약할 때는 의양성으로 판정한다.

다) 정색반응을 나타내지 않은 것은 음성으로 판정한다.

3.2.6. 항원흡착

3.2.5에 의하여 결정된 항원량을 흡착 완충액(부기5)으로 희석하여 60×10mm tissue culture dish에 5ml씩 분주한 후 4℃에서 overnight 반응한다. Blocking solution(3% Bovine serum albumin in PBS)으로 2시간 실온 반응한다. 1% agarose 용액을 6ml 분주한 후 굳힌다. 비닐포장을 한 후 냉암소(5℃)에 보관한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 진단 반응 확인시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

본 진단키트의 사용설명서 술식에 의거 시험을 실시한다. 단, 동봉된 표준양성 및 음성 흡지의 별도 양성(중화항체가 4배 이상) 및 음성혈액이나 혈청을 공시하여 실시한다.

3.3.2.2. 판정

시험이 완료된 후(5~10분후)표준 양성 및 별도 양성혈청은 정색반응을 나타내어야 하며 표준 및 별도 음성혈청은 정색반응을 나타내지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의한다.

3.5. 검사키트 포장

아래사항의 자재를 비닐봉지에 동봉 포장하여 4℃ 냉암소에 보관한다.

- 1) 오제스키병 바이러스 항원이 흡착된 검사 dish 2개
- 2) 소요자재

효소면역글로블린(냉동건조) 1병, 세척액 2병(100ml×2), 한천 1병(10ml), 발색제 1앰플(0.3ml), 과산화수소 1앰플(0.3ml), 가검물 흡착용지 24매, 표준 양성혈청 흡착지 2매, 표준 음성혈청 흡착지 2매, 한천제거봉 1개, 검사성적카드 2매, 1회용 주사기(19G, 10ml) 1개

4. 검사방법

4.1. 특성시험

항원이 흡착된 플라스틱 평판에 한천을 덮은 반투명 키트로서 성상이 균일하고 세균 발육이나 기타 이물이 없어야 하며 효소 글로부린은 무색 투명하며 또한 이물이 없어야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 안전시험

4.3.1. 동물 및 시험

기니픽 또는 토끼 4마리를 사용하여 3마리에는 검사품을 피하 접종하고 1마리는 대조로 생리적 식염수를 접종한다.

4.3.2. 판정

관찰기간 중 모든 공시동물은 이상이 없어야 한다.

4.4. 진단 반응 확인시험

표 3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월 간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 양성(+) 및 음성(-) 혈청 흡착지를 먼저 검사dish의 한천위에 가만히 접촉시킨다.
- 2) 원형의 종이 천공기(직경 6mm)로 가검혈액이 흡착된 흡착지를 절단하여 검사dish의 한천위에 접촉시킨다.
- 3) 접촉된 흡착지를 적시기 위하여 증류수 한방울(0.03ml)을 접촉순서에 따라 흡착지위에 정확히 떨어뜨린다.
- 4) 뚜껑을 덮은 후 실온(25~30℃)에서 120분간 감작한다.
- 5) 검사 dish를 뒤집은 상태에서 동봉된 한천제거봉을 사용하여 한천을 조심스럽게

게 제거한다.

- 6) 세척액을 10~15ml씩 검사dish의 벽을 따라 가만히 주입하고, 20~30초 후에 조심스럽게 서서히 부어 버리는 세척작업을 3회 반복한다.
- 7) 효소면역글로불린은 동봉된 세척액 6ml를 가하여 용해한다.
- 8) 효소면역글로불린은 3ml씩 검사dish에 가만히 주입하고, 실온(25~30℃)에서 30분간 감작한 후 남은 액체를 부어 버리고 “6”의 방법에 따라 3회 세척한다.
- 9) 감작시간을 이용하여 동봉된 한천은 가온 용해시킨 56℃±2의 수온에서 액체상태로 유지한다.
- 10) “9”와 같이 준비된 한천용액에 주사기로 빨아올린 발색제와 과산화수소를 넣어 완전히 혼합한 후 검사dish에 5ml를 넣어 균한 다음 실온에 정치한다.

6.2. 판정

일반적으로 양성인 경우 한천이 굳어지는 때(5~10분후)를 전후하여 갈색이 나타나기 시작하며, 시간이 경과함에 따라 색이 점차 진하게 된다. 정색반응을 나타내기 시작한 후 10~20분에 판정한다.

- 1) 정색반응이 양성대조와 같거나 진할 때는 양성으로 판정한다.
- 2) 정색반응이 양성대조보다 약할 때는 의양성으로 판정한다. 의양성으로 판정된 것은 재검사하여야 하며, 재검사결과도 의양성일 경우 중화시험으로 최종 판정한다.
- 3) 정색반응을 나타내지 않은 것은 음성으로 판정한다.
- 4) 양성대조가 정색반응을 나타내지 않거나, 음성대조가 정색반응을 나타냈을 때는 재시험하여야 한다.

※ 주의

검사실의 실온이 25℃ 이하일 때는 항원 항체반응이 미약하여 정색반응이 약하든가 또는 나타나지 않으며, 실온이 30℃ 이상일 때는 비특이반응이 발생하니 실온을 25~30℃로 유지하여야 한다.

이 간이 진단키트는 오제스키병 백신을 접종하지 아니한 돼지에 한하여 실시하여야 하며, 간이 진단키트법 검사결과 양성 또는 의양성으로 판정된 돼지에 대하여서는 감별진단법(gE항체감별 ELISA)으로 재검사를 실시하여 양성여부를 최종 판정한다.

<부 기>

부기1. 세포 증식용 배지

Eagle MEM	100ml
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
7.5% Sodium bicarbonate	2%
3% L-glutamin	1%
1M Hepes	1%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포 유지용 배지

Eagle MEM	100ml
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5% Sodium bicarbonate	2%
3% L-glutamin	1%
1M Hepes	1%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. Tris EDTA Buffer

50mM Tris base(Sigma T-1503)	6.05g
25mM EDTA salt(Sigma ED288)	8.4g
D.W	1,000ml
pH 8.7	

부기4. PBS(Phosphate buffered saline)

Pottassium phosphate	1.0%
NaCl	0.85%
D.W	100ml
pH 7.2	

부기5. Coating buffer

가) 원액

1) Na ₂ CO ₃	105.0g
D.W	1,000ml
2) NaHCO ₃	84.0g
D.W	1,000ml

나) Working solution

NaHCO ₃	45.3ml
Na ₂ CO ₃	18.2ml
D.W	936.5ml
pH 9.6	

돼지 파보바이러스 혈구응집억제반응 검사용 항원

Porcine Parvovirus Antigen, Haemagglutination-Inhibition Test

1. 정의

돼지 파보바이러스구조 단백질의 유전자를 함유한 곤충바이러스를 곤충세포에 감염시켜 만든 항원이며 돼지 파보바이러스 감염의 혈중 항체를 검출하기 위한 혈구응집 억제반응검사(haemagglutination-inhibition test, HI test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

돼지 파보바이러스 VP2 구조단백질의 유전자를 함유한 Baculovirus pVL93-VP2주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Sf9세포에 돼지 파보바이러스 VP2구조단백질의 유전자가 함유한 Baculovirus pVL93-VP2주를 0.1 M.O.I(multiplicity of infection)가 되게 접종하고 37℃에서 4~6일동안 배양한다. 세포변성 효과(cytopathic effect, CPE)가 80~90% 나타나면 2500rpm에서 15분간 원심분리하여 세포성분만을 수확하여 인산완충식염액(phosphate buffered saline, PBS)으로 3회 세척하고 세포배양액의 1/10배 PBS(부기2)에 부유시켜 세포파쇄(sonicator ; 16 micron, 30초씩 2회)한 후 -20℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

돼지 파보바이러스 HA항원은 기니피그 혈구의 응집성(HA)을 가지며 본 질병에 의한 번식장애질환을 일으킨 모돈의 혈청에 대하여 혈구응집억제(HI)반응을 하며 항체음성인 경우는 이병을 부정할 수 있으며 양성일 경우는 본 병의 감염을 의심할 수 있으나 확신할 수는 없다. 사산태자의 복수나 흉수 등 체액중의 HI항체를 증명하는 진단방법이 된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

곤충세포 (Sf9)를 사용한다.

3.1.2. 배지

Grace 배지 (부기1) 및 송아지 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

Sf9세포를 10% FBS가 포함된 Grace배지에 부유시켜 27℃에 4~5일간 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에서 CPE가 인정되어서는 아니된다.

3.2.2. 바이러스 감염세포배양

Sf9세포에 FBS가 포함되지 않은 Grace배지와 돼지 파보바이러스 VP2구조단백질의 유전자를 함유한 baculovirus (pVL93-VP2)가 0.1 M.O.I가 되게 넣고 1시간 동안 감염시킨 후 10% FBS가 들어있는 Grace배지로 교체한 후 37℃에서 4~6일 동안 배양하여 CPE가 80~90% 나타나는지 확인한다.

3.2.3. 바이러스 감염세포수확

CPE가 확인되면 2500rpm에서 15분간 원심분리하여 세포 성분만을 수확하여 PBS(부기2)로 3회 세척 후 세포배양액의 1/10배의 PBS에 부유시켜 sonication(16 micron, 30초씩 2회)한 것을 돼지 파보바이러스 혈구응집용 항원의 원액(32,000HA unit이상)으로 하며 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20℃이하의 냉장고에 보존한다.

3.2.4. 항원농도조절

항원을 원액검사의 역가시험 결과에 의하여 512HA unit 이상되게 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 역가시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

PBS(부기2), 기니픽 적혈구(부기3, 4), bovine serum albumin 및 U type microplate를 사용하여 항원의 혈구응집가시험을 실시한다.

3.3.2.2. HA test(antigen titration)

1) HA항원 또는 바이러스 항원을 96 well microplate 첫 번째 well에 50 μ l를 가한다.

2-2-2-04

- 2) 첫 번째 well부터 끝까지 PBS를 50 μ l씩 분주한다.
- 3) 50 μ l씩 첫 번째 well부터 11번까지 희석하고 마지막 50 μ l는 버린다.
12번째 well은 RBC control로 사용한다.
- 4) 0.6% 기니픽 RBC (0.2% bovine serum albumin in PBS) 50 μ l를 모든 well에 넣는다.
- 5) 실온에서 1~2시간 방치 후 최종응집 희석배수의 역수를 HA역가로 계산한다.

3.3.2.3. 판정

항원의 혈구응집역가가 512배 이상이어야 하며, 대조에서는 혈구응집이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.2.2에 의하여 조절된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 V-1에 의한 검사에 따라 불투명한 액체로 이물을 나타내서는 아니되며, 소분용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH는 6.2~6.6이어야 한다.

4.4. 역가시험

4.4.1. 재료 및 시험

항원역가를 측정하기 위하여 기니픽 적혈구를 이용하여 혈구응집시험을 실시한다. 항원의 동정은 표준항원과 검사품을 이용하여 돼지 파보바이러스 양성혈청 및 음성혈청을 이용하여 혈구응집억제 시험을 실시한다.

4.4.2. 판정

검사품의 혈구응집역가가 512 이상이어야 하며, 양성혈청에 대해서는 표준품과 검사품의 혈구응집억제 역가가 동일하여야 하며 음성혈청에 대해서는 역가가 인정되어서는 아니된다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 이하의 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) U plate를 사용한다.
- 2) 25 μ l의 혈청을 첫 번째, 두 번째 well에 넣는다.(Kaolin처리 및 혈구흡착된 혈청사용)
- 3) 두 번째 well부터 12번째 well까지 PBS를 25 μ l를 넣는다.
- 4) 두 번째 well부터 11번째 well까지 2진 희석한다.
- 5) 8 HAU의 돼지 파보바이러스 항원을 25 μ l씩 첫 번째 well부터 11번째 well까지 넣는다. 12번째 well에는 대조로 항원대신 PBS 25 μ l를 첨가한다.
- 6) 돼지 파보바이러스 양성 및 음성혈청을 대조로 두며, back titration을 실시한다.
- 7) 실온 또는 37℃에서 1시간 반응시킨 후 0.6% 기니픽 RBC(0.2% BSA in PBS)를 50ml씩 가한다.
- 8) 실온에서 1시간 방치 후 역가를 계산한다.

6.2. 판정

혈구응집억제가가 8배 이상이면 항체 양성으로 판정한다.

* 유의사항

- (1) Back titration이 8 HA unit로 정확하여야 한다.
- (2) 양성혈청은 640배로 음성혈청은 10배 이하로 판독되어야 한다. 야외 바이러스에 의한 감염은 모든 경우 640배 이상이다.
- (3) 돼지의 감염성 번식장애 진단 시 임신 70일령 이전(태아의 crown-rump의 길이가 16cm이하)태아는 항체 형성능이 없기 때문에 항원검출 또는 원인체 분리를 실시하여야 하며 임신 70일령 이후(17cm이상)는 태아의 혈청, 복수 등을 이용한 항체검출을 실시하여야 한다.

<부 기>

부기1. Grace 배지

Grace's medium powder (Gibico BBL)	46.3g
D.W	1000ml

증류수에 녹인 다음 magnetic bar를 이용 3~4시간 혼합한다.

최종 pH 6.2로 조정(10N NaOH 혹은 KOH용액 이용)

0.2 μ m filter를 이용하고 여과 한 후 4 $^{\circ}$ C에서 보관하며 사용한다.

부기2. 인산염완충액(phosphate buffered saline, PBS)

NaCl.....	8.0g
Na ₂ HPO ₄	1.1g
KH ₂ PO ₄	0.2g
KCl.....	0.2g
D.W	1000ml

최종 PH 7.2로 조정.

부기3. 기니픽 혈구

10ml 주사기에 Alsever's solution(부기4)을 5ml를 넣고 기니픽의 심장에서5ml 채혈한 후 PBS로 3회 원심(3,000rpm, 10분) 세척한다.

부기4. Alsever's solution

Glucose.....	2.05g
Sodium citrate.....	0.8g
Sodium chloride.....	0.42g
D.W	100ml

0.45 μ m여과지로 여과 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용한다.

돼지 생식기호흡기증후군바이러스 간접형광항체 검사용 키트

Indirect Fluorescent Antibody Test Kit against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

1. 정의

돼지 생식기 호흡기 증후군바이러스를 세포배양하여 그 배양세포를 65% 아세톤, 35% 알콜 혼합액으로 처리하여 마이크로플레이트에 흡착(PRRSV antigen coated plate)시키고 간접형광표식 2차항체를 이용하여 만든 키트이며 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 감염항체를 검사하기 위해 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

국내에서 분리한 돼지 생식기 증후군 바이러스 PL96-1주, 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스 주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

PRRS 바이러스 PL96-1주를 원숭이 유래 MA-104 배양세포에 접종하여 3~5일간 배양한 후 배양액을 -80°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

돼지 폐포 탐식세포(porcine alveolar macrophages)세포(MA-104세포)에서 CPE를 나타내며 증식한다. 최대 증식역가는 $10^{5.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 를 나타내며, chlorform 처리에 감수성을 가지며, 감염력을 상실한다. 단, 기니픽, 돼지, 양, 사람(O형) 적혈구에 혈구응집반응을 나타내지 않는다. 돼지의 불현성 감염이 많으며, 감염 후 수개월까지 바이러스를 배출한다. 감염증상은 번식장애와 호흡기장애의 2가지 증후가 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

MA-104 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

세포증식용 배지에 MA-104세포($2 \times 10^{5.0}$ /ml개)를 175cm² culture flask에 분주하여 37°C에서 24~48시간 배양한다.

3.2.2. 세포수확 및 세포 재 배양(plate배양)

Culture flask에 배양된 세포를 수집하여 96well plate에 100ml/well씩 분주하여 37°C에서 24~48시간 배양한다. 수확된 세포의 일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.3. 바이러스 배양

세포 배양 후 세포의 단층이 형성되었을 때 세포증식용배지를 제거하고 증독바이러스를 well당 100TCID₅₀/100 μ l를 접종한 후 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 1시간동안 흡착시킨 후 세포유지용 배지(부기2)로 세포를 1회 세척한 다음 5% FBS가 첨가된 α -MEM배지(부기2) 200 μ l씩 분주하여 37°C에서 2~3일간 배양 관찰한다.

3.2.4. 항원 조직배양 plate제작

바이러스 배양 후 적절한 CPE가 (well당 10개정도)가 출현하였을 때 plate의 well에 배지를 완전히 제거하고 PBS(부기3)로 1~2회 세척하고 37°C에서 습기가 완전히 제거될 때까지 건조시킨다. 건조된 plate well의 바이러스 감염세포를 65% cold acetone, 35% 알콜 혼합액으로 10분간 고정한 후 포장하여 -20°C에 냉장 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 특이성시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

PRRS 표준양성 혈청과 대조음성혈청을 1:10으로 희석하여 plate well 세포에

100 μ l씩 각각 IFA plate에 접종한 후 밀봉하여 37°C에서 1시간동안 반응하고 PBS를 각 well에 300 μ l씩 가하여 3~5회 세척한 다음 용액을 완전히 제거하고 적정농도를 희석한 anti-swine IgG FITC conjugate(1:200)를 각 well에 50 μ l씩 분주한다. 그리고 밀봉한 후 37°C에서 30~60간 배양한다. PBS를 well당 300 μ l씩 가하여 3~5회 세척한 다음 용액을 완전히 제거하고 형광현미경으로 경검한다.

3.3.3.2. 판정

표준양성혈청은 PRRS 바이러스 감염세포의 세포질 내 황록색의 특이 형광이 인정되어야 하며, 대조음성혈청은 특이형광을 나타내지 않아야 한다.

3.4. 최종 간접형광항체 키트

3.2.4와 같이 MA 104 배양세포에 PRRS PL96-1 바이러스를 감염시킨 후 고정된 plate, 형광항체표식 2차 항체(anti-swine IgG FITC conjugate), 양성 및 음성대조혈청으로 구성된다.

3.5. 포장 및 보관

고정된 PRRS 바이러스 감염세포 plate를 포장하여 -20°C에 보존한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.2. 진단 반응 확인시험

4.2.1. 재료 및 시험

1. 가검혈청의 수량에 따라 PRRS 바이러스 형광항체용 plate의 strip을 떼어내어 plate frame에 조립하고 검사용지에 가검혈청의 번호 및 위치를 기록한다.
2. 희석용 plate에 가검혈청 10 μ l와 PBS 90 μ l를 넣어 1:10으로 희석, 혼합한다. 이때 양성대조 및 음성대조도 같이 희석하여 준비한다.
3. 희석한 혈청과 양성, 음성대조 100 μ l를 각각 IFA용 plate에 정확히 접종한다.
4. 밀봉한 다음 37°C에서 1시간동안 반응한다.
5. PBS를 각 well에 300 μ l씩 첨가하여 3~5회 세척한 다음, 용액을 완전히 제거한다.
6. 적정농도로 희석한 anti-swine IgG FITC conjugate(1:200)를 각 well에 50

μl씩 분주한다.

7. 밀봉한 다음 37℃에서 30분~1시간 배양한다.

8. PBS를 well당 300μl씩 가하여 3~5회 세척한 다음, 용액을 완전히 제거하고 형광현미경으로 검정하여 판독한다.

4.2.2. 판정

형광현미경으로 관찰하여 표준 양성혈청 및 별도 양성혈청은 돼지 생식기 호흡기증후군 바이러스 감염세포의 세포질에 황록색의 특이형광을 나타내야 하며, 표준 음성혈청 및 별도 음성혈청은 특이형광을 나타내지 않아야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

PRRS 검사 키트는 밀봉상태로 -20℃이하의 냉동고에 보존하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

1) 시약 및 기구

가. PRRS 바이러스 형광항체용 플레이트(PRRSV antigen coated plate)

나. 형광(FITC)표식 2차 항체 (100X anti- swine IgG FITC conjugate)
- 사용전에 인산완충액으로 100배 희석하여 사용한다.

다. 양성대조(positive control) 및 음성대조(negative control)

라. 10X 인산완충액(PBS)

① 10X 인산완충액의 제조방법

NaCl	85.0g
Na ₂ HPO ₄	16.7g
NaH ₂ PO ₄	5.7g
NaN ₃	0.1g
D.W.	to 1.0L

* 제조 시 시약을 멸균증류수 800ml에 용해하고 pH 7.4로 조정한 다음, 최종 용량이 1ℓ 되게 증류수를 첨가한다.

** 제조한 10X 인산완충액은 냉장보관하며 사용 시 증류수로 10배 희석하여 사용한다. 희석한 인산완충액(1X)은 1주일 이내에 사용한다.

마. 혈청희석용 플레이트

바. 마이크로 피펫, 형광현미경

2) 검사재료

가검혈청을 56℃에 30분간 처리하여 비동화 한 다음, 검사 시에는 혈청을 인산완충액(PBS)으로 1:10 희석하여 검사에 사용한다.

3) 검사방법

가. PRRS 바이러스 형광항체용 plate의 strip을 떼어내고 plate frame에 조립하고 검사용지에 가검 혈청의 번호 및 위치를 기록한다.

나. 희석용 plate에 가검혈청 10 μ l와 PBS 90 μ l를넣어 1:10으로 희석, 혼합한다. 이때 양성대조 및 음성대조도 같이 희석하여 준비한다.

다. 희석한 혈청과 양성, 음성대조 100 μ l를 각각 IFA용 plate에 정확히 접종한다.

라. 밀봉한 다음 37℃에서 1시간 동안 배양한다.

마. PBS를 각 well에 300 μ l씩 첨가하여 3~5회 세척한 다음, 용액을 완전히 제거한다.

바. 적정농도로 희석한 FITC anti-swine IgG FITC conjugate를 각 well에 50 μ l씩 분주한다.

사. 밀봉한 다음 37℃에서 30분~1시간 동안 배양한다.

아. PBS를 well당 300 μ l씩 가하여 3~5회 세척한 다음, 용액을 완전히 제거하고 형광현미경으로 검경하여 판독한다.

4) 판정기준

황록색의 특이 형광세포가 관찰되면 항체 양성으로 판독한다.

* 유의사항

- 양성 및 음성대조를 반드시 같이 검사하여 결과를 비교 판독한다.
- 검사재료(혈청, 태아홍수)의 상태에 따라 비특이 형광반응이 나타나 판독에 오류가 있을 수 있으므로 소정의 교육을 받은 경험이 충분한 실험자가 판독하여야 한다.
- 검출된 항체가 예방접종에 의한 것인지 또는 야외 바이러스 감염에 의한 것인지는 감별할 수 없으므로 사전에 해당농장의 PRRS 예방접종 실시 여부를 파악하여야 한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

α-MEM	430ml
Non-essential amino acid	100 X 5ml
L-glutamin	100 X 5ml
Sodium pyruvate	100 X 5ml
FBS(Gibco BRL 16000-044)	10% 50ml
Antibiotic	100 X 5ml

부기2. 세포유지용 배지

Hybridoma	300만개이상
α-MEM	7ml
DMSO	1ml
FBS	2ml

부기3. 인산완충식염수(Phosphate buffered saline, PBS)

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride	0.2g
Disodium hydrogen orthophosphate(anhydrous)	1.15g
Potassium dehydrogen	0.2g
D.W	1,000ml

최종 pH가 7.3이 되게 조정하여 15 Lb에서 15분간 멸균 후 사용한다.

돼지콜레라(열병) 항체검사(ELISA)키트

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit against Classical Swine Fever

1. 정의

돼지콜레라 유전자 재조합 바이러스(recombinant baculovirus, BacHCgp55)를 SF21 세포에 배양하여 생산된 gp55 단백질을 정제하여 만든 항원을 마이크로 플레이트에 흡착시키고 효소와 기질을 이용하여 만든 효소결합 면역측정법용 키트이며 돼지콜레라 바이러스의 감염항체 검사에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

Recombinant baculovirus HCgp55TN주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 바이러스 주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

SF21세포를 Grace's media에 송아지 혈청을 10% 첨가한 세포증식용 배지에 50~10만개/ml를 부유시켜 37°C에서 24시간 배양한 후 세포증식용 배지를 제거하고 돼지콜레라 바이러스 gp55 유전자 재조합 바이러스(recombinant baculovirus HCgp55TN주)를 0.5~1.0 M.O.I(multiplicity of infection)되게 접종하여 37°C에서 1시간 감작시킨 후 세포유지용 배지로 교환하고 37°C의 CO₂배양기에서 2~3일간 배양 후 감염배양액을 -80°C이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

SF21세포에 종독을 접종하였을 때 재조합바이러스 특유의 CPE가 나타나야하며 재조합 단백질은 돼지콜레라 양성혈청과 반응하는 것을 형광 항체법으로 확인되며 또한 기니픽 근육내 접종 시 부작용이 없으며 돼지콜레라 바이러스의 중화항체를 생산한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포

SF21 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지 및 세포유지용 배지는 Grace's media에 fetal bovine serum 을 10% 첨가한 배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

세포증식용 배지에 SF21 배양세포를 37°C의 CO₂배양기에서 2~3일 간격으로 계대배양 사용한다.

3.2.2. 바이러스 배양

세포배양 후 단층이 형성되었을 때 세포증식용 배지를 제거하고 재조합 baculovirus(BacHCgp55주)를 0.5~1 M.O.I 되게 접종하여 5일간 배양한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 배양 후 CPE가 80~90%이상 출현하였을 때 배양액을 1,000g에서 20분간 원심 후 상층액을 수확한다.

3.2.4. 항원(gp55 단백질) 정제

원심 수확한 상층액을 immunoaffinity chromatography법으로 정제한다. 정제 방법은 먼저 CNBr-activated sepharose 4B(Pharmacia)에 anti-gp55 monoclonal antibody를 제조자 manual에 따라 coupling한 다음 anti-gp55 항체가 coupled된 이 bead를 gp55가 발현된 배양상층액 50ml과 4°C에서 overnight 반응시킨다. 반응 후 bead를 PBS로 3회 세척하고 column에 packing한다. Elution buffer(0.1M glycine buffer, pH3.0)를 넣어 0.5ml씩 fraction을 수확하고 3M Tris-Cl(pH10)로 중화한다. 각 fraction을 2배씩 계단희석하여 nitrocellulose membrane에 dot하고 anti-gp55 monoclonal antibody로 gp55가 함유된 fraction을 확인한다. 확인된 fraction을 pooling하여 150mM NaCl 용액으로 투석하여 수거한다.

3.2.5. 항원역가 확인시험

정제된 항원은 coating buffer(부기1)를 사용하여 96well plate에 2배단계로 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응한다. Gp55항원이 coating된 plate에 양성 및 음성 대조혈청을 20배 희석하여 VI.사용방법에 따라 ELISA를 실시하고, 양성대조 혈청의 흡광도가 0.5이상, 음성대조혈청의 흡광도가 0.3이하인 항원농도를 최적 항원 희석농도로 결정하고 이 정제 항원을 최종원액으로 사용한다.

3.2.6. 항원흡착

3.2.5에 의하여 결정된 항원 농도로 희석한 항원을 immunoassay용 플레이트에 100 μ l씩 분주한 후 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 흡착한다. 흡착이 끝난 항원을 플레이트에서 버린 후 ELISA 세척용액으로 1회 세척 후 blocking buffer (부기2)를 200 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응한다. 반응 후 washing buffer (부기3)로 1회 세척한 다음 30분 동안 완전 건조시키고 진공 포장하여 4 $^{\circ}$ C에 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 진단반응 확인시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

<별첨 1>의 방법에 따라 실시한다.

3.3.2.2. 판정

<별첨 2>에 의해 흡광도를 산출한다.

양성혈청대조의 흡광도는 0.5이상, 음성혈청대조의 흡광도는 0.3이하이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의한다.

3.5. 검사키트 포장

아래 사항의 자재를 비닐봉지에 동봉 포장하여 4 $^{\circ}$ C 냉암소에 보관한다.

- 1) CSFV gp55 흡착 플레이트(CSFV gp55 coated plate) 5개
- 2) 혈청희석용 플레이트(serum dilution plate) 5개
- 3) 10X 세척액(10X washing solution) 200ml
- 4) 2X 혈청희석액(2X dilution buffer) 200ml
- 5) 100X HRPO conjugate (horseradish-peroxidase anti-swine IgG) 500 μ l
- 6) 양성혈청대조(positive control) 100 μ l
- 7) 음성혈청대조(negative control) 100 μ l
- 8) 발색제(ABTS substrate) 50ml
- 9) 정지액(stop solution) 50ml

상기의 시액들은 각각 1병

4. 검사방법

4.1. 특성시험

포장된 96 well plate는 재조합 단백질을 코팅하여 건조시킨 플레이트로 성상이 균일하고 세균 발육이나 기타 이물이 없어야 하며 동봉한 세척액, 혈청희석액, 발색제, 정지액, HRPO anti-swine conjugate, 양성 및 대조 혈청의 내용물 성상이 균일하고 세균, 곰팡이 발육이 없어야 한다.

4.2. 유효성 시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) HCV항원이 coating된 ELISA plate를 실온에서 20~30분간 방치한 후 비닐 팩에서 꺼낸 다음 혈청희석용 plate와 동일하게 표기를 한다.
- 2) ELISA plate에 blocking reagent를 1%(w/v)되도록 serum dilution buffer에 녹인 다음 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다.
- 3) ELISA plate에 있는 blocking buffer를 완전히 털어버리고 미리 혈청희석용 plate에 20배 희석한 양성혈청대조와 음성혈청대조를 HC ELISA plate에 각각 100 μ l씩 2well에 분주한다.
 - 한 종류의 혈청을 분주한 후 사용한 tip은 버리고 각각의 혈청 시료마다 반드시 새 tip을 사용한다.
 - 혈청희석용 plate에서 HC ELISA plate로 재분주하는 과정은 되도록 빠르고 정확하게 실시한다.
- 4) 37°C에서 1시간 반응시킨다.
- 5) ELISA plate내에 희석된 혈청용액을 털어버리고 희석된 washing buffer 200 μ l를 모든 well에 분주한 후 바로 털어버린다. 이 과정을 5회 반복한다.
- 6) 5번째 washing buffer를 넣은 뒤 37°C에서 5분간 놓아둔 뒤 털어버리고 well 내에 물기가 남지 않도록 plate를 거꾸로 들고 paper towel 위에 여러번 쳐서 물기를 제거한다.
 - 위의 세척 방법은 모든 ELISA test에서 매우 중요한 과정이므로 언급한

대로 잘 따라 주시기 바라며, 물기를 털어버린 후 well이 마르지 않도록 특히 주의 바랍니다.

- 7) 준비된 HRP conjugate solution을 전 well에 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
- 8) 전 well을 5)-6)번 방법대로 5회 세척한 후 물기를 제거한다.
- 9) 발색제 A용액(No.5)과 B용액을 1:1로 섞은 substrate solution을 전 well에 100 μ l씩 분주하고 발색한다.
- 10) 5분 동안 발색시키고 stop solution을 100 μ l씩 첨가하여 반응을 중지시킨다.
 ※ 주의 : 육안으로 보아 양성혈청대조의 발색반응이 5분 후에도 잘 안될 경우 발색제 반응시간을 7~10분까지 지연시켜 발색을 유도할 수 있음.
- 11) 알콜솜으로 ELISA plate바닥을 깨끗이 닦은 다음 먼지가 없는 종이로 다시 plate바닥의 물기를 제거하고 405nm에서 흡광도(OD)를 측정한다.

6.2. 판정

양성혈청대조의 흡광도는 0.5이상, 음성혈청대조의 흡광도는 0.3이하이어야 한다.

<별첨1> 진단반응 확인시험

가. 재료 및 시액

1) 키트에 포함되어 있는 시약들

- (1) CSFV gp55 흡착 플레이트(CSFV gp55 coated plate) 5개
- (2) 혈청희석용 플레이트(serum dilution plate) 5개
- (3) 10X 세척액(10X washing solution) 200ml
- (4) 2X 혈청희석액(2X dilution buffer) 200ml
- (5) 100X HRPO conjugate(horseradish-peroxidase anti-swine IgG) 500ml
- (6) 양성혈청대조(positive control) 100 μ l
- (7) 음성혈청대조(negative control) 100 μ l
- (8) 발색제(ABTS substrate) 50ml
- (9) 정지액(stop solution) 50ml

2) 검사 시 필요한 장비 및 소품

- (1) 마이크로 피펫 및 팁
- (2) 8 또는 12채널 마이크로 피펫
- (3) 피펫 및 피펫에이드
- (4) 증류수(시판 주사용 증류수 사용가능)
- (5) ELISA reader(405nm filter)

3) 시액

- (1) 1X 세척액
20ml의 10X washing solution 180ml의 증류수와 잘 혼합하여 사용한다.
- (2) 1X 세척액
20ml의 2X serum dilution buffer를 20ml의 증류수와 잘 혼합하여 사용한다.
- (3) HRPO conjugate의 준비
HRPO conjugate(100X)를 1X serum dilution buffer로 100배 희석하여 사용한다.
- (4) Substrate 및 stop solution 준비
ABTS substrate 는 사용 전에 꺼내 실내온도와 비슷하게 유지시킨 후 사용한다.
Stop solution에 결정이 형성된 경우 37 $^{\circ}$ C에서 완전히 녹인 후 사용한다.

나. 시험방법

- 1) 키트에 포함된 혈청희석용 plate에 1X serum dilution buffer를 250 μ l씩 분주한다.
- 2) 개체별로 가검혈청 및 양·음성혈청 대조를 각각 13 μ l씩 분주한다.
- 3) 사용 전 실온에 방치한 CSFV gp55 흡착 플레이트에 나 항에서 20배로 희석한 가검 및 대조 혈청을 각각 100 μ l씩 분주한다.
- 4) 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
- 5) 혈청용액을 털어 버리고 1X washing solution 200 μ l를 모든 well에 분주한 후 바로 털어 버린다. 이러한 세척과정을 3회 반복한다.
- 6) 마지막 세척을 제거하고 well내에 물기가 남지 않도록 plate를 거꾸로 들고 paper towel위에 여러번 쳐서 물기를 제거한다. 이때 물기를 털어 버린 후 well이 마르지 않도록 주의해야 한다.
- 7) 준비된 HRPO conjugate를 100 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 시킨다.
- 8) 위의 6)의 방법대로 세척한다.
- 9) 발색제를 100 μ l씩 분주한다.
- 10) 10분 후 적정시점에서 stop solution을 100 μ l씩 첨가하여 반응을 중지한다.
- 11) ELISA 판독기의 405nm에서 흡광도를 측정한다. 정확한 측정을 위하여 plate의 well 내 공기방울을 제거하여 판독한다.

<별첨2> 흡광도산출법

- 1) 양성혈청대조 및 음성혈청대조의 OD 평균값을 산출한다.
- 2) 양성혈청대조 평균 OD값에서 음성혈청대조 평균 OD 값을 빼서 corrected positive control(CPC)을 산출한다.
 - ※ $CPC = \text{양성혈청대조 평균 OD} - \text{음성혈청대조 평균 OD}$
- 3) 아래의 식에 따라 sample to positive(S/P) ratio을 산출한다.
 - ※ $S/P \text{ ratio} = \frac{\text{가검혈청 평균 OD} - \text{음성혈청대조 평균 OD}}{\text{Corrected positive control(CPC)}}$

<부 기>

부기1. Coating buffer

Na ₂ CO ₃	0.376g
NaHCO ₃	0.542g
NaCl	1.462g
D.W	200ml
pH 9.6	

부기2. Blocking 및 Dilution buffer

Skim milk	5g
Lactoalbumin	5g
PBST	100ml

부기3. Washing buffer

PBS	1000ml
Tween-20	0.5ml

돼지 유행성 설사바이러스 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Porcine Epidemic Diarrhea Virus

1. 정의

돼지 유행성 설사 바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성항체 생산 잡종세포 7G7주를 증식시켜 만든 단클론성 항체이며 돼지 유행성 설사 바이러스 검사에 사용한다.

2. 제조용 세포

2.1. 세포주

돼지 유행성 설사 바이러스 특이 항체를 분비하는 hybridoma7G7주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 잡종세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 유행성 설사 바이러스 특이항체를 생산하는 hybridoma7G7주를 세포증식용배지(부기1)에 증식시킨 후 그 상층액을 형광항체법으로 확인하고, hybridoma7G7주를 수확하여 세포유지용 배지(부기2)와 혼합하여 세포를 -70℃에서 하룻밤 얼린 후 액체질소에 동결보존한다.

2.3. 성장 및 독력

돼지 유행성 설사 바이러스 단클론성항체는 돼지 유행성 설사 바이러스에 대한 중화능이 없다. 돼지 유행성 설사 바이러스를 감염시킨 세포주 및 감염돼지의 소장을 동결 절편한 세포의 세포질에 특이적으로 반응하여 결합한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

돼지 유행성 설사바이러스의 특이항체를 생산하는 hybridoma 7G7주를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 잡종세포배양

세포증식용 배지에 hybridoma 7G7주를 3~5일간 배양한다.

3.2.2. 잡종세포수확

돼지 유행성 설사특이항체 생산 hybridoma7G7주의 증식을 확인 한 후 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20℃이하의 냉장고에 보존한다.

3.2.3. 항체농도조절

항체는 원액검사의 항체가 형광항체법 시험 결과에 의하여 8배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균검사

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가측정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

Vero세포, α -MEM, trypsin, PBS(부기3), slide glass, acetone, anti-mouse IgG FITC conjugate 및 mounting buffer(부기4)를 사용한다. 돼지 유행성 설사 바이러스를 Vero세포에 감염시킨 후 50%의 CPE가 일어났을 때, 80% acetone (-20℃)으로 10분간 고정한 후 건조시킨다. 생산된 항체를 2배 계단 희석하여 고정된 세포에 100 μ l 분주한 후 30분간 반응시킨다. 이후 PBS(부기3)로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse IgG FITC conjugate를 100 μ l 분주 후 30분간 반응시킨 다음 PBS(부기3)로 3회 세척한다. Mounting buffer로 cover slide를 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

돼지 유행성 설사 바이러스에 감염된 Vero세포의 세포질에 특이 형광이 8배 이상에서 관찰되어야 하며 대조세포에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 특이성 시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지 유행성 설사병바이러스 특이항체의 cover slide 표본 또는 돼지 유행성 설사 바이러스 감염돼지의 박절표본과 대조로서 정상 배양세포 또는 건강한 돼지의 소장조직의 박절표본을 직접법에 의하여 검사품으로 37℃에서 60분간 반응하고 형광염색하여 형광 현미경으로 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

돼지 유행성 설사 바이러스 특이항체의 감염세포 또는 감염돼지의 장관임파조직에서는 특이형광을 나타내나 대조세포와 건강한 돼지의 장관임파조직 표본에서는 이와 유사한 특이 형광이 나타나지 아니하여야 한다.

3.3.4. 목적 외 항체 부정시험

돼지 로타바이러스, 돼지 일본뇌염 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 돼지 코로나 바이러스, 돼지 전염성 위장염바이러스와 교차반응을 나타내지 않아야 한다.

3.3.5. 항원저지 시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

검체 3.3.3.1의 재료 및 시험에 따라 제작된 감염재료에 중화항체가 1,000배 이상의 돼지 유행성 설사 바이러스균의 항혈청 및 음성혈청으로 처리하고 세척, 건조한 후 각각 시험품을 염색하여 형광 현미경으로 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

돼지 유행성 설사 바이러스 면역혈청을 전처리한 표본에서는 특이 형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화되어야 하고 중화항체 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항체농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 맑은 분홍빛의 액체로 이물이 나타내서는 아니 되며, 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온 농도는 7.0~7.2 이어야한다.

4.4. 특이성시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 항원저지시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 이하 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 돼지 유행성 설사병으로 의심되는 자돈의 소장조직을 동결절편한 후 slide glass위에 올린 다음 완전히 건조시킨다.
- 2) 100% cold acetone(-20℃에 보관)으로 10간 고정한 후 건조시킨 다음 메니큐어로 구획을 만든다.
- 3) 1차 항체(돼지 유행성 설사바이러스 단클론 항체)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 4) PBS로 1분씩 5회 세척한다,
- 5) 2차 항체(anti-mouse IgG FITC conjugate)를 올린 후 실온에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 6) Conjugate를 제거한 후 PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 7) Slide glass위에 mounting buffer를 올린 후 cover slide를 덮고 형광현미경으로 검사한다.

6.2. 판정

선명한 형광이 조직의 세포질 내에서 관찰이 되면 돼지유행성 설사바이러스 감염으로 판정한다.

* 유의사항

형광항체 검사시 비특이적인 형광이 관찰될 수 있으니 주의하고 세포질 내 강한 형광이 관찰될 때 양성으로 판정한다.

<부 기>

부기1. MCA 생산용 배지

α-MEM	430ml
Non-essential amino acid	100 X 5ml
L-glutamin	100 X 5ml
Sodium pyruvate	100 X 5ml
FBS(Gibco BRL 16000-044)	10% 50ml
Antibiotic	100 X 5ml

부기2. 세포유지용 배지(cell freezing medium)

Hybridoma	300만개 이상
α-MEM	7ml
DMSO	1ml
FBS	2ml

부기3. 인산염완충식염액(PBS)

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride	0.2g
Disodium hydrogen orthophosphate(anhydrous)	1.15g
Potassium dehydrogen	0.2g
D.W	1,000ml

최종 pH가 7.3이 되게 조정하여 15Lb에서 15분간 멸균 후 사용한다.

부기4. Mounting buffer

Glycine	0.42g
Sodium hydroxide	0.2g
Sodium chloride	0.51g
Sodium azide	0.03g

상기시약을 증류수 30ml에 녹인 후 glycerine 70ml을 첨가

돼지 뇌심근염 혈구응집억제반응 검사용 항원

Porcine Encephalomyocarditis Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

돼지 뇌심근염 바이러스를 조직배양하여 만든 항원이며 돼지 뇌심근염의 혈중항체를 검출하기 위한 혈구응집억제반응검사(haemagglutination inhibition test ; HI test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스 주

돼지 뇌심근염바이러스 K3주 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정하는 바이러스주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 뇌심근염 바이러스를 단층이 형성된 BHK-21주화세포에 바이러스를 접종하여 37℃에서 2~3일 배양한 후 접종 바이러스에 의한 세포변성효과가 약80%일어났을 때 바이러스 감염배양액을 수확하여 -70℃ 이하에 동결보존한다.

2.3. 성상 및 독력

세포증식용 배지(부기1)에 바이러스를 접종하여 37℃에서 배양했을 때 세포변성효과가 일어나며 기니픽, 양 및 사람 "O"형 혈구에 대해 응집능을 가지며 포유마우스 뇌내 접종시 2일 내에 폐사한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

햄스터 신장세포(BHK-21)를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 세포배양

BHK-21세포를 세포증식용 배지에 부유시켜서 배양병에 분주하여 37℃에서 세포단층이 형성할 때까지 배양한다. 바이러스 접종전의 배양세포에 CPE가

인정되어서는 아니된다.

3.2.2. 바이러스 배양

배양된 단층세포에 돼지 뇌심근염바이러스 배양액을 접종하여 37℃에서 3~4일 회전배양하여 세포변성효과가 약 80%이상 일어났을 때 감염배양액을 채취하여 바이러스 부유액을 생산한다.

3.2.3. 바이러스 수확

바이러스 부유액을 3회의 동결 용해를 거친 후 8,000rpm에 30분간 원심하여 세포편을 제거한 상층 바이러스액을 항원 원액으로 사용한다.

3.2.4. 항원농도조절

항원은 원액검사의 역가시험의 결과에 의하여 512 HA unit 이상이 되도록 조절한다.

3.2.5. 바이러스 불활화

바이러스의 감염배양액의 일부는 원액검사로 사용하고 나머지 배양액은 포르말린의 최종농도가 0.2%가 되도록 가한 후 실온에서 3시간 진탕하면서 불활화 한 다음 5℃냉실에 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 미립 바이러스 부정시험

생산한 원액은 돼지파보바이러스, 돼지콜레라바이러스, 일본뇌염바이러스를 검사하여 모두 음성이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

불활화한 검사품을 원심하여 인산완충 식염수로 희석하여 4℃에서 하룻밤 투석한 후 불활화제를 제거하여 시험재료로 한다. BHK-21 주화세포를 시험관에 배양하여 단층이 형성되면 배양액을 제거하고 시험재료를 0.1ml 씩 10개 이상의 시험관에 접종한 후 37℃에서 약 1시간 방치한 다음 세포유지용 배지를 가하여 37℃에서 5일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

BHK-21 배양세포에서 세포변성효과 및 혈구응집성이 인정되어서는 아니 된다.

3.3.5. 역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

Borate saline buffer(부기3), Borate KCl buffer (부기4), U type microplate, 기니픽 RBC(부기5,6) 및 bovine serum albumin을 사용하여 항원의 혈구 응집가 시험을 실시한다.

3.3.5.2. HA test(antigen titration)

- 1) Borate saline buffer 50 μ l를 각 well(U type microplate)에 분주한다.
- 2) 50 μ l의 항원을 첫 번째 줄에 주입한 후 2배 계단희석하고 마지막 희석액 50 μ l를 버린다. 마지막 well은 RBC control로 사용한다.
- 3) 0.4% 기니픽 RBC (0.2% bovine serum albumin in borate KCl buffer)를 50 μ l를 모든 well에 넣는다.
- 4) 실온에서 1시간 방치 후 최종 응집 희석배수의 역수를 HA역가로 계산한다.

3.3.5.3. 판정

항원의 혈구응집 역가가 512배 이상이어야 하며, 대조에서는 혈구응집이 인정되어서는 아니된다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항체를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법의 IV-1에 의한 검사에 따라 유백색의 액체로서 정치하면 약간의 침전층이 생기나 진탕하면 용이하게 균등한 액이 된다. 이 물이 나타나서는 아니 되며, 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 방부제 정량 시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-7에 의한 검사에 따라 포르말린 함유량이 0.2% 이하 이어야 한다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 pH가 6.4~7.4 이어야 한다.

4.5. 불활화확인 시험

3.4.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.4.5에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 이하의 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) U plate를 사용한다. (V plate를 사용하는 것보다 판독하기 용이하다.)
- 2) 25 μ l의 Kaolin처리를 한 혈청을 첫 번째, 두 번째 well에 넣는다.
- 3) 두 번째 well부터 12번째 well까지 borate KCl buffer를 25 μ l를 넣는다.
- 4) 두 번째 well부터 11번째 well까지 2진 희석한다.
- 5) 8 HA unit의 돼지 뇌심근염 바이러스 항원을 25 μ l씩 첫 번째 well부터 11번째 well까지 넣는다. 12번째 well에는 borate KCl buffer를 25 μ l를 첨가한다.(serum control)
- 6) Wrap으로 싸서 실온 또는 37℃에서 1시간 반응시킨 후, 0.4% 기니픽 RBC(0.2% BSA in borate KCl buffer)를 50 μ l씩 가한다.
- 7) 양성 및 음성혈청을 대조로 두며, Back titration을 실시한다.
- 8) 37℃에 30분간 정치 후 응집이 억제된 최고 희석배수의 역수를 역가로 계산한다.

6.2. 판정

혈구응집억제가가 10배 이상이면 항체 양성으로 판정한다.

* 유의사항

- (1) Back titration이 8 HA unit로 정확하여야 한다.
- (2) 양성혈청은 512배로 음성혈청은 10배 이하로 판독되어야 한다. 판매되는 백신이 없기 때문에 10배 이상이면 야외 바이러스에 의한 감염으로 판정된다. 돼지의

2-2-2-08

감염성 번식장애 진단시 임신 70일령 이전(태아의 crown-rump의 길이가 16cm 이하)태아는 항체 형성능이 없기 때문에 항원검출 또는 원인체 분리를 실시하여야 하며 임신 70일령 이후(17cm이상)는 태아의 혈청, 복수 등을 이용한 항체검출을 실시하여야 한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

Eagle's MEM용해액	100ml
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	10%
7.5%Sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기2. 세포유지용 배지

Eagle's MEM용해액	100ml
Lactoalbumin hydrolysate	0.5%
Tryptose phosphate broth	5%
Fetal bovine serum	5%
7.5%Sodium bicarbonate	2%
Fungizone	0.025 μ g/ml
Penicillin G-Na	200unit/ml
Streptomycin	100 μ g/ml

부기3. Borate saline buffer (pH 9.0)

1.5M NaCl	80ml
0.5M H ₃ BO ₃	100ml
1N NaOH	24ml
D.W	1,000ml

2-2-2-08

부기4. Borate KCl buffer (pH 8.0)

H ₃ BO ₃	3.09g
KCl	8.95g
D.W	1000ml

실온에 보관하고 사용할 때 Bovine serum albumin을 0.2% 되게 첨가하여 사용한다.

부기5. 기니픽 혈구

10ml 주사기에 Alsever's solution(부기6)을 5ml를 넣고 기니픽의 심장에서 5ml 채혈한 후 PBS로 3회원심(1,500rpm, 10분) 세척한다.

부기6. Alsever's solution

Glucose	2.05g
Sodium citrate	0.8g
Sodium chloride	0.42g
D.W	100ml

0.45 μ m 여과지로 여과 후 4℃에 보관하면서 사용한다.

돼지 전염성위장염바이러스 검사용 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Porcine Transmissible Gastroenteritis Virus

1. 정의

돼지 전염성위장염 바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성항체 생산 잡종세포(hybridoma)를 증식시켜 만든 단클론성항체이며 돼지 전염성 위장염바이러스 검사에 사용한다.

2. 제조용 세포

2.1. 세포주

돼지 전염성위장염 특이 항체를 분비하는 잡종세포(hybridoma) 또는 국립수의 과학검역원에서 인정하는 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 전염성위장염 특이항체를 분비하는 hybridoma 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 증식시킨 후 그 상층액을 형광항체법으로 확인하고, hybridoma 세포를 수확하여 세포유지용 배지(부기2)와 혼합하여 세포를 -70°C 에서 하룻밤 얼린 후 액체질소에 동결보존한다.

2.3. 성상 및 독력

돼지 전염성 위장염 바이러스에 대한 단클론성 항체는 돼지 전염성위장염 바이러스를 감염시킨 세포주 및 감염자돈의 소장 동결절편한 세포의 세포질에서 특이적으로 결합한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

돼지 전염성위장염 특이항체를 생산하는 hybridoma 세포주를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 잡종세포배양

세포증식용 배지에 돼지 전염성위장염 특이항체 생산 hybridoma 세포를

3~5일간 배양한다.

3.2.2. 잡종세포수확

Hybridoma 세포의 증식을 확인 한 후 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20℃에 보존한다.

3.2.3. 항체농도조절

항체는 원액검사의 항체가 측정시험결과에 의하여 16~32배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가측정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

ST세포, α-MEM, PBS(부기3), slide glass, cover slide, acetone, anti-mouse, IgG FITC conjugate 및 mounting buffer(부기4)를 사용한다. 돼지 전염성위장염 바이러스를 ST세포에 감염시킨 후 50%의 CPE가 일어 났을 때, 80% acetone (-20℃)으로 10분간 고정된 후 건조시킨다. 생산된 항체를 2배 계단 희석하여 고정된 세포에 100μl분주한 후 30분간 반응시킨다. 이후 PBS(부기 3)로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse IgG FITC conjugate를 100μl분 주 후 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척한다. Mounting buffer(부기3) 로 cover slide를 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

전염성위장염 바이러스에 감염된 세포의 세포질에 특이 형광이 8배 이상 에서 관찰되어야 하며 대조세포에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 특이성시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지 전염성위장염 바이러스 감염배양세포의 카바스립표본 또는 돼지 전염성위장염 감염돼지의 장관조직의 동결박절표본과 대조로서 정상 배양 세포 또는 건강한 돼지의 장관조직의 박절표본을 직접법에 의하여 시험품 으로 37℃에서 60분간 반응하고 형광염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

돼지 전염성위장염 바이러스의 감염세포나 감염 돼지의 장관조직에서는 특이형광을 나타내나 대조세포와 건강한 돼지의 장관조직 표본에서는 이와 유사한 형광이 전혀 나타나지 아니하여야 한다.

3.3.4. 목적외 항체 부정시험

돼지 유행성 설사바이러스 및 돼지 로타바이러스와 교차반응을 나타내지 않아야 한다.

3.3.5. 항원저지시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

3.3.3.1의 재료 및 시험에 따라 제작된 감염재료에 중화항체가 1,000배 이상의 돼지 전염성 위장염 바이러스 항혈청 및 음성혈청을 전처리하고 세척, 건조한 후 각각 시험품을 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

돼지 전염성위장염 면역혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화 되어야 하고 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3의 조절된 항체농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 맑은 분홍빛의 액체로 이물이 없으며, 소분된 용기마다 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 7.0~7.2이어야 한다.

4.4. 특이성시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 항원저지시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 냉장고에 보존하여야 하며, 제조완료일로 부터 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 돼지 전염성 위장염 바이러스로 의심되는 자돈의 소장조직을 동결절편한 후 slide glass위에 올린 다음 완전히 건조시킨다.
- 2) 100% cold acetone(-20℃에 보관)으로 10분간 고정한 후 건조시킨 다음 메니큐어로 구획을 만든다.
- 3) 1차 항체(돼지 전염성 위장염바이러스 단클론 항체)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 4) PBS로 1분씩 5회 세척한다,
- 5) 2차 항체(anti-mouse FITC conjugate)를 올린 후 실온에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 6) Conjugate를 제거한 후 PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 7) Slide glass위에 mounting buffer를 올린 후 cover slide를 덮고 형광현미경으로 검사한다.

6.2. 판정

선명한 형광이 조직의 세포질 내에서 관찰이 되면 돼지 전염성 위장염바이러스 감염으로 판정한다.

* 유의사항

형광항체 검사 시 비 특이적인 형광이 관찰될 수 있으니 주의하고 세포질 내 강한 형광이 관찰될 때 양성으로 판정한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

DMEM	430 ml
Non-essential amino acid	100 X 5ml
L-glutamin	100 X 5ml
Sodium pyruvate	100 X 5ml
FBS(Gibco BRL 1600-044)	10% 50ml
Antibiotic	100 X 5ml

부기2. 세포유지용 배지

Hybridoma	300만개 이상
DMEM	7ml
DMSO	1ml
FBS	2ml

부기3. 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride	0.2g
Disodium hydrogen orthophosphate(anhydrous)	1.15g
Potassium dehydrogen	0.2g
D.W	1,000ml

최종 pH가 7.3이되게 조정하여 15Lb에서 15분간 멸균 후 사용한다.

부기4. Mounting buffer

Glycine	0.42g
Sodium hydroxide	0.2g
Sodium chloride	0.51g
Sodium azide	0.03g

상기시약을 증류수 30ml에 녹인 후 glycerine 70ml을 첨가한다.

돼지 로타바이러스 검사용 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Porcine Rotavirus

1. 정의

돼지 로타바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성항체 생산잡종세포를 증식시켜 만든 단클론성 항체이며 돼지 로타바이러스 검사에 사용한다.

2. 제조용 세포

2.1. 세포주

돼지 로타바이러스 특이 항체를 분비하는 hybridoma 세포 또는 국립수의과학 검역원에서 인정하는 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 로타바이러스 특이항체를 분비하는 hybridoma 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 증식시킨 후 그 상층액을 형광항체법으로 확인하고, hybridoma 세포를 수확하여 세포유지용 배지(부기2)와 혼합하여 세포를 -70°C 에서 하룻밤 얼린 후 액체질소에 동결보존한다.

2.3. 성장 및 독력

돼지 로타바이러스 검사용 단클론성항체는 돼지 로타바이러스를 감염시킨 세포주 및 감염자돈의 소장 동결절편한 세포의 세포질에 특이적으로 반응하여 결합한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

돼지 로타바이러스 특이항체를 생산하는 hybridoma 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 잡종세포배양

세포증식용 배지에 돼지 로타바이러스 특이항체를 생산하는 hybridoma 세포를 3~5일간 배양한다.

3.2.2. 잡종세포수확

hybridoma의 증식을 확인 한 후 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20°C 에 보존한다.

3.2.3. 항체농도조절

항체는 원액검사의 항체가 측정시험결과에 의하여 16~32배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액 검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가측정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

MA104 혹은 TF104 세포, α -MEM, PBS(부기3), slide glass, acetone, anti-mouse IgG FITC conjugate, mounting buffer(부기4)를 사용한다. 돼지 로타바이러스를 MA104세포에 $0.5\mu\text{g/ml}$ trypsin이 함유된 α -MEM를 이용해 감염시킨 후 50%의 CPE가 일어났을 때, 80% acetone (-20°C)으로 10분간 고정 한 후 건조시킨다. 생산된 항체를 2배 계단 희석하여 고정된 세포에 $100\mu\text{l}$ 분주한 후 30분간 반응시킨다. 이후 PBS(부기3)로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse IgG FITC conjugate를 $100\mu\text{l}$ 분주후 30분간 반응시킨 다음 PBS(부기3)로 3회 세척한다. Mounting buffer로 cover slide를 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

돼지 로타바이러스에 감염된 세포의 세포질에 특이 형광이 8배 이상에서 관찰되어야 하며 대조세포에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 특이성시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지 로타바이러스 감염배양세포의 카바스립표본 또는 돼지 로타바이러스 감염돼지의 장관조직의 동결박절표본과 대조로서 정상배양세포 또는 건강한 돼지의 장관조직의 박절표본을 직접법에 의하여 검사품으로 37°C 에서 60분간 반응하고 형광염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

돼지 로타바이러스의 감염세포나 감염자돈의 장관조직에서는 특이형광을 나타내나 대조세포와 건강한 자돈의 장관조직표본에서는 이와 유사한 형광이

2-2-2-10

전혀 나타나지 아니하여야 한다.

3.3.4. 목적 외 항체 부정시험

돼지 호흡기 코로나바이러스, 돼지 전염성 위장염 바이러스, 돼지 유행성 설사바이러스와의 교차반응을 나타내지 않아야 한다.

3.3.5. 항원저지시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

3.3.3.1의 재료 및 시험에 따라 제작된 감염재료에 중화항체 1,000배 이상의 돼지 로타바이러스의 항혈청 및 음성혈청을 전처리하고 세척, 건조한 후 각각 시험품을 염색하여 형광 현미경으로 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

돼지 로타바이러스 면역혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화되어야 하고 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항체농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 VI-1에 의한 검사에 따라 맑은 분홍빛의 액체로 이물이 나타나서는 아니 되며, 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 VI-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 VI-8에 의한 검사에 따라 수소 이온농도는 7.0~7.2이어야 한다.

4.4. 특이성시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 항원저지시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 돼지 로타바이러스로 의심되는 자돈의 소장조직을 동결절편한 후 slide glass 위에 올린 다음 완전히 건조시킨다.
- 2) 100% cold acetone(-20℃에 보관)으로 10간 고정된 후 건조시킨 다음 메니큐어로 구획을 만든다.
- 3) 1차 항체(돼지 로타바이러스 단클론 항체)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 4) PBS로 1분씩 5회 세척한다
- 5) 2차 항체(anti-mouse FITC conjugate)를 올린 후 실온에서 30분~1시간 반응시킨다.
- 6) Conjugate를 제거한 후 PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 7) Slide glass위에 mounting buffer를 올린 후 cover slide를 덮고 형광현미경으로 검사한다.

6.2. 판정

선명한 형광이 장세포의 세포질 내에서 관찰이 되면 돼지 로타바이러스 감염으로 판정한다.

* 유의사항

형광항체 검사 시 비특이적인 형광이 관찰될 수 있으니 주의하고 세포질 내 강한 형광이 관찰될 때 양성으로 판정한다.

<부 기>

부기1. MCA 생산용 배지

DMEM	430ml
Non-essential amino acid	100 X 5ml
L-glutamin	100 X 5ml
Sodium pyruvate	100 X 5ml
FBS(Gibco BRL 16000-044)	10% 50ml
Antibiotic	100 X 5ml

부기2. 세포유지용 배지(cell freezing medium)

Hybridoma	300만개 이상
DMEM	7ml
DMSO	1ml
FBS	2ml

부기3. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Nacl	8g
KCl	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
D.W	1,000ml

부기4. Mounting buffer

Glycine	0.42g
Sodium hydroxide	0.2g
Sodium chloride	0.51g
Sodium azide	0.03g

상기 시약을 증류수 30ml에 녹인 후 glycerine 70ml을 첨가

돼지 생식기호흡기증후군바이러스 검사용 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrom Virus

1. 정의

돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성항체 생산 잡종세포(hybridoma)를 증식시켜 만든 단클론성항체이며 돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스 검사에 사용한다.

2. 제조용 세포

2.1. 세포주

돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스 특이항체를 분비하는 hybridoma 세포 또는 국립수의과학검역원에서 인정하는 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스 특이항체를 생산하는 hybridoma 세포를 세포증식용 배지(부기1)에 증식시킨 후 그 상층액을 형광항체법으로 확인하고, hybridoma 세포를 수확하여 세포유지용 배지(부기2)와 혼합하여 세포를 -70℃에서 하룻밤 얼린 후 액체질소에 동결보존한다.

2.3. 성장

돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스를 감염시킨 세포주 및 감염자돈의 폐를 동결절편한 세포의 세포질에 특이적으로 반응하여 결합한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

돼지 생식기호흡기 증후군 특이항체를 생산하는 hybridoma 세포를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 잡종세포배양

세포증식용 배지에 돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스 특이항체 생산 Hybridoma 세포를 3~5일간 배양한다.

3.2.2. 잡종세포수확

Hybridoma 세포의 증식을 확인한 후 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20℃에 보존한다.

3.2.3. 항체농도조절

항체는 원액검사의 항체가 측정시험결과에 의하여 16~32배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액의 검사

3.3.1. 무균검사

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가 측정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

MARC145 세포, α-MEM, PBS(부기3), slide glass, acetone, Anti-mouse IgG FITC conjugate, mounting buffer(부기4)를 사용한다. 돼지 생식기호흡기 바이러스를 MARC145 세포에 감염시킨 후 50%의 CPE가 일어났을 때, 80% acetone (-20℃)으로 10분간 고정한 후 건조시킨다. 생산된 항체를 2배 계단 희석하여 고정된 세포에 100μl 분주한 후 30분간 반응시킨다. 이후 PBS(부기3)로 3회 세척하고 2차항체인 anti-mouse IgG FITC conjugate를 100μl 분주후 30분간 반응시킨 다음 PBS(부기3)로 3회 세척한다. Mounting buffer로 cover slide를 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스에 감염된 세포의 세포질에 특이 형광이 8배 이상에서 관찰되어야 하며 대조세포에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 특이성 시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스 감염세포의 카바스립표본 또는 돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스 감염돼지의 폐조직 박절표본과 대조로서 정상 배양세포 또는 건강한 돼지의 폐조직의 박절표본을 직접법에 의하여 시험품으로 37℃에서 60분간 반응하고 형광 염색하여 형광현미경으로

관찰한다.

3.3.3.2. 판정

돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스의 감염세포나 감염돼지의 폐조직에서는 특이 형광을 나타내나 정상 폐 세포에서는 이와 유사한 형광이 전혀 나타나지 아니하여야 한다.

3.3.4. 목적 외 항체 부정시험

돼지 호흡기 코로나바이러스와 교차반응을 나타내지 않아야 한다.

3.3.5. 항원 저지시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

3.3.3.1의 재료 및 시험에 따라 제작된 감염재료에 중화항체가 1,000배 이상의 돼지 생식기 호흡기 증후군 항혈청 및 음성혈청을 전처리하고 세척, 건조한 후 각각 시험품을 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

돼지 생식기호흡기 증후군 면역혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화되어야 하고 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항체농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 맑은 분홍빛의 액체로 이물이 나타내서는 아니되며, 소분용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 7.0~7.2이어야 한다.

2-2-2-11

4.4. 특이성시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 항원저지시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 돼지 생식기호흡기 증후군 감염으로 의심되는 가검조직의 동결절편을 만든다.
- 2) 아세톤으로 실온에서 10분간 고정한다.
- 3) 돼지생식기호흡기 증후군 바이러스 단크론항체를 2~3방울 점적한다.
- 4) 실온에서 1시간 반응한다. PBS로 10회이상 세척한다.
- 5) Anti-mouse IgG FITC conjugate를 실온에서 1시간 반응한다.
- 6) PBS로 10회 이상 세척한다.
- 7) Cover glass로 덮은 후 형광항체현미경으로 관찰한다.

6.2. 판정

선명한 형광이 조직의 세포질 내에서 관찰이 되면 돼지 생식기호흡기 증후군 바이러스 감염으로 판정한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

DMEM	430ml
Non-essential amino acid	100 X 5ml
L-glutamin	100 X 5ml
Sodium pyruvate	100 X 5ml
FBS(Gibco BRL 16000-044)	10% 50ml
Antibiotic	100 X 5ml

부기2. 세포유지용 배지

Hybridoma	300만개 이상
DMEM	7ml
DMSO	1ml
FBS	2ml

부기3. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride.....	0.2g
Disodium hydrogen orthophosphate(anhydrous).....	1.15g
Potassium dehydrogen.....	0.2g
D.W.....	1,000ml

최종 pH가 7.3이되게 조정하여 15Lb에서 15분간 멸균 후 사용한다.

부기4. Mounting buffer

Glycine.....	0.42g
Sodium hydroxide.....	0.2g
Sodium chloride.....	0.51g
Sodium azide.....	0.03g

상기 시약을 증류수 30ml에 녹인 후 glycerine 70ml을 첨가

돼지 호흡기코로나바이러스 검사용 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Porcine Respiratory Coronavirus

1. 정의

돼지 전염성위장염 바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성항체 생산잡종세포 (hybridoma) 37번 주를 증식시켜 만든 단클론성항체이며 돼지 호흡기코로나 바이러스 검사에 사용한다.

2. 제조용 세포

2.1. 세포주

돼지 전염성위장염 바이러스 특이 항체를 분비하는 hybridoma 37번주 또는 국립수의과학검역원에서 인정하는 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 전염성위장염 바이러스 특이항체를 분비하는 hybridoma 37번주를 세포 증식용 배지(부기1)에 증식시킨 후 그 상층액을 형광항체법으로 확인하고 hybridoma 37번주를 수확하여 세포유지용 배지(부기2)와 혼합하여 세포를 -70℃에서 하룻밤 얼린 후 액체질소에 동결보존한다.

2.3. 성상

돼지 호흡기코로나 바이러스 단클론성항체는 돼지 호흡기코로나 바이러스에 대한 중화능이 없다. 돼지 호흡기코로나 바이러스를 감염시킨 세포주 및 감염자돈의 편도 및 폐를 동결절편한 세포의 세포질에서 특이적으로 반응하지 아니하나 돼지전염성 위장염(TGE)에 감염된 세포에 특이적으로 결합한다. 돼지 전염성위장염 바이러스의 검출능력은 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml 이상이어야 한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

돼지 호흡기코로나 바이러스 특이항체를 분비하는 hybridoma 37번 주를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 잡종세포배양

세포증식용 배지에 돼지전염성위장염 바이러스 특이항체 생산 hybridoma 37번주를 3~5일간 배양한다.

3.2.2. 잡종세포수확

Hybridoma 37번주의 증식을 확인 한 후 상층액을 수확하여 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20°C 에 보존한다.

3.2.3. 항체농도조절

항체는 원액검사의 항체가 측정시험결과에 의하여 8배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가측정 시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

ST세포, α -MEM, PBS(부기3), slide glass, acetone, anti-mouse IgG-FITC conjugate, mounting buffer(부기4)를 사용한다. 돼지 호흡기코로나 바이러스와 돼지 전염성위장염 바이러스를 ST세포에 감염시킨 후 50%의 CPE가 일어났을 때, 80% acetone (-20°C)으로 10분간 고정한 후 건조시킨다. 생산된 항체를 2배 계단 희석하여 고정된 세포에 $100\mu\text{l}$ 분주한 후 30분간 반응시킨다. 이 후 PBS(부기3)로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse IgG FITC conjugate를 $100\mu\text{l}$ 분주후 30분간 반응시킨 다음 PBS(부기3)로 3회 세척한다. Mounting buffer로 cover slide를 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

돼지 전염성위장염 바이러스에 감염된 세포의 세포질에 특이 형광이 나타나야 하며, 돼지 호흡기코로나 바이러스에 감염된 세포의 세포질에서는 형광이 관찰되어서는 아니된다. 대조세포에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 특이성 시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지 호흡기코로나 바이러스 감염배양세포의 cover slide표본 또는 돼지

2-2-2-12

코로나 바이러스 감염돼지의 편도 및 폐 조직의 동결 박절표본과 대조로서 정상 배양세포 또는 건강한 자돈의 편도 및 폐조직의 박절표본을 직접법에 의하여 시험품으로 37℃에서 60분간 반응하고 형광염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

돼지 전염성 위장염 바이러스의 감염세포나 감염 돼지의 장관임파조직에서는 특이형광을 나타내어야 하며 돼지 호흡기 코로나바이러스에 감염된 세포와 대조세포 및 건강한 돼지의 장관임파조직 표본에서는 이와 유사한 형광이 전혀 나타나지 아니하여야 한다.

3.3.4. 목적외 항체의 부정시험

닭 점염성기관염 바이러스, 소 전염성비기관염 바이러스, 돼지 코로나 바이러스, 돼지 로타 바이러스, 돼지 오제스키병 바이러스, 돼지 콜레라 바이러스, 돼지 일본뇌염 바이러스, 톡소플라즈마, 돼지 파보바이러스와 교차반응을 나타내지 않아야 한다.

3.3.5. 항원저지 시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

3.3.3.1의 재료 및 시험에 따라 제작된 감염재료에 중화항체가 1,000배 이상의 돼지 호흡기코로나 바이러스 검출용 항혈청 및 음성혈청을 전처리하고 세척, 건조한 후 각각 검사품을 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

돼지 호흡기코로나 바이러스 면역혈청으로 전처리한 표본에서는 특이형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화되어야 하고 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항체농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 맑은 분홍빛의 액체로 이물이 나타내서는 아니 되며, 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온농도시험

동물 용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 7.0~7.2이어야 한다.

4.4. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 급성 호흡기 질환으로 의심되는 자돈 혹은 성돈의 편도, 폐조직을 동결절편한 후 slide glass위에 올린다.
- 2) 100% cold acetone(-20℃에 보관)으로 10분간 고정한다.
- 3) 1차 항체(특이 PRCV 단클론항체와 TGE 단클론성 항체 각각)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 4) PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 5) 2차 항체(anti- mouse IgG FITC conjugate)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 6) Conjugate를 제거한 후 PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 7) Slide glass위에 mounting buffer를 올린 후 cover slide를 덮고 형광현미경으로 검사한다.

6.2. 판정

특이 PRCV 단클론항체에는 세포질 내 형광이 관찰되지 않으며 TGE 단클론성 항체에 선명한 형광이 조직의 세포질 내에서 관찰이 되면 돼지 호흡기 코로나바이러스 감염으로 판정한다.

* 유의사항

형광항체 검사 시 비특이적인 형광이 관찰될 수 있으니 주의하고 세포질 내 강한 형광이 관찰될 때 양성으로 판정한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

α-MEM	430ml
Non-essential amino acid	100 X 5ml
L-glutamin	100 X 5ml
Sodium pyruvate	100 X 5ml
FBS(Gibco BRL 16000-044)	10% 50ml
Antibiotic	100 X 5ml

부기2. 세포유지용 배지(cell freezing medium)

Hybridoma	300만개 이상
α-MEM	7ml
DMSO	1ml
FBS	2ml

부기3. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Sodium chloride	8.0g
Potassium chloride	0.2g
Disodium hydrogen orthophosphate(anhydrous)	1.15g
Potassium dehydrogen	0.2g
D.W	1,000ml

최종 pH가 7.3이되게 조정하여 15Lb에서 15분간 멸균 후 사용한다.

부기4. Mounting buffer

Glycine	0.42g
Sodium hydroxide	0.2g
Sodium chloride	0.51g
Sodium azide	0.03g

상기시약을 증류수 30ml에 녹인 후 glycerine 70ml을 첨가한다.

돼지 인플루엔자바이러스 검사용 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Porcine Influenza Virus

1. 정의

돼지 인플루엔자 바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성항체 생산잡종세포(HB주)를 증식시켜 만든 단클론성항체이며 돼지 인플루엔자 바이러스 검사에 사용한다.

2. 제조용 세포

2.1. 세포주

돼지 인플루엔자 바이러스 특이 항체를 분비하는 잡종세포(hybridoma)주 또는 국립수의과학검역원에서 인정하는 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

돼지 인플루엔자 바이러스 특이항체를 생산하는 hybridoma를 세포증식용 배지(부기1)에 증식시킨 후 그 상층액을 형광항체법으로 확인 하고, hybridoma를 수확하여 세포유지용 배지(부기2)와 혼합하여 세포를 -70°C 에서 하룻밤 얼린 후 액체질소에 동결보존한다.

2.3. 성장

돼지 인플루엔자 바이러스의 단클론성항체는 돼지 인플루엔자 바이러스에 대한 중화능이 없다. 돼지 인플루엔자 바이러스를 감염시킨 세포주 및 감염돼지의 편도 및 폐를 동결절편한 세포의 세포질에서 특이적으로 반응하여 결합한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

돼지 인플루엔자 특이항체를 생산하는 hybridoma를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1)을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 잡종세포배양

세포 증식용 배지에 돼지 인플루엔자 특이 항체 생산 hybridoma를 3~5일간 배양한다.

3.2.2. 잡종세포수확

hybridoma의 증식을 확인 한 후 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20°C 에 보존한다.

3.2.3. 항체농도조절

항체는 원액검사의 항체가 형광항체법 시험결과에 의하여 8배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가 측정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

ST 혹은 MDCK세포, α -MEM, PBS, slide glass, acetone, anti-mouse IgG FITC conjugate, mounting buffer(부기4)를 사용한다. 돼지 인플루엔자 바이러스를 ST세포에 감염시킨 후 50%의 CPE가 일어났을 때, 80% acetone(-20°C)으로 10분간 고정한 후 건조시킨다. 생산된 항체를 2배 계단 희석하여 고정된 세포에 $100\mu\text{l}$ 부주한 후 30분간 반응시킨다. 이 후 PBS(부기3)로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse IgG FITC conjugate를 $100\mu\text{l}$ 부주 후 30분간 반응시킨 다음 PBS(부기3)로 3회 세척한다. Mounting buffer cover slide를 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

돼지 인플루엔자 바이러스에 감염된 세포의 세포질에 특이 형광이 8배 이상에서 관찰되어야 하며 대조세포에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 특이성 시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

돼지 인플루엔자 특이항체의 cover slide표본 또는 돼지 인플루엔자 특이항체 감염돼지의 폐 조직 박절표본과 대조로서 정상 배양세포 또는 건강한 돼지의 폐조직의 박절표본을 직접법에 의하여 검사품으로 37°C 에서 60분간 반응하고 형광염색하여 형광 현미경으로 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

돼지 인플루엔자 특이항체의 감염세포나 감염 돼지의 폐 조직에서는 특이

형광을 나타내나 대조세포와 건강한 돼지의 장관조직표본에서는 이와 유사한 특이형광이 나타나지 아니하여야 한다.

3.3.4. 목적 외 항체 부정시험

돼지 콜레라 바이러스, 돼지 호흡기 코로나 바이러스, PRRS와 교차반응을 나타내지 않아야 한다.

3.3.5. 항원 저지시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

3.3.3.1의 재료 및 시험에 따라 제작된 감염재료에 중화항체가 1,000배 이상의 돼지 인플루엔자 항혈청 및 음성혈청을 전처리하고 세척, 건조한 후 각각 검사품을 염색하여 형광 현미경으로 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

돼지 인플루엔자 면역혈청으로 전처리한 표본에는 특이형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화되어야 하고 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이 형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.3에 의하여 조절된 항체농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 맑은 분홍빛의 액체로 이물이 나타내서는 아니 되며, 소분 용기별의 성상은 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적 제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

2-2-2-13

-20℃ 냉동고에 보존하여야하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 급성 호흡기 질환으로 의심되는 자돈 혹은 성돈의 편도, 폐조직을 동결절편한 후 slide glass위에 올린다.
- 2) 100% cold acetone(-20℃에 보관)으로 10분간 고정한다.
- 3) 1차 항체(특이 PIV 단클론항체)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 4) PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 5) 2차 항체(anti-mouse IgG FITC conjugate)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 6) Conjugate를 제거한 후 PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 7) Slide glass위에 mounting buffer를 올린 후 cover slide를 덮고 형광현미경으로 검사한다.

6.2. 판정

선명한 형광이 조직의 세포질 내에서 관찰이 되면 돼지 인플루엔자 바이러스 감염으로 판정한다

* 유의사항

형광항체 검사시 비특이적인 형광이 관찰될 수 있으니 주의하고 세포질 내 강한 형광이 관찰될 때 양성으로 판정한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

α-MEM	430ml
Non-essential amino acid	100 X 5ml
L-glutamin	100 X 5ml
Sodium pyruvate	100 X 5ml
FBS(Gibco BRL 16000-044)	10% 50ml
Antibiotic	100 X 5ml

부기2. 세포유지용 배지(cell freezing medium)

Hybridoma	300만개이상
α-MEM	7ml
DMSO	1ml
FBS	2ml

부기3. 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

Nacl	8g
KCl	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
D.W	1,000ml

부기4. Mounting buffer

Glycine.....	0.42g
Sodium hydroxide.....	0.2g
Sodium chloride.....	0.51g
Sodium azide.....	0.03g

상기시약을 증류수 30ml에 녹인 후 glycerine 70ml을 첨가

톡소플라스마 간접형광항체 검사용 항원

Toxoplasmosis Antigen, Indirect Fluorescent Antibody Test

1. 정의

톡소플라스마 원충을 슬라이드 글라스에 흡착시킨 항원이며 간접형광항체 검사법을 이용하여 톡소플라스마 감염항체검사에 사용한다.

2. 제조용 원충

2.1. 원충주

국립수의과학검역원에서 보존계대중인 *Toxoplasma gondii* 원충 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 *Toxoplasma gondii* 원충을 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

마우스 복강 내에 *Toxoplasma* 원충(1×10^6 개/ml)을 마우스 한 마디당 1ml 정도를 접종하여 3~4일 후에 18G needle을 이용하여 10ml 주사기에 PBS(부기1)를 채워 복강 내로 주입하여 PBS와 함께 *Toxoplasma* 원충을 회수한다. 회수한 원충을 분병하여 액체질소통에 보존하며 보존된 원충은 매년 1회 마우스에 1회 재접종 계대한다.

2.3. 성상 및 독력

감염장기조직표본을 Giemsa 염색하여 특징적인 tachyzoite를 확인할 수 있다. 원충을 mouse 복강 내에 접종하면 폐사 또는 뇌 내에 cyst를 형성한다. 사람, 돼지, 고양이 등 각종 포유동물이나 조류 등에 감염되며 대부분 불현성 감염이지만 면역이나 어린돼지에는 현성감염을 일으킨다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

Toxoplasma 원충, 건강한 SPF(specific pathogen free) 마우스, PBS(부기1) 및 간접형광항체 슬라이드를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 원충의 마우스접종

마우스 복강 내에 *Toxoplasma* 원충(10^6 개/ml)을 부유액 1ml씩 접종한다.

3.2.2. 원충수확

원충 접종 3~4일 후에 18G needle을 이용한 10ml 주사기에 PBS(부기1)을 채

위 복강 내로 주입하여 PBS와 함께 *Toxoplasma* 원충을 무균적으로 수확한다.

3.2.3. 원충정제

수확한 *Toxoplasma* 원충을 5 μ m 여과지에 여과한다.

3.2.4. 항원농도조절

여과한 *Toxoplasma* 원충을 현미경상에서 원충의 숫자를 측정하여 PBS로 원충수를 10⁶개/ml가 되도록 희석한다. 항원일부는 원액검사에 사용한다.

3.2.5. 항원흡착

조절된 항원량 IFA용 슬라이드에 13 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 완전히 건조시킨 다음 메틸알코올로 고정 후 foil로 밀봉하여 -80 $^{\circ}$ C에 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 특이성시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

톡소플라스마 항원이 흡착된 slide well에 톡소플라스마의 표준양성혈청, 표준음성혈청을 serum dilution buffer(부기3)로 200배 희석하여 각 slide well에 13 μ l씩 떨어뜨리고 식염수를 떨어뜨린 것을 대조군으로 하여 습윤 chamber에 slide를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 세척하고 fluor escein-labeled goat anti-swine IgG(1:80)를 13 μ l씩 떨어뜨려 염색한다.

3.3.2.2. 판정

형광현미경 검사에서 표준양성혈청을 처리한 표본은 특이형광이 인정되나 음성혈청과 식염수대조군에서는 특이형광이 인정되지 않아야 한다.

3.3.3. 역가시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

<별첨>의 방법에 따라 실시한다.

3.3.3.2. 판정

표준 양성혈청과 음성혈청의 차이가 명확하여야 하며, 200배 희석된 표준양성혈청에서도 특이 형광을 나타내어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원을 최종원액으로 한다.

2-2-3-01

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

포장된 톡소플라스마 간접형광항체 키트로 *Toxoplasma* 원충을 coating한 slide의 성상이 균일하고 이물질이 없어야 한다.

4.2. 역가시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-80℃ 냉동고에 보관하여야하며, 1년간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) -80℃에 보관중인 IFA antigen coating slide를 꺼내 foil 포장을 벗긴 후 10분간 풍건한다.
- 2) 비동화 시킨 가검 혈청을 serum dilution buffer로 단계 희석한다.
- 3) 200배 희석된 표준양성, 표준음성, 가검혈청을 각 well에 13 μ l씩 떨어뜨린다.
- 4) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨다.
- 5) 반응 후 1X FA rinse buffer에 10분간 담귀 놓고 가끔 흔들어준다.
- 6) 세척 후 slide를 꺼내어 물기를 최대한 털어내고 fluorescein-labeled goat anti-swine IgG(1:80)를 13 μ l씩 떨어뜨린다.
- 7) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨다. 이때부터는 foil로 습윤 chamber를 덮어 형광이 날아가지 않도록 해야 한다.
- 8) 반응 후 1X FA rinse buffer에 10분간 담귀 놓고 가끔 흔들어준다.
형광이 날아가지 않도록 foil이나 기타 용기 사용하여 덮어준다.
- 9) 세척 후 slide를 꺼내어 물기를 최대한 털어내고, 항원이 coating되지 않은 반대 면과 coating면의 가장자리 물기를 paper towel로 제거한다.
- 10) slide에 mounting fluid를 2-3방울 떨어뜨린 후 cover glass를 덮고 형광현미경으로 관찰한다($\times 200$, $\times 400$).

6.2. 판정

Control well의 표준양성혈청과 음성혈청의 차이가 명확하여야 하며, 200배 희석된 가검혈청이 표준양성혈청의 것과 비슷한 강도의 형광을 나타내면 양성으로 판정한다.

※ 유의사항

- 항원 항체 반응 중 혈청이 마르지 않도록 한다.
- 표준혈청과 fluorescein-labeled 혈청은 반복적인 얼림과 녹임을 피하고, 반드시 소량씩 미리 분주하여 필요한 만큼씩 꺼내 쓴다.
- 공급된 특소플라즈마 항원 slide는 날개 포장되어 있으므로 한 장씩 꺼내어 사용하고 일단 사용한 slide는 재사용하지 않는다.

<별첨> 역가시험

가. 재료 및 시험

- 1) Serum dilution buffer(pH8.0)(부기2), 4×FA rinse buffer(pH9.0)(부기3), IFA slide, FITC anti-swine IgG conjugate, mounting fluid(부기4)를 사용한다.
- 2) -80℃에 보관중인 IFA antigen coating slide를 꺼내 foil 포장을 벗긴 후 10분간 풍건한다.
- 3) 비동화 시킨 가검 혈청을 serum dilution buffer로 단계 희석한다.
- 4) 200배 희석된 표준양성, 표준음성, 가검혈청을 각 well에 13 μ l씩 떨어뜨린다.
- 5) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨다.
- 6) 반응 후 1X FA rinse buffer에 10분간 담귀 놓고 가끔 흔들어준다.
- 7) 세척 후 slide를 꺼내어 물기를 최대한 털어내고 Fluorescein-labeled goat anti-swine IgG(1:80)를 13 μ l씩 떨어뜨린다.
- 8) 습윤 chamber에 slide를 넣고 37℃에서 30분간 반응시킨다.
이때부터는 foil로 습윤 chamber를 덮어 형광이 날아가지 않도록 해야 한다.
- 9) 반응 후 1X FA rinse buffer에 10분간 담귀 놓고 가끔 흔들어준다.
형광이 날아가지 않도록 foil이나 기타 용기 사용하여 덮어준다.
- 10) 세척 후 slide를 꺼내어 물기를 최대한 털어내고, 항원이 coating되지 않은 반대면과 coating면의 가장자리 물기를 paper towel로 제거한다.
- 11) slide에 mounting fluid를 2-3방울 떨어뜨린 후 cover glass를 덮고 형광현미경으로 관찰한다(X200, X400).

<부 기>

부기1. PBS(posphate buffered saline)

NaCl.....	8.0g
KCl.....	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml
Streptomycin.....	2mg/ml
Penicillin.....	500unit/ml
Kanamysin.....	200unit/ml

부기2. Serum dilution buffer (pH 7.2) 4℃ 보관

Na ₂ HPO ₄	1.19g
NaH ₂ PO ₄	0.22g
NaCl	8.55g
BSA (bovine serum albumin)	10.0g
D.W	200ml

부기3. 4X FA rinse buffer (pH 9.0) 4℃ 보관 (1×로 희석하여 사용)

Na ₂ CO ₃	11.4g
NaHCO ₃	33.6g
NaCl	8.55g
D.W	200ml

부기4. FA mounting fluid

시판되는 buffer 또는 FA rinse buffer와 glycerol를 동량으로 혼합하여 사용

톡소플라스마 항체검사(LATEX) 키트

Latex Kit against Toxoplasma Antibody Test

1. 정의

톡소플라스마(*Toxoplasma gondii*, RH starin) 항원을 폴리스틸렌 라텍스 입자에 흡착하여 만든 톡소플라스마 라텍스 검사 키트이며 톡소플라스마 감염항체 검사에 사용한다.

2. 제조용 원충

2.1. 원충주

국립수의과학검역원에서 보존계대중인 *Toxoplasma gondii* 원충 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 *Toxoplasma gondii* 원충을 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

마우스 복강 내에 *Toxoplasma* 원충(1×10^6 개/ml)을 마우스 한 마리당 1ml정도를 접종하여 3~4일 후에 18G needle을 이용하여 10ml 주사기에 PBS(부기1)를 채워 복강 내로 주입하여 PBS와 함께 *Toxoplasma* 원충을 회수한다. 회수한 원충을 분병하여 액체질소통에 보존하며 보존된 원충은 매년 1회 마우스에 1회 재접종 계대한다.

2.3. 성상 및 독력

감염장기조직표본을 Giemsa 염색하여 특징적인 tachyzoit를 확인할 수 있다. 원충을 mouse 복강 내에 접종하면 폐사 또는 뇌 내에 cyst를 형성한다. 사람, 돼지, 고양이 등 각종 포유동물이나 조류 등에 감염되며 대부분 불현성 감염이지만 면양이나 어린돼지에는 현성감염을 일으킨다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

Toxoplasma 원충, 톡소플라스마 항체음성인 토끼, 건강한 SPF(specific pathogen free) 마우스, PBS(부기1), latex bead(2.6%) 1M tris buffer(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 원충의 마우스접종

마우스 복강 내에 *Toxoplasma* 원충(10^6 개/ml)의 부유액을 마리당 1ml씩 접종한다.

3.2.2. 원충수확

원충 접종 3~4일 후에 18G needle을 이용한 10ml 주사기에 PBS(부기1)을 채워 복강 내로 주입하여 PBS와 함께 *Toxoplasma* 원충을 무균적으로 수확한다.

3.2.3. 항원정제

수확한 *Toxoplasma* 원충을 $5\mu\text{m}$ 여과지로 여과한 후 적량의 증류수로 부유시켜 freez-thaw cycle을 반복하고 초음파 파쇄기로 1초 간격으로 10분간 마쇄한다.

3.2.4. 항원농도조절

마쇄한 원충(항원)을 원심관에 보아서 16000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액의 단백질을 수집하여 micro BCA protein assay reagent kit을 이용하여 단백질량을 정량하고 latex coating buffer(부기3)로 항원의 농도가 3mg/ml 되게 조정한다.

3.2.5. 항원흡착

톡소플라스마 항원(3mg/ml)과 latex bead(2.6%)를 1:1(v/v)로 혼합하고 1M tris buffer(부기2)를 총량의 1/9(v/v)이 되도록 첨가하여 37°C shaking incubator에서 1시간 동안 반응시킨 후 4°C에서 하룻밤동안 반응시킨다. 그리고 0.2M AMP buffer(부기4)로 3회 세척한 후 latex bead의 최종농도가 0.1% 되게 희석한다.

3.2.6. 항혈청 생산

톡소플라스마 원충부유액(3×10^7 개/ml)을 토끼 피하에 1ml씩 접종한다. 2주 후에 재접종하고 재접종 2주 후에 채혈하여 혈청을 분리한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 진단반응 확인시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

톡소플라스마 표준 양성혈청 및 표준 음성혈청과 latex bead를 사용한다.
톡소플라스마 양성혈청 및 음성혈청을 PBS로 16배, 32배, 64배가 되도록

2-2-3-02

단계별로 희석하여 10 μ l씩 plate의 well에 각각 분주한 후 latex bead 10 μ l씩을 첨가하고 흔들어서 잘 혼합한 후 상온에서 하룻밤 동안 정지 반응한다.

3.3.2.2. 판정

톡소플라스마 항원이 coating된 latex bead는 특이항체의 표준 양성혈청과 결합하게 되면 격자모양으로 퍼지게 되며(양성반응), 특이항체가 없는 표준 음성혈청의 경우는 중력에 의하여 well의 아래 중심으로 모아지게 된다(음성반응).

3.3.3. 역가시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

3.3.2.1에 의한 검사에 따른다.

3.3.3.2. 판정

표준양성혈청 반응은 혈청희석 64배 이상에서 응집반응이 일어나고 표준음성혈청에서는 응집반응이 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조정된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

3.6. 검사 키트 포장

아래 사항의 자재를 비닐봉지에 동봉 포장하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관한다.

- 1) 톡소플라스마 항원흡착 라텍스 진단액(50두분/1.5ml), 0.2M AMP buffer(50ml/병).
톡소플라스마 표준양성혈청 및 음성혈청 각각 1병씩
- 2) 혈구응집반응용 96well 마이크로 플레이트(u-bottom)5매

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따른다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 진단반응 확인시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.4. 역가시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

1년 간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 특수플라스마 항원 흡착 라텍스 진단액, 표준 양성혈청, 표준 음성혈청 및 혈청희석용 완충액(부기4)을 사용한다.
- 2) 가검 혈청과 표준 양성혈청을 혈청희석용 완충액으로 1:16으로 희석한다.
- 3) 희석된 혈청을 25 μ l씩 마이크로플레이트에 넣고, 혈청희석용 완충액으로 1:32, 1:64로 2배 계단 희석하여 각 well에 25 μ l씩 남게 한다.
- 4) 1:16, 1:32, 1:64배로 희석된 검사혈청이 들어있는 각 well에 라텍스 진단액을 25 μ l씩 분주한다.
- 5) 플레이트 진탕기나 손으로 가볍게 흔들어 준뒤 12~15시간 실온에서 반응시킨다.
- 6) 흰색 종이 위에 반응된 플레이트를 놓고 판정 기준에 따라 판정한다.

참고 표) 진단 반응 예시

가검혈청	1:16배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l	1:32배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l	1:64배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l
표준양성혈청	1:16배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l	1:16배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l	1:16배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l
표준음성혈청	1:16배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l	1:16배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l	1:16배 희석 혈청 25 μ l +라텍스진단액 25 μ l
플레이트진탕기 또는 손으로 가볍게 진탕			
하룻밤 정체 반응(12~15 시간)			
판 독			

6.2. 판정

혈청 회석액 1:64의 반응에서 +1정도 이상의 응집반응이 있으면 양성

혈청 회석액 1:64의 반응에서 +0.5정도 응집반응이 있으면 의양성

혈청 회석액 1:64의 반응에서 응집반응이 0이면 음성

* 판정기준

+3 : 응집이 강하게 일어나 주변부가 일그러지고 불규칙함

+2 : 응집의 크기가 크고 주변부가 약간 일그러짐

+1 : 응집의 크기가 작고 원형의 응집상을 볼 수 있음

+0.5 : 침강된 라텍스입자를 볼 수 있고 주변부에 약간의 응집이 있음

0 : 라텍스 입자가 완전히 침강되어 원형의 침강상이 관찰됨

* 유의사항

- 실온이 10℃ 이하에서는 반응이 일어나지 않는 경우가 있으므로 항온기에서 반응시켜야 하며 반응시 완충액이 증발하지 않도록 잘 덮어서 반응시킨다.
- 검사 대상 혈청이 세균에 오염되어 있으면 반응 도중 세균이 증식하여 라텍스 비드를 서로 응집시켜 비특이 반응을 유발하므로 검사 혈청이 세균에 오염되지 않도록 하여야 하며 반응시 강한 자장이나 정전기는 비특이 반응을 유발하므로 피해야 한다.

<부 기>

부기1. PBS(phosphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W.	1,000ml

부기2. 1M Tris buffer solution

Tris	12.1g
D.W	up to 100ml

부기3. Latex coating buffer

1.0M tris-HCL	28.1ml
1.0M tris-Base	21.9ml

부기4. Serum dilution buffer(0.2M AMP-HCl pH 8.0)

2.0M stock AMP	100ml
10% BSA	10ml
10% NaN ₃	1ml
D.W	up to 1L

돼지 선모충 항체검사(ELISA) 키트

Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit against Swine Trichinellosis

1. 정의

돼지의 선모충을 rat의 근육에 감염시킨 후 rat의 근육을 인공 소화시켜 자충을 분리하고 배양하여 자충이 배양액 내로 분비한 단백질을 항원으로 사용하여 마이크로플레이트에 흡착시키고 효소와 기질을 이용하여 만든 효소결합면역측정법용 키트이며 돼지의 선모충 감염항체검사에 사용한다.

2. 제조용 선모충

2.1. 선모충 주

국립수의과학검역원에서 계대중인 선모충(*Trichinella spiralis*) 또는 국립수의과학검역원에서 이와 동등하다고 인정한 선모충을 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

선모충이 감염된 rat의 근육 5~10g 정도를 세절하여 하루정도 굶긴 rat에 경구 투여하여 감염된 rat를 사육하여 생존 유지시키며 계대는 1년에 1회씩 실시한다.

2.3. 성상 및 독력

감염된 rat의 횡경막을 절취한 후 slide 두장으로 압착하고 현미경($\times 100$)으로 관찰하면 피낭유충을 관찰할 수 있다. 감염시 발열, 발진, 식욕부진 및 근육통을 유발하여 rat에 심감염 시키면 폐사된다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 선모충

선모충에 감염된 rat의 근육에서 분리된 순수 자충을 사용한다.

3.1.2. 소화액 및 배지

인공소화액(pepsin solution)(부기1), 및 선모충 자충배양배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 자충의 순수분리

선모충에 감염된 rat의 근육을 세절한 후 인공소화액을 첨가하여 37°C shaking incubator에서 3~4시간 반응시켜 근육을 소화시킨다. 소화된 소화액을

15-20분간 정치시킨 후 상층액 2/3정도를 걷어 내고 멸균 식염수를 첨가한 후 다시 정치시키고 상층액을 제거하는 방법으로 세척 과정을 반복한다. 소화액이 투명하게 불순물이 제거되면 바닥에 가라앉아있는 자충을 회수한다.

3.2.2. 자충의 세척

순수분리된 자충은 DMEM(부기2)로 세척한다.

3.2.3. 자충의 배양

자충으로부터 분비항원을 추출하기 위하여 순수분리한 자충을 DMEM(부기2) 배양기에 접종하고 37℃ 항온기에서 18~20시간 배양한다.

3.2.4. 항원수확

배지만을 회수하여 투석막에 옮기고 PEG(polyethylene glycol)로 도포하여 배양액이 투석막 밖으로 빠지도록 하여 약 1/10(v/v)로 농축하고 증류수로 투석막 안쪽을 세척하여 분비항원을 수확한다.

3.2.5. 항원역가 확인시험

수확한 항원은 coating buffer(부기3)를 사용하여 96well plate에 2배단계로 희석하여 4℃에서 하룻밤 반응한다. 항원이 coating된 plate에 양성 및 음성 대조혈청을 200배 희석하여 6.사용방법에 따라 ELISA를 실시하고, 양성대조혈청의 흡광도가 음성대조혈청의 흡광도의 2.5배 이상인 항원농도를 최적 항원 희석농도로 결정하고 이 항원을 최종원액으로 사용한다.

3.2.6. 항원흡착

3.2.5에 의하여 결정된 항원 농도로 희석한 항원을 immunoassay용 플레이트에 100 μ l 씩 분주한 후 4℃에서 밤새 흡착한다. 흡착이 끝난 항원을 플레이트에서 버린 후 ELISA 세척용액으로 1회 세척 후 blocking buffer (부기4)를 200 μ l 씩 분주한 후 37℃에서 2시간 반응한다. 반응 후 washing buffer (부기5)로 1회 세척한 다음 30분 동안 완전 건조시키고 진공 포장하여 4℃에 보존한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 진단반응 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

<별첨 1>의 방법에 따라 실시한다.

3.3.3.2. 판정

<별첨 2>에 의해 흡광도를 산출한다.

표준양성혈청 및 표준음성혈청의 흡광도는 값이 2.5배 이상 차이가 있어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의한다.

3.5. 검사키트 포장

아래 사항의 자재를 비닐봉지에 동봉 포장하여 4℃ 냉장소에 보관한다.

재료 및 시액(45두/플레이트1개 기준)

- 1) 선모충 진단항원 흡착용 플레이트1개
 - 2) Cover sealing 1장
 - 3) 혈청희석용 플레이트 1개
 - 4) 100X 선모충 분비항원 100 μ l
 - 5) 1X coating buffer 15ml
 - 6) 100X HRP conjugate(horseradish-peroxidase Anti-swine IgG) 15 μ l
 - 7) 양성혈청대조(positive serum control) 15 μ l
 - 8) 음성혈청대조(negative serum control) 15 μ l
 - 9) 발색제(ABTS substrate) 12ml
 - 10) 정지액(stop solution, 1% SDS) 12ml
- 상기의 시액들은 각각 1병

4. 검사방법

4.1. 특성시험

포장된 96well plate는 선모충 자충이 분비한 분비항원을 coating한 plate로 성상이 균일하고 이물질이 없어야 한다.

4.2. 유효성 시험

3.3.3에 의한 검사에 따라 표준양성혈청 및 표준음성혈청의 O.D값이 2.5배 이상 차이가 있어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

항원 및 표준혈청은 -20°C 에 보관하며 나머지는 4°C 냉장고에 보관하여야 하며, 1년간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 선모충 분비항원($100\times$)을 coating buffer(부기3)로 100배 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고, 37°C 에서 2시간동안 반응시켜 coating한다.
- 2) PBST(0.05% Tween 20 in PBS)로 3회 세척한다.
- 3) 0.5% gelatine용액 $100\mu\text{l}$ 씩을 분주하고 37°C 에서 30분간 반응시켜 blocking한다.
- 4) 가검혈청을 PBST로 200배 희석하여 $100\mu\text{l}$ 씩 2개 well에 분주한 후 37°C 에서 1시간 반응시킨다.
- 5) PBST로 3회 세척한다.
- 6) Peroxydase anti-swine conjugate (1:10,000)를 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 37°C 에서 1시간 반응시킨다.
- 7) PBST로 3회 세척한다.
- 8) ABTS substrate를 $100\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 15분간 반응시킨다.
- 9) 1% SDS용액을 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하여 반응을 정지시킨다.
- 10) 흡광도 405nm에서 측정 후 SP값을 구한다.

6.2. 판정

OD값을 아래의 공식에 따라 계산하여 0.5이상을 양성으로 판정한다.

$$\text{SP} = \frac{\text{Sample serum OD} - \text{Negative serum OD}}{\text{Positive serum OD} - \text{Negative serum OD}}$$

항원 및 표준혈청은 -20°C 에 보관하며 나머지는 4°C 냉장고에 보관하여야 하며 1년간 유효하다.

<별첨1> 진단반응 확인시험

가. 재료 및 시약(45두/플레이트1개 기준)

- 1) 100X 선모충 분비항원 100 μ l
- 2) 선모충 진단항원 흡착용 플레이트1개
- 3) Cover sealing 1장
- 4) 혈청희석용 플레이트 1개
- 5) 1X coating buffer 15ml
- 6) 100X HRP conjugate(horseradish-peroxidase Anti-swine IgG) 15 μ l
- 7) 양성혈청대조(positive serum control) 15 μ l
- 8) 음성혈청대조(negative serum control) 15 μ l
- 9) 발색제(ABTS substrate) 12ml
- 10) 정지액(1% SDS) 12ml

나. 시험방법

- 1) 선모충 분비항원(100 \times)을 coating buffer(부기3)로 100배 희석하여 100 μ l 씩 분주하고, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간동안 반응시켜 coating한다.
- 2) PBST(0.05% Tween 20 in PBS)로 3회 세척한다.
- 3) 0.5% gelatine용액 100 μ l씩을 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켜 blocking한다.
- 4) PBST로 3회 세척한다.
- 5) 가검혈청을 PBST로 200배 희석하여 100 μ l씩 2개 well에 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
- 6) PBST로 3회 세척한다.
- 7) Peroxydase anti-swine conjugate (1:10,000)를 100 μ l씩 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시킨다.
- 8) PBST로 3회 세척한다.
- 9) ABTS substrate(ABTS:H₂O₂=1:1)를 100 μ l씩 분주한 후 15분간 반응시킨다.
- 10) 1% SDS를 100 μ l씩 분주하여 반응을 정지시킨다.
- 11) 흡광도 405nm에서 측정후 SP값을 구한다.

<별첨2> 흡광도산출법

- 1) 양성혈청대조 및 음성혈청대조의 OD 평균값을 산출한다.
- 2) 양성혈청대조 평균 OD 값에서 음성혈청대조 평균 OD 값을 빼서 corrected positive control(CPC)을 산출한다.

$$\text{※ CPC} = \text{양성혈청대조 평균 OD} - \text{음성혈청대조 평균 OD}$$

- 3) 아래의 식에 따라 sample to positive(S/P) ratio을 산출한다.

$$\text{※ S/P ratio} = \frac{\text{가검혈청 평균 OD} - \text{음성혈청대조 평균 OD}}{\text{Corrected positive serum control(CPC)}}$$

<부 기>

부기1. 인공소화액

Pepsin	10g
HCl	10ml
D.W	1,000ml

부기2. 선모충 자충 배지

DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)	1,000ml
HEPES	10mM
Glutamine	2mM
Pyruvate	1mM
Penicillin	50units/ml
Streptomycin	50 μ g/ml

부기3. Coating buffer(pH 9.6) 4 $^{\circ}$ C 보관

Na ₂ CO ₃	74.2g
NaHCO ₃	25.2g
D.W	1,000ml

부기4. Blocking buffer

Gelatin	0.5g
PBS	100ml

부기5. Washing buffer(PBST)

PBS	1000ml
Tween-20	0.5ml

2-3 답

여 백

추백리 급속혈청(전혈)응집반응 검사용 항원

Pullorum Antigen, Rapid Serum(Whole Blood) Agglutination Test

1. 정의

살모넬라풀로룸(*Salmonella pullorum*)균을 배양한 후 불활화하여 만든 항원이며 추백리 진단을 하기위한 급속혈청(전혈)응집반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균주

2.1. 균주

Salmonella pullorum(SP) 표준균주 SP4, SP11, SP296주 또는 국립수의과학검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Tryptic soy agar(TSA) 또는 이와 대등한 증균 배지에 이식하여 37℃ 부란기내에서 18시간 배양한 균을 -80℃이하에 동결 보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

그람음성의 단간균이며 통성 혐기균이며 편모가없고 운동성이없다. 당분해작용(sugar fermentation)은 키시로제(Xylose), 아라비노제(Arabinose), 트레팔노제(Trepalose)의 분해능을 갖는다. 어린 병아리의 백색설가와 폐사가 특징이며 난 계대에 의한 감염의 경우 부화율이 감소한다.

3. 제조

3.1. 제조용배지

MacConkey agar, tryptic soy broth(TSB) 및 TSA배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 종균배양

보존된 각각의 균주별로 McConkey agar에 도말하여 37℃에서 24시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

배양한 각각의 SP표준균별로 단일 smooth colony를 1~2개 선정하여 TSB에 1차 접종하고 37℃에서 18시간 증균한 후 TSA배양기에 접종하여 37℃에서 24~48시간 배양한다. 배양 후 잡균의 혼입여부를 조사하고 오염된 배양기는

버린다.

3.2.3. 집균

증균된 배양병의 응고수를 제거하고 formalin 1%가 첨가된 식염수를 적당량 넣고 서서히 흔들어서 각각의 배양균별로 채균후 가제와 탈지면을 놓은 100 메쉬의 동망으로 여과한 후 6,000rpm에 30분간 원심하여 집균한다.

3.2.4. 항원농도조절

S.pullorum 표준균주인 SP4, SP11, SP296 각각의 집균액을 1% formalin을 가한 인산완충 식염수(부기1)로 75X McFarland Tube No.1의 농도가 되도록 조정한 후 각각의 항원을 동량씩 혼합한다.

3.2.5. 항원염색

Crystal violet 1%용액을 항원 100ml당 3ml씩 넣고 잘 혼합하여 염색한 후 소독된 탈지면으로 2회 이상 여과하여 5℃에서 각반하며 균등액이 되게 한 다음 냉암소에서 7일간 정치한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 *Salmonella pullorum* 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다. 검사품의 수소이온 농도는 4.6 ± 0.4 이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

SP증균배지(TSB)에 검사품을 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.5. 진단반응 확인시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

양성 및 음성혈청이나 양성 및 음성닭의 전혈을 사용한다. 또한 이미 혈청

역가를 알고 있는 표준 양성혈청 및 음성혈청을 사용하여 시험관법으로 혈청응집가를 측정한다.

3.3.5.2. 판정

양성혈청 및 양성닭의 혈액에서는 1분 이내에 응집반응이 일어나야하며 음성혈청 및 음성 닭의 혈액에서는 응집반응이 일어나지 않아야 한다. 이미 혈청역가를 알고 있는 표준 양성혈청 및 음성혈청을 사용하여 시험관법으로 혈청응집가를 측정하였을 때 그 역가가 동등(상대역가 0.8~1.25이내)하여야 하며 음성혈청에 대해서는 응집이 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 색조를 띤 균등한 균액으로서 이물 이취가 없고 소분된 용기마다 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 역가시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품과 표준품의 원액 및 식염수로 10배 희석한 것을 각각 표준 강양성 혈청 3개, 약양성 혈청 3개 및 음성혈청 6개 이상에 대하여 혈청평판응집반응을 실시한다.

4.5.2. 판정

검사품은 양성혈청 및 음성혈청에 대하여 표준품의 결과와 일치하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 시험(급속전혈 응집반응 검사, rapid whole blood agglutination test)

항원을 응집판상에 한 방울(0.03ml)을 적하하고 검사코자 하는 닭의 익하정맥에서 동량의 혈액을 채혈하여 진단액과 잘 혼합하면서 반응여부를 관찰한다. 검사 시 적합한 온도는 20~25℃이며, 검사시에는 직사광선, 먼지 등을 피하는 것이 좋다.

6.2. 판정

1분이내에 응집하면 양성, 1~2분에 응집하면 의양성, 2분후에도 응집이 없으면 음성으로 판정한다.

※주의

- 시험 시 양성 및 음성 혈청을 대조군으로 사용한다.
- 가검혈청을 즉시 검사하지 않을 경우 4℃에 보관하며 72시간을 넘기지 않을 것
- 진단액은 4℃의 차고 어두운 곳에 보관할 것
- 진단액은 사용할 때마다 반드시 흔들어서 사용할 것

<부 기>

부기1. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	0.006g
NH ₂ PO ₄	0.0475g
D.W.	0.006g
pH 7.2	

추백리 시험관 혈청응집반응 검사용 항원

Pullorum Antigen, Tube Agglutination Test

1. 정의

살모넬라풀로룸(*Salmonella pullorum*)균을 배양한 후 불활화하여 만든 항원이며 추백리 진단을 하기위한 혈청검사에 사용한다.

2. 제조용균주

2.1. 균주

Salmonella pullorum(SP) 표준균주 SP4, SP11, SP296주 또는 국립수의과학검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Tryptic soy agar(TSA) 또는 이와 대등한 증균 배지에 이식하여 37℃ 부란기내에서 18시간 배양한 균을 -80℃이하에 동결 보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

그람음성의 단간균이며 통성 혐기균이며 편모가없고 운동성이없다. 당분해작용(sugar fermentation)은 키시로제(xylose), 아라비노제(arabinose), 트레파노제(trepanose)의 분해능을 갖는다. 어린 병아리의 백색설가와 폐사가 특징이며 난계대에 의한 감염의 경우 부화율이 감소한다.

3. 제조

3.1. 제조용배지

MacConkey agar, tryptic soy agar(TSB) 및 TSA배지를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 증균배양

보존된 각각의 균주별로 McConkey agar에 도말하여 37℃에서 24시간 배양한다.

3.2.2. 본배양

배양한 각각의 SP표준균별로 단일 smooth colony를 1~2개 선정하여 TSB에 1차 접종하고 37℃에서 18시간 증균한 후 TSA배양기에 접종하여 37℃에서

24~48시간 배양한다. 배양 후 잡균의 혼입여부를 조사하고 오염된 배양기는 버린다.

3.2.3. 집균

증균된 배양병의 응고수를 제거하고 formalin 1%가 첨가된 식염수를 적당량 넣고 서서히 흔들어서 각각의 배양균별로 채균후 가제와 탈지면을 놓은 100 메쉬의 동망으로 여과한 후 6,000rpm에 30분간 원심하여 집균한다.

3.2.4. 항원농도조절

S.pullorum 표준균주인 SP4, SP11, SP296 각각의 집균액을 1% formalin을 가한 인산완충 식염수(부기1)로 McFarland tube No.1의 농도가 되도록 조정한 후 각각의 항원을 동량씩 혼합한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 *Salmonella pullorum* 이외의 세균이 없어야 한다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다. 검사품의 수소이온 농도는 8.2~8.5가 되어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

SP중균배지(TSB)에 검사품을 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.5. 진단반응 확인시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

양성 및 음성혈청을 사용한다. 또한 이미 혈청역가를 알고 있는 표준 양성 혈청 및 음성혈청을 사용하여 각각의 혈청을 시험관에 항원 1.0ml와 혈청 0.04ml(1:25로 희석)씩을 잘 혼합하여 37℃에서 18~24시간 반응 후 혈청응 집가를 측정한다.

3.3.5.2. 판정

양성혈청은 응집반응이 일어나야하며(맑은 상층액과 흰색의 침전물이 형성됨) 음성혈청은 응집반응이 일어나지 않아야 한다(전체적으로 같은 색도를 나타내며 침전물이 형성되지 않음). 이미 혈청역가를 알고 있는 표준 양성혈청 및 음성혈청을 사용하여 시험관법으로 혈청응집가를 측정하였을 때 그 역가가 동등(상대역가 0.8~1.25이내)하여야만 하며 음성혈청에 대해서는 응집이 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에의한 검사에 따라 고유의 색조를 띤 균등한 균액으로서 이물 이취가 없고 소분된 용기마다 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 수소이온 농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 역가시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품과 표준품의 원액 및 식염수로 10배 희석한 것을 각각 표준 강양성 혈청 3개, 약양성 혈청 3개 및 음성혈청 6개 이상에 대하여 시험관 응집반응을 실시한다.

4.5.2. 판정

검사품은 양성혈청 및 음성혈청에 대하여 표준품의 결과와 일치하여야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 시험(시험관 응집반응 검사, tube agglutination test)

항원을 2부 시험관에 1ml와 가검혈청 0.04ml를 넣고 잘 혼합하여 37℃에서 18~24시간 반응한 후 판독한다. 시험을 실시 할 때는 표준 양성 및 음성 혈청을 대조군으로 사용한다.

6.2. 판정

시험관 아랫부분에 응집괴 덩어리가 관찰되면 양성, 시험관 아랫부분에 항원이 가라앉아있는 경우는 음성, 시험관 아랫부분에 항원이 가라 앉아 있지도 않으면서 응집괴도 관찰되지 않을 경우는 의양성으로 판정한다.

※주의

- 가검혈청을 즉시 검사하지 않을 경우 4℃에 보관하며 72시간을 넘기지 않을 것
- 진단액은 4℃의 차고 어두운 곳에 보관할 것
- 진단액은 사용할 때마다 반드시 흔들어서 사용할 것

<부 기>

부기1. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	0.006g
KH ₂ PO ₄	0.0475g
D.W.	1,000ml
pH 7.2	

닭 마이코플라스마 갈리셉티쿰 급속혈청응집반응 검사용 항원

Avian Mycoplasma gallisepticum Antigen, Rapid Serum Plate Agglutination Test

1. 정의

마이코플라스마 갈리셉티쿰균을 배양한 후 불활화하여 만든 항원이며 닭 마이코플라스마 갈리셉티쿰 감염항체를 검출하기 위한 급속혈청 응집반응 검사에 사용한다.

2. 제조용 균주

2.1. 균주

Mycoplasma gallicepticum(MG) 표준균주인 MG A5969주 또는 국립수의과학 검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Mycoplasma PPLO broth배지에 말혈청을 15-20% 첨가한 증균 배지에 이식하여 37℃ 부란기 내에서 4일간 배양한 균을 -80℃이하에 동결 보존 또는 동결 건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

호기성의 아주 작은 균이며 특이한 모양의 집락을 형성한다. 포도당(dextrose), 맥아당(maltose), 만노스(mannose), 자당(sucrose)를 분해하며 산을 형성한다. 난황 난에 접종할 때 부화계란에서 잘 자란다.

3. 제조방법

3.1. 제조용배지

MG 증균 배지에 yeast extract를 첨가한 배지(부기1) 및 PPLO agar 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 증균배양

MG 증균배지 5ml에 보존 균주액을 1ml 접종하고 37℃에서 3~7일간 배양한 후 PPLO agar 평판 배지에 이식하여 37℃에서 배양한 후 특이의 균집락을 선정하여 MG 증균 배지에 배양한다.

3.2.2. 본배양

MG 증균 배지를 3,000ml flask에 2,000ml씩 분병한 다음 증균 배양액을

2-3-1-03

200ml씩 접종한 후 37℃에서 3~5일간 배양한다. 배양 후 잡균의 혼입여부를 조사하고 오염된 배양기는 버린다.

3.2.3. 집균

집균된 배양액을 고속원심기 6,000rpm에서 50분간 원심하여 침전된 균체를 집균한다.

3.2.4. 항원농도조절

집균된 균체는 0.25% 페놀을 가한 인산완충식염수(부기3)로 세 번 세척한다. 균체에 소량의 인산완충식염수를 가하며 homogenize로 풀어준 후 인산완충식염수를 첨가하여 항원액이 2X McFarland Tube No.10의 농도가 되도록 조정한다.

3.2.5. 항원염색

Crystal violet 1% 용액을 56℃에서 완전히 녹여 여과한 후 1:10,000(항원 100에 1% crystal violet 1ml)되게 넣고 잘 혼합하여 4~5℃에서 2주일간 방치하며 감작 염색한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 마이코플라스마 갈리셉티쿰 이외의 세균이 인정되어서는 아니된다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 6.0 ± 0.2 이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

MG중균배지에 검사품을 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.5. 진단반응 확인시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

공시 양성 및 음성혈청과 이미 혈청역가를 알고 있는 표준양성 혈청 및 표준음성 혈청을 사용하여 혈청평판 응집반응을 실시한다.

3.3.5.2. 판정

양성 혈청과 표준 양성 혈청은 2분내에 응집반응이 일어나야 하며 음성혈청과 표준 음성혈청은 2분 후에도 응집반응이 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 자색의 균등한 균액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다.

4.5. 동정 및 역가시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품과 표준품의 원액 및 식염수로 10배 희석한 것을 각각 표준양성 혈청 5개, 희석된 양성혈청(1:4) 5개, 음성혈청 5개 이상에 대하여 혈청평판응집반응을 실시한다.

4.5.2. 판정

검사품은 양성혈청 및 음성혈청에 대하여 표준품의 결과와 일치하여야 한다. 또한 표준품과 검사품간의 차(20초 이내)가 없어야 한다. 시험관 응집반응의 결과 혈청응집 역가가 일치하여야 하며 자가응집이 있어서는 아니된다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월 간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 시험(급속혈청응집반응, rapid serum agglutination test)

- 1) 마이크로 피펫을 이용하여 가검혈청을 30 μ l씩 평판위에 떨어뜨린다.
- 2) 양성 및 음성혈청을 동일한 방법으로 평판위에 떨어뜨린다.
- 3) 진단액을 30 μ l씩 가검혈청옆에 섞이지 않도록 떨어뜨린다.
- 4) 유리봉을 이용하여 가검혈청과 진단액을 잘 섞어준 후, 평판을 부드럽게 돌려주면서 2분간 반응을 관찰한다. 혈청과 진단액을 섞을 때는 신속하게 하며 다음 혈청으로 넘어갈 때는 마른 가제나 탈지면으로 깨끗이 닦아서 사용한다.
- 5) 2분이 되었을 때 즉시 반응을 기록한다.
- 6) 반응이 모호할 경우 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 비동화시킨 후 재시험하여 판정한다.

6.2. 판정

양성혈청은 2분 이내에 응집반응이 일어나며 음성혈청은 2분 이내에 응집반응이 일어나지 않는다. 2분 후에 응집이 일어나지 않거나 반응이 모호할 경우에는의 양성으로 판정한다.

※ 주의

- 시험 시 양성 및 음성혈청을 대조군으로 사용한다.
- 가검혈청을 즉시 검사하지 않을 경우 4 $^{\circ}$ C에 보관하며 72시간을 넘기지 않을 것
- 진단액은 4 $^{\circ}$ C의 차고 어두운 곳에 보관할 것
- 진단액은 사용할 때마다 반드시 흔들어서 사용할 것
- 검사전 생리식염수로 진단액의 자가응집 유무를 확인할 것
- 검사할때의 온도는 20-25 $^{\circ}$ C로 유지할 것
- 의양성제는 3-4주 후에 재차 검사할 것

<부 기>

부기1. PPLO broth 배지

PPLO broth	21g
Thallium acetate	1:2,000
Yeast extract	10g
L-cystein Hcl	0.02%
Equine serum	15~20%
Penicillin	1,000unit/ml

121℃에 15분간 고압멸균한다.

pH 7.8

부기2. PPLO agar 평판배지

상기(부기1) 배지에 한천 2~2.5% 넣음.

121℃에 15분간 고압멸균한다.

pH 7.8

부기3. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	0.006g
KH ₂ PO ₄	0.0475g
D.W.	1,000ml

pH 7.2

닭 마이코플라스마 갈리셉티쿰 혈구응집억제반응 검사용 항원

Avian Mycoplasma gallisepticum Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

마이코플라스마 갈리셉티쿰균을 배양한 후 불활화하여 만든 항원이며 닭 마이코플라스마 갈리셉티쿰 감염항체를 검출하기 위한 혈구응집억제반응 검사에 사용한다.

2. 제조용균주

2.1. 균주

Mycoplasma gallicepticum(MG) 표준균주인 MG A5969주 또는 국립수의과학 검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Mycoplasma PPLO broth배지에 말혈청을 15-20% 첨가한 증균 배지에 이식하여 37℃ 부란기 내에서 4일간 배양한 균을 -80℃이하에 동결 보존 또는 동결 건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

호기성의 아주 작은 균이며 특이한 모양의 집락을 형성한다. 포도당(dextrose), 맥아당(maltose), 만노스(mannose), 자당(sucrose)를 분해하며 산을 형성한다. 난황난에 접종할 때 부화계란에서 잘 자란다.

3. 제조방법

3.1. 제조용배지

MG 증균 배지에 yeast extract를 첨가한 PPLO broth배지(부기1) 및 PPLO agar 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 증균배양

MG 증균배지 5ml에 보존 균주액을 1ml 접종하고 37℃에서 3~7일간 배양한 후 PPLO agar 평판 배지에 이식하여 37℃에서 배양한 후 특이의 균집락을 선정하여 MG 증균 배지에 배양한다.

3.2.2. 본배양

MG 증균 배지를 3,000ml flask에 2,000ml씩 분병한 다음 증균 배양액을 200ml

씩 접종한 후 37℃에서 3~5일간 배양한다. 배양 후 잡균의 혼입여부를 조사하고 오염된 배양기는 버린다.

3.2.3. 집균

집균된 배양액을 고속원심기 6,000rpm에서 50분간 원심하여 침전된 균체를 집균한다.

3.2.4. 항원농도조절

집균된 균체는 0.25% 페놀을 가한 인산완충식염수(부기3)로 세 번 세척한다. 균체에 소량의 인산완충식염수를 가하며 homogenize로 풀어준 후 인산완충식염수를 첨가하여 항원액이 2X McFarland tube No.10의 농도가 되도록 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 마이코플라스마 갈리셉티쿰 이외의 세균이 인정되어서는 아니된다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 검사품의 수소이온농도는 6.0 ± 0.2 이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

MS중균배지에 검사품을 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

검사품 항원을 처음 1/10되게 희석한 다음 단계별 2진 희석하고 동량의 0.5% 닭혈구액을 가하여 혼합한 후 실온에서 45분간 정치 후 판독한다.

3.3.5.2. 판정

항원역가가 1:320 정도이어야 한다.

2-3-1-04

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원을 100X로 농축하여 60% glycerin을 항원액량과 동량으로 혼합하여 -70°C 에 보존한다. 보존 전 혈구응집반응을 실시하여 혈구응집 역가가 1:320 이상이 되도록 하며, 사용시에는 다시 혈구응집반응 시험을 실시하여 HAU(haemagglutination units)를 구한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 자색의 균등한 균액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 6.0 ± 0.2 이어야 한다.

4.5. 동정 및 역가시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품 항원을 4HAU로 하여 표준양성 혈청 및 표준 음성혈청 각각 5개 이상에 대하여 혈구응집억제 반응시험을 실시한다.

4.5.2. 판정

혈구응집억제반응결과 표준 양성혈청은 혈구응집억제반응이 일어나야하고 표준 음성혈청에 대하여는 혈구응집억제반응이 일어나지 않아야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월 간 유효하다.

6. 사용방법

1) 혈구응집반응법(HA test)

- 닭적혈구의 준비
 - 채혈하고자하는 양과 동량의 Alserver's solution을 주사기에 넣은 후 mycoplasma의 항체를 가지지 않은 닭에서 동량의 닭혈액을 채취하여 잘 섞는다.
 - 채혈한 혈액을 눈금이 있는 원심관에 옮긴 후 1,500rpm에서 10분간 원심 침전하여 진공펌프나 파스퇴르피펫을 이용하여 상층액과 백혈구층을 제거시키고 다시 PBS를 더하여 적혈구를 재부유시킨 후 앞과 같은 방법으로 혈구를 3회 세척한다. 세척 후 침전된 적혈구 용적을 감안하여 0.5%가 되도록 PBS에 부유시킨다.
- U자형 96 well 마이크로 플레이트를 이용하며, 각 well에 PBS를 50 μ l씩 첨가한다.
- 항원을 1/10되게 희석한 후, 첫 well에 50 μ l를 첨가하고 마지막 well까지 이진 희석한다.
- 0.5% 닭적혈구 부유액을 전 well에 50 μ l씩 분주하고 잘 흔들어 혼합한다.
- 실온에서 45분간 정치시킨 후 판독한다.
- 응집이 일어난 것은 적혈구가 well 전체에 골고루 퍼져있고, 응집이 일어나지 않은 것은 혈구가 가운데로 모여 단추 모양을 이루고 있다.
- 만약 검사 항원의 혈구응집역가는 1,280HAU이며, HI test를 위한 4HAU 항원은 위 항원을 1:320으로, 8HAU 항원은 1:160으로 희석하여 제조한다.

2) 혈구응집억제반응법(HI test)

- 혈구응집용 항원을 이용하여 가검혈청의 역가를 측정하기 위한 방법이다.
- 실험하고자 하는 혈청은 5배로 희석하여 사용한다.
- U자형 96 well 마이크로 플레이트를 이용하며, 1번 well에 PBS 50 μ l를, 2번 well에는 8HA unit 항원 50 μ l를, 3-8번 well에는 4HA unit 항원 50 μ l를 분주한다.
- 5배 희석된 혈청을 첫 well에 50 μ l 첨가한 후, 2진희석한다.
- 실온에 20-30분간 정치시킨 후, 0.5% 닭적혈구 부유액을 전 well에 50 μ l씩 분주하고 잘 흔들어 혼합하여 실온에서 30-45분간 정치시킨 후 판독한다.
- HI 역가는 항원을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석배수로 하며, 혈구응집은 플레이트를 45°정도 세워 일정시간이 지난 후 혈구가 흘러내리는 점을

2-3-1-04

endpoint로 하면 보다 정확하다.

※주의사항

- HI 결과는 사용하는 항원량, 희석방법, 항원과 검사시료(혈청)의 반응시간 반응온도에 따라 결과에 차이가 있으므로 실험실간 결과 비교를 위하여는 동일한 방법으로 실험을 실시하는 것이 중요하다.

<부 기>

부기1. PPLO broth 배지

PPLO broth	21g
Thallium acetate	1:2,000
Yeast extract	10g
L-cystein Hcl	0.02%
Equine serum	15~20%
Penicillin	1,000unit/ml

121℃에 15분간 고압멸균한다.

pH 7.8

부기2. PPLO agar 평판배지

상기(부기1) 배지에 한천 2~2.5% 넣음.

121℃에 15분간 고압멸균한다.

pH 7.8

부기3. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	0.006g
KH ₂ PO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml

pH 7.2

닭 마이코플라스마 시노비에 급속혈청응집반응 검사용 항원

Avian Mycoplasma Synoviae Antigen, Rapid Serum Plate Agglutination Test

1. 정의

마이코플라스마 시노비에균을 배양한 후 불활화하여 만든 항원이며 닭 마이코플라스마 시노비에 감염항체를 검출하기 위한 급속혈청 응집반응 검사에 사용한다.

2. 제조용균주

2.1. 균주

Mycoplasma Synoviae(MS) 표준균주인 MS wvu 1853주 또는 국립수의과학 검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Mycoplasma PPLO broth배지에 돼지 혈청을 10% 첨가한 증균 배지에 이식하여 37℃ 부란기 내에서 4일간 배양한 균을 -80℃ 이하에 동결 보존 또는 동결 건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

호기성의 아주 작은 균이며 특이한 모양의 집락을 형성한다. 포도당(dextrose), 맥아당(maltose), 만노스(mannose), 자당(sucrose)를 분해하며 산을 형성한다. 난황난에 접종할 때 부화계란에서 잘 자란다.

3. 제조방법

3.1. 제조용배지

MS 증균 배지에 yeast extract를 첨가한 PPLO broth배지(부기1) 및 PPLO agar 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 증균배양

MS 증균배지 5ml에 보존 균주액을 1ml 접종하고 37℃에서 3~7일간 배양한 후 PPLO agar 평판 배지에 이식하여 37℃에서 배양한 후 특이의 균집락을 선정하여 MS 증균 배지에 배양한다.

3.2.2. 본배양

MS 증균 배지를 3,000ml flask에 2,000ml씩 분병한 다음 증균 배양액을

200ml씩 접종한 후 37℃에서 24~48시간 배양한다. 배양 후 잡균의 혼입여부를 조사하고 오염된 배양기는 버린다.

3.2.3. 집균

집균된 배양액을 고속원심기 6,000rpm에서 50분간 원심하여 침전된 균체를 집균한다.

3.2.4. 항원농도조절

집균된 균체는 0.25% 페놀을 가한 인산완충식염수(부기3)로 세 번 세척한다. 균체에 소량의 인산완충식염수를 가하며 homogenize로 풀어준 후 인산완충식염수를 첨가하여 항원액이 2X McFarland Tube No.10의 농도가 되도록 조정한다.

3.2.5. 항원염색

Crystal violet 1% 용액을 56℃에서 완전히 녹여 여과한 후 1:10,000(항원 100에 1% crystal violet 1ml)되게 넣고 잘 혼합하여 4~5℃에서 2주일간 방치하며 감작 염색한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 마이코플라스마 시노비에 이외의 세균이 인정되어서는 아니된다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 6.0 ± 0.2 이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

MS중균배지에 검사품을 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.5. 진단반응 확인시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

2-3-1-05

공시 양성 및 음성혈청과 이미 혈청역가를 알고 있는 표준양성 혈청 및 표준음성 혈청을 사용하여 혈청평판 응집반응을 실시한다.

3.3.5.2. 판정

양성 혈청과 표준 양성 혈청은 2분 내에 응집반응이 일어나야 하며 음성 혈청과 표준 음성혈청은 2분 후에도 응집반응이 일어나지 않아야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원농도를 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 자색의 균등한 균액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 6.0 ± 0.2 이어야 한다.

4.5. 동정 및 역가시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품과 표준품의 원액 및 식염수로 10배 희석한 것을 각각 표준양성 혈청 5개, 희석된 양성혈청(1:4) 5개, 음성혈청 5개 이상에 대하여 혈청평판응집반응을 실시한다.

4.5.2. 판정

검사품은 양성혈청 및 음성혈청에 대하여 표준품의 결과와 일치하여야 한다. 또한 표준품과 검사품간의 차(20초 이내)가 없어야 한다. 시험관 응집반응의 결과 혈청응집 역가가 일치하여야 하며 자가응집이 있어서는 아니된다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월 간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 시험(급속혈청응집반응, rapid serum agglutination test)

- 1) 마이크로 피펫을 이용하여 가검혈청을 30 μ l씩 평판위에 떨어뜨린다.
- 2) 양성 및 음성혈청을 동일한 방법으로 평판위에 떨어뜨린다.
- 3) 진단액을 30 μ l씩 가검혈청옆에 섞이지 않도록 떨어뜨린다.
- 4) 유리봉을 이용하여 가검혈청과 진단액을 잘 섞어준 후, 평판을 부드럽게 돌려주면서 2분간 반응을 관찰한다. 혈청과 진단액을 섞을 때는 신속하게 하며 다음 혈청으로 넘어갈 때는 마른 가제나 탈지면으로 깨끗이 닦아서 사용한다.
- 5) 2분이 되었을 때 즉시 반응을 기록한다.
- 6) 반응이 모호할 경우 56℃에서 30분간 비동화시킨 후 재시험하여 판정한다.

6.2. 판정

양성혈청은 2분 이내에 응집반응이 일어나며 음성혈청은 2분 이내에 응집반응이 일어나지 않는다. 2분 후에 응집이 일어나지 않거나 반응이 모호할 경우에는 의양성으로 판정한다.

※ 주의

- 시험 시 양성 및 음성혈청을 대조군으로 사용한다.
- 가검혈청을 즉시 검사하지 않을 경우 4℃에 보관하며 72시간을 넘기지 않을 것
- 진단액은 4℃의 차고 어두운 곳에 보관할 것
- 진단액은 사용할 때마다 반드시 흔들어서 사용할 것
- 검사전 생리식염수로 진단액의 자가응집 유무를 확인할 것
- 검사할때의 온도는 20-25℃로 유지할 것
- 의양성계는 3-4주 후에 재차 검사할 것

<부 기>

부기1. PPLO broth 배지 및 PPLO agar 배지

PPLO Broth or agar	290ml
PPLO broth	21g
Thallium acetate	1:2,000
Yeast extract	10g
L-cystein Hcl	0.02%
Equine serum	15~20%
Penicillin	1,000unit/ml

121℃에 15분간 고압멸균한다.
pH 7.8

부기2. PPLO agar 평판 배지

상기(부기1)배지에 한천 2~2.5% 넣음.
121℃에 15분간 고압 멸균한다.
pH 7.8

부기3. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	0.006g
KH ₂ PO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml

pH 7.2

닭 마이코플라스마 시노비에 혈구응집억제반응 검사용 항원

Mycoplasma Synoviae Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

마이코플라스마 시노비에균을 배양한 후 불활화하여 만든 항원이며 닭 마이코플라스마 시노비에 감염항체를 검출하기 위한 혈구 응집억제반응 검사에 사용한다.

2. 제조용균주

2.1. 균주

Mycoplasma Synoviae(MS) 표준균주인 MS wvu 1853주 또는 국립수의과학 검역원에서 항원성이 이와 동등하다고 인정한 균주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

Mycoplasma PPLO broth배지에 돼지 말혈청을 10% 첨가한 증균 배지에 이식하여 37℃ 부란기 내에서 4일간 배양한 균을 -80℃이하에 동결 보존 또는 동결 건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

호기성의 아주 작은 균이며 특이한 모양의 집락을 형성한다. 포도당(dextrose), 맥아당(maltose), 만노스(mannose), 자당(sucrose)를 분해하며 산을 형성한다. 난황 난에 접종할 때 부화계란에서 잘 자란다.

3. 제조방법

3.1. 제조용배지

MS 증균 배지에 yeast extract를 첨가한 PPLO borth 배지 및 PPLO agar 배지 (부기1)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 증균배양

MS 증균배지 5ml에 보존 균주액을 1ml 접종하고 37℃에서 3~7일간 배양한 후 PPLO agar 평판 배지에 이식하여 37℃에서 배양한 후 특이의 균집락을 선정하여 MS 증균 배지에 배양한다.

3.2.2. 본배양

MS 증균 배지를 3,000ml flask에 2,000ml씩 분병한 다음 증균 배양액을 200ml

씩 접종한 후 37℃에서 24~48시간 배양한다. 배양 후 잡균의 혼입여부를 조사하고 오염된 배양기는 버린다.

3.2.3. 집균

집균된 배양액을 고속원심기 6,000rpm에서 50분간 원심하여 침전된 균체를 집균한다.

3.2.4. 항원농도조절

집균된 균체는 0.25% 페놀을 가한 인산완충식염수(부기2)로 세 번 세척한다. 균체에 소량의 인산완충식염수를 가하며 homogenize로 풀어준 후 인산완충식염수를 첨가하여 항원액이 2X McFarland Tube No.10의 농도가 되도록 조정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따라 도말염색표본에서 마이코플라스마 시노비에 이외의 세균이 인정되어서는 아니된다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 6.0 ± 0.2 이어야 한다.

3.3.4. 불활화 확인시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

MS중균배지에 검사품을 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

3.3.4.2. 판정

세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

검사품 항원을 처음 1/10되게 희석한 다음 단계별 2진 희석하고 동량의 0.5% 닭혈구액을 가하여 혼합한 후 실온에서 45분간 정치 후 판독한다.

3.3.5.2. 판정

항원역가가 1:320 정도이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조정된 항원을 100X로 농축하여 60% glycerin을 항원액량과 동량으로 혼합하여 -70℃에 보존한다. 보존 전 혈구응집반응을 실시하여 혈구응집 역가가 1:320 이상이 되도록 하며, 사용시에는 다시 혈구응집반응 시험을 실시하여 HAU(haemagglutination units)를 구한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 자색의 균등한 균액으로 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따라 수소이온농도는 6.0 ± 0.2 이어야 한다.

4.5. 동정 및 역가시험

4.5.1. 재료 및 시험

검사품 항원을 4HAU로 하여 표준양성 혈청 및 표준 음성혈청 각각 5개 이상에 대하여 혈구응집억제 반응시험을 실시한다.

4.5.2. 판정

혈구응집억제반응결과 표준 양성혈청은 혈구응집억제반응이 일어나야하고 표준 음성혈청에 대하여는 혈구응집억제반응이 일어나지 않아야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

12개월 간 유효하다.

6. 사용방법

1) 혈구응집반응법(HA test)

2-3-1-06

· 닭적혈구의 준비

- 채혈하고자하는 양과 동량의 Alserver's solution을 주사기에 넣은 후 mycoplasma의 항체를 가지지 않은 닭에서 동량의 닭혈액을 채취하여 잘 섞는다.
- 채혈한 혈액을 눈금이 있는 원심관에 옮긴 후 1,500rpm에서 10분간 원심 침전하여 진공펌프나 파스퇴르피펫을 이용하여 상층액과 백혈구층을 제거시키고 다시 PBS를 더하여 적혈구를 재부유시킨 후 앞과 같은 방법으로 혈구를 3회 세척한다. 세척 후 침전된 적혈구 용적을 감안하여 0.5%가 되도록 PBS에 부유시킨다.

- U자형 96 well 마이크로 플레이트를 이용하며, 각 well에 PBS를 50 μ l씩 첨가한다.
- 항원을 1/10되게 희석한 후, 첫 well에 50 μ l를 첨가하고 마지막 well까지 이진 희석한다.
- 0.5% 닭적혈구 부유액을 전 well에 50 μ l씩 분주하고 잘 흔들어 혼합한다.
- 실온에서 45분간 정치시킨 후 판독한다.
- 응집이 일어난 것은 적혈구가 well 전체에 골고루 퍼져있고, 응집이 일어나지 않은 것은 혈구가 가운데로 모여 단추 모양을 이루고 있다.
- 만약 검사 항원의 혈구응집역가는 1280HAU이며, HI test를 위한 4HAU 항원은 위 항원을 1:320으로, 8HAU 항원은 1:160으로 희석하여 제조한다.

2) 혈구응집억제반응법(HI test)

- 혈구응집용 항원을 이용하여 가검혈청의 역가를 측정하기 위한 방법이다.
- 실험하고자 하는 혈청은 5배로 희석하여 사용한다.
- U자형 96 well 마이크로 플레이트를 이용하며, 1번 well에 PBS 50 μ l를, 2번 well에는 8HA unit 항원 50 μ l를, 3-8번 well에는 4HA unit 항원 50 μ l를 분주한다.
- 5배 희석된 혈청을 첫 well에 50 μ l 첨가한 후, 2진희석한다.
- 실온에 20-30분간 정치시킨 후, 0.5% 닭적혈구 부유액을 전 well에 50 μ l씩 분주하고 잘 흔들어 혼합하여 실온에서 30-45분간 정치시킨 후 판독한다.
- HI 역가는 항원을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석배수로 하며, 혈구응집은 플레이트를 45°정도 세워 일정시간이 지난 후 혈구가 흘러내리는 점을

endpoint로 하면 보다 정확하다.

※주의사항

- HI 결과는 사용하는 항원량, 희석방법, 항원과 검사시료(혈청)의 반응시간, 반응온도에 따라 결과에 차이가 있으므로 실험실간 결과 비교를 위하여는 동일한 방법으로 실험을 실시하는 것이 중요하다.

<부 기>

부기1. PPLO broth 배지 및 PPLO agar 배지

PPLO Broth or agar	290ml
PPLO broth	21g
Thallium acetate	1:2,000
Yeast extract	10g
L-cystein Hcl	0.02%
Equine serum	15~20%
Penicillin	1,000unit/ml

121℃에 15분간 고압멸균한다.

pH 7.8

부기2. 인산완충식염수

NaCl	8g
KCl	0.4g
Na ₂ HPO ₄	0.006g
KH ₂ PO ₄	0.0475g
D.W	1,000ml

pH 7.2

뉴캐슬병 혈구응집억제반응 검사용 항원

Newcastle Disease Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

뉴캐슬병(ND) 바이러스 La Sota주를 SPF 발육계란에 증식시켜 불활화하여 만든 항원이며 뉴캐슬병 바이러스의 감염항체를 검출하기 위한 혈구응집억제반응 검사(haemagglutination inhibition test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

약독 뉴캐슬병 바이러스인 La Sota주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~10일령의 SPF 발육계란의 뇨막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 의 바이러스를 0.1ml씩 접종하여 37°C에서 72시간 배양하며 감염된 뇨막강액을 -50°C이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

약독 뉴캐슬병 바이러스로서 닭 적혈구를 응집하며, 병아리에 접종하면 미약한 호흡기 증상을 유발한다. 종란 평균치사 시간은 약 103시간이고 1일령 병아리에서의 대뇌병원성지수는 0.4로 약병원성 바이러스에 속한다. 닭 적혈구와 응집시킨 후 4°C에서 24시간 방치하여도 적혈구 해리가 일어나지 않는다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

9~10일령의 SPF 발육계란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 배양

종독을 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 로 희석한 바이러스를 9~11일령 SPF 발육계란의 뇨막강(allantoic cavity)내로 0.1ml씩 접종하여 37°C에서 배양한다.

3.2.2. 바이러스 수확

접종 24시간 후에 검관하여 죽은 발육계란은 버린다. 매일 2회 검관하면서 접종 발육계란의 10~30%가 죽게되면(보통 접종후 72시간 전후임) 배양을 중지시

킨다. 배양중인 부화란을 4℃의 냉장실에서 3~4시간 냉각한 후 요막액을 혈액이 혼입되지 않도록 주의하면서 무균적으로 수확한다. 수확한 요막액은 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 수확한 후 원액의 일부는 원액 검사에 사용하고 나머지는 불활화한다.

3.2.3. 바이러스 불활화

수확한 원액은 포르말린 혹은 β -propiolacton(BPL)으로 처리하여 불활화시킨다. 포르말린으로 바이러스를 불활화시킬 경우에는 포르말린을 바이러스액의 0.1% 농도로 첨가한 후 37℃에서 마그네틱 바를 이용하여 흔들면서 하룻밤동안 반응시킨다. 포르말린을 사용한 불활화의 경우 항원 역가가 2~4배정도 감소할 수 있다. β -propiolacton(BPL)으로 바이러스를 불활화 시킬 경우에는 BPL을 0.1% 되게 첨가하여 pH 7.6~7.9가 유지되도록 하면서 4시간동안 실온에서 마그네틱 바를 이용하여 흔들면서 반응시킨 후 4℃에서 하룻밤동안 정치시킨다. 불활화시킨 원액은 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확한다.

3.2.4. 항원농도조절

항원은 원액검사의 항원역가시험 결과에 의하여 결정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 항원을 원액에서부터 10^{-3} 까지 10배 단계 희석하여 희석배수 당 5개씩 9~10일령 발육계란의 요막강 내에 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 5일간 배양한 후 요막강액을 채취하여 닭 적혈구응집능을 조사하여 불활화 여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

닭 적혈구응집이 일어나서는 아니된다.

3.3.4. 특이성 및 동정시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

닭 적혈구응집능을 확인하고 뉴캐슬병 바이러스 표준 양성혈청 및 음성 혈청으로 혈구응집억제 여부를 시험한다. 또한 혈구응집능이 있는 닭 전염성기관지염 바이러스 및 EDS-76 바이러스 항혈청과의 교차반응 여부를 시험한다.

3.3.4.2. 판정

뉴캐슬병 바이러스 표준항혈청은 혈구응집억제반응이 일어나고 다른 혈청에서는 양성반응이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

PBS(부기1), U type microplate, 닭 RBC 및 Alsiver's solution(부기2)을 사용한다. 뉴캐슬병 바이러스항체 음성인 닭 혈액과 Alsiver's solution을 동량혼합한 후 1,500rpm에서 원심침전하여 상층액을 제거하고 PBS를 가하여 혈구를 3회 세척한 후 적혈구를 1%되게 하여 항원의 혈구응집반응 (haemagglutination Test)을 실시한다.

3.3.5.2. 혈구응집반응

- 1) Microplate에서 검사품 항원을 2진 희석한다.(25 μ l/Well)
- 2) 1% 닭 적혈구 25 μ l 부유액을 희석된 항원에 각각 넣는다.
- 3) 이때 항원이 함유되지 않는 PBS well에 1% 적혈구 부유액을 동량으로 넣는다(대조군).
- 4) 항원과 적혈구를 잘 흔들어 혼합시킨다.
- 5) 실온에서 40분간 정치시킨 후 판독한다.

3.3.5.3. 판정

적혈구응집이 일어난 최종항원의 희석배수를 검사항원의 혈구응집역가로 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

2-3-2-01

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 특이성 및 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃이하 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) U자형 96 well 마이크로 플레이트 전체에 PBS를 0.025ml씩 분주한다.
- 2) 가검혈청을 첫 번째 well에 각각 0.025ml씩을 분주한다. 각각의 플레이트에는 반드시 양성혈청과 음성혈청을 포함시킨다.
- 3) 자동희석 시 또는 마이크로 피펫을 이용하여 각각의 혈청을 2진 희석한다.
- 4) 4 HAU 항원 0.025ml을 각 well에 넣어준 후 진탕기로 잘 흔들어 혼합하고 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 5) 30분 후 1% 적혈구 부유액 0.025ml을 각 well에 넣어주고 플레이트를 잘 흔들어 실온에서 40분간 정치시킨 후 혈구응집억제 정도를 관찰한다.

6.2. 판정

- 1) HI 역가는 4 HA unit 항원을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석배수이다.
- 2) 음성대조혈청이 4배 이상의 역가를 보이지 않으며 양성대조혈청의 역가가 알려진 역가의 2배 이내에 있어야 유효하다.

* 유의사항

HI 결과는 사용하는 항원량, 희석방법, 항원과 검사시료(혈청)의 반응시간, 반응온도 등에 따라 결과에 차이가 있으므로 실험시간 결과 비교를 위하여는 동일한 방법으로 실험을 실시하는 것이 중요하다.

<부 기>

부기1. **Alsever's solution**

NaCl	8.0g
Sodium citrate	0.92g
Dextrose	2.05g
D.W.	1000ml

부기2. **0.1M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)**

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W.	1000ml

최종 PH 7.2로 조정.

닭 전염성기관지염 혈구응집억제반응 검사용 항원

Infectious Bronchitis Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

닭 전염성 기관지염(IB) 바이러스 Massachusetts 41주를 SPF 발육계란에 증식시켜 불활화하여 만든 항원이며 닭 전염성 기관지염바이러스의 감염항체를 검출하기 위한 혈구응집억제반응검사(haemagglutination Inhibition Test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

닭 전염성 기관지염바이러스(IBV)인 Massachusetts 41주(M41)를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~10일령의 SPF 발육계란의 뇨막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 의 바이러스를 0.1ml씩 접종하여 37°C에서 48~80시간 배양하며 감염된 뇨막강액을 -50°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

IBV M41주는 발육계란에서 잘 증식하고 닭 신장세포에서 CPE를 나타낸다. 닭 적혈구에 대한 혈구응집능이 없으나 phospholipase C type 1 효소를 처리하면 혈구응집능이 생기며 이를 이용하여 혈구응집억제반응용 항원을 제조한다. 닭에 접종하면 호흡기 증상을 유발하고 산란중인 닭에 접종 시에는 산란율을 저하시키는 병원성 바이러스이다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

9~11일령의 SPF 발육계란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 배양

종독을 $10^{4.0} \sim 10^{5.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 로 희석한 바이러스를 9~11일령 발육계란의 뇨막강(allantoic cavity)내 0.1ml씩 접종하여 37°C에서 30~48시간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 수확

접종 후 24시간 후에 검란하여 죽은 발육계란은 버린다. 접종 30~48시간 후

2-3-2-02

배양을 중지시킨다. 발육계란을 4°C의 냉장실에서 3~4시간 냉각한 후 뇨막강액을 혈액이 혼입되지 않도록 주의하면서 무균적으로 채취한다. 채취한 뇨막강액은 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 수확한다.

3.2.3. 바이러스 농축

저속 원심분리한 뇨막강액을 초고속 원심분리기를 이용하여 30,000 x g에서 2시간동안 원심분리하여 바이러스를 침전시킨다. 원심분리 후 상층액은 버리고 침전된 바이러스는 HEPES buffered saline(부기1)로 원래량의 1/100이 되게 재 부유시킨다.

3.2.4. 효소 및 방부제처리

항원의 IBV는 혈구응집능이 없으나 phospholipase C type 1 효소를 처리하면 혈구응집능이 생긴다. 효소처리는 phospholipase를 HEPES buffer에 1 ml당 1unit가 함유되도록 녹인다음, 100배 농축된 IBV와 1:1로 섞는다. 30분 간격으로 흔들어 주면서 37°C에서 2시간 동안 반응시킨다. 처리한 항원에 방부제(0.01% sodium merthiolate)를 첨가하여 4°C에서 2주간 숙성한다.

3.2.5. 항원농도조절

항원은 원액검사의 항원역가시험 결과에 의하여 결정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

효소 처리한 항원을 원액에서부터 10^{-3} 까지 10배 단계 희석하여 희석배수당 5개씩 9~10일령 SPF 발육계란의 장요막강에 접종하여 37°C에서 18일령 까지 배양하여 폐사를 조사하고 생존 발육계란은 파란하여 계태아에서의 IBV 특이 병변인 위축상태(dwarfing, stunting)등을 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

계 태아는 IBV에 의한 특이방법 없이 모두 정상발육 하여야한다.

3.3.4. 특이성 및 동정시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

닭 적혈구응집능을 확인하고 닭 전염성기관지염 바이러스 표준 항혈청으로 혈구응집억제 여부를 시험한다. 또한 혈구응집능이 있는 닭 전염성 기관지염 바이러스 및 EDS-76 바이러스 항혈청과의 교차반응 여부를 시험한다.

3.3.4.2. 판정

IBV 표준양성혈청에만 혈구응집억제반응이 일어나고 다른 혈청에서는 양성반응이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

PBS(부기1), U type microplate, 닭 RBC 및 Alsilver's solution(부기2)을 사용한다. 뉴캐슬병 바이러스항체 음성인 닭 혈액과 Alsilver's solution을 동량혼합한 후 1,500rpm에서 원심침전하여 상층액을 제거하고 PBS를 가하여 혈구를 3회 세척한 후 적혈구를 1%되게 하여 항원의 혈구응집반응(haemagglutination test)을 실시한다.

3.3.5.2. 혈구응집반응

- 1) Microplate에서 검사품 항원을 2배 단계 희석한다(0.025ml/well).
- 2) 1% 닭 적혈구 부유액 25 μ l를 희석된 항원에 각각 넣는다.
- 3) 이때 항원이 함유되지 않는 PBS well에 1% 적혈구 부유액을 동량으로 넣는다(대조군).
- 4) 항원과 적혈구를 잘 흔들어 혼합시킨다.
- 5) 실온에서 40분간 정치시킨 후 판독한다.

3.3.5.3. 판정

적혈구응집이 일어난 최종항원의 희석배수 (32배 이상)를 검사항원의 혈구응집역가로 한다.

3.4. 최종원액

3.2.5에 의하여 조절된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉진한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 특이성 및 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

4℃에 보존할 경우에는 2~3개월 이내에 사용하고 장기간 보존할 때는 -20℃이하 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) U자형 96 well 마이크로 플레이트 전체에 PBS를 0.025ml씩 분주한다.
- 2) 가검혈청을 첫 번째 well에 각각 0.025ml씩을 분주한다. 각각의 플레이트에는 반드시 양성혈청과 음성혈청을 포함시킨다.
- 3) 자동희석 시 또는 마이크로 피펫을 이용하여 각각의 혈청을 2배 단계 희석한다.
- 4) 4 HA unit 항원 0.025ml을 각 well에 넣어준 후 진탕기로 잘 흔들어 혼합하고 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 5) 30분 후 1% 적혈구 부유액 0.025ml을 각 well에 넣어주고 플레이트를 잘 흔들어 실온에서 40분간 정치시킨 후 혈구응집억제 정도를 관찰한다.

6.2. 판정

- 1) HI 역가는 4 HA unit 항원을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석배수이다. 혈구응집은 플레이트를 45. 정도 세워 일정시간이 지난 후 혈구가 흘러 내리

는 점을 endpoint로 하면 보다 정확하다.

- 2) 양성대조혈청과 동일한 속도와 정도로 적혈구가 흘러 내리는 well을 혈구응집이 억제된 것으로 판정한다.
- 3) 결과는 음성대조혈청이 4배 이상의 역가를 보이지 않으며 양성대조혈청의 역가가 알려진 역가의 한단계 이내에 있어야 유효하다.
- 4) 양성반응은 HI역가 $1:32(\log_2^5)$ 이상을 양성으로 판정한다.

* 유의사항

HI 결과는 사용하는 항원량, 희석방법, 항원과 검사시료(혈청)의 반응시간, 반응온도 등에 따라 결과에 차이가 있으므로 실험시간 결과 비교를 위하여는 동일한 방법으로 실험을 실시하는 것이 중요하다.

<부 기>

부기1. HEPES buffered saline

HEPES	5.96g
NaCl	8.19g
CaCl ₂	0.15g
D.W.	1000ml
최종 pH 6.5로 조정.	

부기2. Alsever's solution

NaCl	8.0g
Sodium citrate	0.92g
Dextrose	2.05g
D.W.	1000ml

부기3. 0.1M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W.	1000ml
최종 PH 7.2로 조정.	

닭 전염성 에프낭병 한천겔 면역확산반응 검사용 항원

Infectious Bursa Disease Antigen, Agar Gel Immunodiffusion Test

1. 정의

닭 전염성 F낭병(IBD) 바이러스 P4 주를 SPF 병아리에 접종하여 F낭 유제액을 불활화하여 만든 한천겔면역확산반응용 항원이며 닭 전염성 F낭병 감염바이러스의 항체를 검출하기 위한 한천겔 면역확산 반응검사(agar gel immunodiffusion test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

강독 닭전염성 F낭병(IBD) 바이러스 P4주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

4~6주령 SPF 닭의 총 배설강 내로 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 의 바이러스를 0.1ml 씩을 접종하여 37°C에서 3~4일간 배양한 후에 F낭을 무균적으로 채취하여 PBS로 유제하여 -50°C이하에서 동결보존 또는 동결건조하여 4°C이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

강독형 IBD 바이러스로서 3~6주령 병아리에 접종시 심한 임상증상을 유발한다. 접종 3일 후부터 심한 수양성 설사와 함께 폐사가 동반되며 폐사계는 F낭에 심한 종창, 충출혈 등 병변이 나타난다. 폐사율은 10~20% 정도이다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 동물

4~6주령의 SPF 닭을 사용한다.

3.1.2. 재료

IBD 바이러스 P4주와 PBS 및 0.1% 포르말린을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 접종

종독을 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 로 희석한 바이러스를 4~6주령 SPF 닭의 총배설강 내로 0.1ml씩 접종한다.

2-3-2-03

3.2.2. 바이러스 수확

접종 3~5일 후에 SPF 닭의 F낭을 가능하면 무균적으로 채취한다. 채취한 F낭을 PBS로 50% 유제액이 되도록 유제한다. 동결, 용해를 3회 반복하여 세포를 모두 깨뜨린 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수확한다.

3.2.3. 바이러스 불활화

수확한 원액에 포르말린을 0.1% 되게 첨가하여 37°C에서 마그네틱바를 이용하여 회전혼합하면서 24시간동안 처리한다. 처리 후 다시 포르말린을 0.1% 되게 첨가하여 앞의 과정을 2회 더 반복하여 불활화 한다.

3.2.4. 항원농도조절

항원을 원액검사의 역가시험 결과에 의하여 4배 이상 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 항원을 원액에서부터 10^{-3} 까지 10진 희석하여 희석배수 당 5개씩 9~10일령 발육계란의 장노막(chorioallantoic membrane)에 접종하여 37°C에서 배양한다. 접종 5일후 발육계란을 파란하여 계태아 간의 괴사소 등 IBD 바이러스 특이병변 유무를 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

계태아는 간의괴사 및 IBD 바이러스에 의한 특이병변이 없어야한다.

3.3.4. 항원특이성 및 동정시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

항원을 IBD 바이러스 표준 양성혈청 및 음성혈청을 이용하여 한천겔침강 반응으로 반응여부를 확인한다. 또한 닭 뇌척수염 바이러스 및 가금 인플루엔자 바이러스 항혈청과의 교차반응 여부를 시험한다.

3.3.4.2. 판정

IBV 표준양성혈청에만 양성반응이 일어나고 다른 혈청에서는 양성반응이

일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

항원을 PBS(부기1)로 2^5 까지 2배 단계 희석하여 각각 IBV 바이러스 표준 양성혈청과 한천겔 면역확산반응(부기2)을 실시하여 역가를 시험한다.

3.3.5.2. 판정

항원역가는 최소 4배 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

4.4.1. 재료 및 시험

전염성 F낭병에 감수성이 있는 3~4주령의 닭 15마리를 사용하여 10마리는 시험계로, 5마리는 무접종 대조계로 하여 검사품을 10배로 희석하여 시험계의 총배설강에 각각 0.1ml씩을 접종하고 대조계와 같이 3~4일간 관찰한다. 3~4일 후에 부검하여 다리근육의 출혈 및 F낭의 종대 또는 위축 유무를 조사한다.

4.4.2. 판정

시험닭은 모두 이상없이 건강하여야 한다.

4.5. 특이성 및 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

4.6.1. 재료 및 시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

4.6.2. 판정

검사품의 항원역가는 최종희석배수 2배 이상에서 양성반응을 나타내어야 한다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃이하 냉동고에 보존하여야 하며 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 깨끗이 닦은 유리판 또는 플라스틱 디시를 수평판 위에 놓고 수평으로 맞춘다.
- 2) Gel medium을 끓는 물에 중탕하여 완전히 녹인 후 16ml를 넘치지 않게 고르게 편 다음 굳힌다.
- 3) Gel 편치를 원하는 형태로 well을 뚫고 진공펌프로 빨아낸다.
- 4) 항원을 50 μ l을 중앙 well에 블록하게 솟아 오르도록 넣고 주위 well에는 가검혈청(50 μ l)과 표준양성혈청(50 μ l)을 넣는다.
- 5) Gel이 건조되지 않도록 습기가 유지되는 용기에 유리판을 넣고 뚜껑을 덮어 실온에 둔다.

6.2. 판정

48시간 동안 관찰하여 가검혈청과 항원사이에 양성혈청의 것과 동일한 띠가 생기면 양성으로 판정한다. 그러나 양성혈청에서 생긴 띠와 가검혈청에서 생긴 띠가 서로 교차되어 나타나면 가검혈청은 양성으로 판정할 수 없다.

* 유의사항

관독할 때에는 유리판을 불빛 위에 두고 보아야 혈청과 항원 사이에 생긴 띠를 관찰하기 쉽다.

<부 기>

부기1. PBS(posphate buffered saline)

NaCl	8.0g
KCl	0.4g
KH ₂ PO ₄	0.06g
Na ₂ HPO ₄	0.0475g
D.W.	1,000ml

부기2. Agar gel 제조법

PEG(분자량 8,000)	10.0g
Agar(purified)	5.0g
Sodium chloide(8%)	40.0g
PBS(pH 7.2)	5ml
D.W.	Up to 500ml

산란저하증 혈구응집억제반응 검사용 항원

Egg Drop Syndrom Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

닭 산란저하증 '76(EDS '76) 바이러스 BC14주를 오리 발육란에 증식시켜 불활화하여 만든 항원이며 닭 산란저하증 바이러스의 감염항체를 검출하기 위한 혈구응집억제반응 검사(haemagglutination inhibition test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

EDS '76 바이러스인 BC14주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

9~10일령의 오리 발육란의 노막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 의 바이러스를 0.1ml씩 접종하여 37°C에서 48~80시간 배양하며 감염된 노막강액을 -50°C 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4°C 이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

아데노바이러스로서 닭적혈구를 응집하며 산란계에 접종하면 심한 산란저하를 유발한다. 오리의 부화란이나 오리 태아 간세포배양에서 잘 자라며, 계태아 간세포에서도 잘 자란다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

9~11일령의 EDS '76 바이러스 항체 음성 오리 유래 발육란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 배양

종독을 $10^{6.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 로 희석한 바이러스를 9~11일령 오리 발육란의 노막강(allantoic cavity)내로 0.1ml씩 접종하여 37°C에서 72~80시간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 수확

접종 후 24시간후에 검란하여 죽은 발육란은 버린다. 매일 2회 검란하면서 접종 4~5일후 배양을 중지시킨다. 발육란을 4°C의 냉장실에서 3~4시간 냉각한 후 노막강액을 혈액이 혼입되지 않도록 주의하면서 무균적으로 채취한

다. 뇨막강액은 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 수확한다.

3.2.3. 바이러스 불활화

수확한 원액은 열처리 혹은 β -propiolacton(BPL)을 처리하여 불활화 시킨다. 열처리로 불활화시킬 경우에는 65℃에서 1시간 처리하며 BPL로 불활화시킬 경우에는 바이러스액에 BPL을 0.1% 되게 첨가하여 pH 7.6~7.9가 유지되도록 하면서 4시간동안 실온에서 마그네틱 바를 이용하여 교반하면서 반응시킨 후 4℃에서 하룻밤 동안 정치시킨다. 불활화시킨 바이러스액은 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확한다.

3.2.4. 항원농도조절

항원은 원액검사의 항원역가시험 결과에 의하여 결정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

산란저하증 바이러스에 감수성이 있는 9~11일령의 발육오리란을 10개 이상 사용하여 검사품을 뇨막강 내에 0.2ml씩을 접종하여 37℃에서 배양한다. 접종 7일 후에 뇨막강액을 채취하여 2차로 10개의 9~11일령의 발육오리란의 뇨막강 내에 0.2ml씩을 계대 접종한 후 37℃에서 7일간 배양한다. 각각의 접종란은 접종 7일 후에 뇨막강액의 닭 적혈구 응집성을 조사한다.

3.3.3.2. 판정

검사품을 1차 접종한 종란과 1차 접종하여 얻은 뇨막강액을 2차 접종한 종란은 이상이 없어야 하며 뇨막강액은 적혈구 응집성이 없어야 한다.

3.3.4. 특이성 및 동정시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

닭 적혈구응집능을 확인하고 닭 산란저하증 바이러스 표준양성혈청 및 음성혈청으로 혈구응집억제 여부를 시험한다. 또한 혈구응집능이 있는 닭 전염성기관지염 바이러스 및 뉴캐슬병 바이러스 항혈청과의 교차반응

여부를 시험한다.

3.3.4.2. 판정

닭 산란저하증 바이러스 표준양성혈청과는 혈구응집억제반응이 일어나고 다른 혈청에서는 양성반응이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

PBS(부기1), U type microplate, 닭 RBC 및 Alsilver's solution(부기2)을 사용한다. 닭 산란저하증 바이러스항체 음성인 닭 혈액과 Alsilver's solution 을 동량혼합한 후 1,500rpm에서 원심침전하여 상층액을 제거하고 PBS 를 가하여 혈구를 3회 세척한 후 적혈구를 1%되게 하여 항원의 혈구 응집반응(haemagglutination test)을 실시한다.

3.3.5.2. 혈구응집반응

- 1) Microplate에서 검사품 항원을 2배 단계 희석한다(0.025ml/well).
- 2) 1% 닭 적혈구 부유액 25 μ l를 희석된 항원에 각각 넣는다.
- 3) 이때 항원이 함유되지 않는 PBS well에 1% 적혈구 부유액을 동량으로 넣는다(대조군).
- 4) 항원과 적혈구를 잘 흔들어 혼합시킨다.
- 5) 실온에서 40분간 정치시킨 후 판독한다.

3.3.5.3. 판정

적혈구응집이 일어난 최종항원의 희석배수를 검사항원의 혈구응집역가로 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전 한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 특이성 및 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃이하 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효한다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) U자형 96 well 마이크로 플레이트 전체에 PBS를 0.025ml씩 분주한다.
- 2) 가검혈청을 첫 번째 well에 각각 0.025ml씩을 분주한다. 각각의 플레이트에는 반드시 양성혈청과 음성혈청을 포함시킨다.
- 3) 자동희석 시 또는 마이크로 피펫을 이용하여 각각의 혈청을 2배 단계 희석한다.
- 4) 4 HA unit 항원 0.025ml을 각 well에 넣어준 후 진탕기로 잘 흔들어 혼합하고 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 5) 30분 후 1% 닭 적혈구 부유액 0.025ml을 각 well에 넣어주고 플레이트를 잘 흔들어 실온에서 40분간 정치시킨 후 혈구응집억제 정도를 관찰한다.

6.2. 판정

- 1) HI 역가는 4 HA unit 항원을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석배수이다.
- 2) 음성대조혈청이 4배 이상의 역가를 보이지 않으며 양성대조혈청의 역가가 알려진 역가의 2배 이내에 있어야 유효하다.

* 유의사항

- HI 결과는 사용하는 항원량, 희석방법, 항원과 검사시료(혈청)의 반응시간, 반응 온도 등에 따라 결과에 차이가 있으므로 실험시간 결과 비교를 위하여는 동일한 방법으로 실험을 실시하는 것이 중요하다.
- EDS 항원의 혈구응집억제 반응에서는 비특이 반응이 많이 관찰되므로 결과를 판독할 때는 플레이트를 기울려 혈구가 흘러내리는 것만을 읽어야한다.

<부 기>

부기1. Alsever's solution

NaCl	8.0g
Sodium citrate	0.92g
Dextrose	2.05g
D.W	1000ml

부기2. 0.1 M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W	1000ml

최종 pH 7.2로 조정.

조류인플루엔자 혈구응집억제반응 검사용 항원

Avian Influenza Virus Antigen, Haemagglutination Inhibition Test

1. 정의

조류인플루엔자(AI) 바이러스를 SPF 발육계란에 증식시켜 불활화하여 만든 항원이며 조류 인플루엔자 바이러스의 감염항체를 검출하기 위한 혈구응집억제반응 검사(haemagglutination inhibition test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

AI 바이러스 MS96주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

SPF 발육계란의 뇨막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 의 바이러스를 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 48~72시간 배양하며 감염된 뇨막강액을 -50℃이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃이하에 보존한다.

2.3. 성상 및 독력

혈청형은 H9N2 형이다. 닭에 접종하면 호흡기 증상을 유발하고 산란중인 닭에 접종 시에는 산란율을 저하시키는 병원성 바이러스이다. 발육계란에서 잘 증식되며 혈구응집능이 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

9~10일령의 SPF 발육계란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 배양

종독을 $10^{3.0} \sim 10^{4.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 로 희석한 바이러스를 9~11일령 발육란의 뇨막강(allantoic cavity)내로 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 48~72시간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 수확

접종 후 24시간 후에 검란하여 죽은 발육계란은 버린다. 접종 48~72시간 후 배양을 중지시킨다. 발육계란을 4℃의 냉장실에서 3~4시간 냉각한 후 뇨막강액을 혈액이 혼입되지 않도록 주의하면서 무균적으로 채취한다. 채취한 뇨막

2-3-2-05

액은 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액만 수확한다.

3.2.3. 바이러스 불활화

수확한 원액은 β -propiolacton(BPL)로 처리하여 불활화시킨다. BPL을 0.1% 되게 첨가하여 pH 7.6~7.9가 유지되도록 하면서 4시간동안 실온에서 마그네틱 바를 이용하여 교반하면서 4°C에서 하룻밤 동안 정치시킨다. 불활화시킨 바이러스액은 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확한다.

3.2.4. 항원농도조절

항원은 원액검사의 항원역가시험 결과에 의하여 결정한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

불활화 된 항원을 원액에서부터 10^{-3} 까지 10배 단계 희석하여 희석배수당 5개씩 9~10일령 발육계란의 노막강 내에 0.1ml씩 접종하여 37°C에서 5일간 배양한 후 노막강액을 채취하여 닭 적혈구응집능을 조사하여 불활화 여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

닭 적혈구응집이 일어나서는 아니된다.

3.3.4. 특이성 및 동정시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

닭 적혈구응집능을 확인하고 조류 인플루엔자 바이러스 표준양성혈청 및 음성혈청으로 혈구응집억제 여부를 시험한다. 또한 혈구응집능이 있는 닭 전염성기관지염 바이러스 및 EDS '76 바이러스 항혈청과의 교차반응 여부를 시험한다.

3.3.4.2. 판정

조류 인플루엔자 바이러스 표준양성혈청과는 혈구응집억제반응이 일어나고 다른 혈청에서는 양성반응이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

PBS(부기1), U type microplate, 닭 RBC 및 Alsiver's solution(부기2)을 사용 동량혼합한 후 1,500rpm에서 원심침전하여 상층액을 제거하고 PBS를 가하여 혈구를 3회 세척한 후 적혈구를 1%되게 하여 항원의 혈구 응집가 시험(HA test)를 실시한다.

3.3.5.2. HA test(antigen titration)

- 1) Microplate에서 검사품 항원을 2배 단계 희석한다(0.025ml/well).
- 2) 1% 닭 적혈구 부유액 25 μ l를 희석된 항원에 각각 넣는다.
- 3) 이때 항원이 함유되지 않는 PBS well에 1% 적혈구 부유액을 동량으로 넣는다(대조군).
- 4) 항원과 적혈구를 잘 흔들어 혼합시킨다.
- 5) 실온에서 40분간 정치시킨 후 판독한다.

3.3.5.3. 판정

적혈구응집이 일어난 최종항원의 희석배수를 검사항원의 혈구응집역가로 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

2-3-2-05

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 특이성 및 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃이하 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효한다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) U자형 96 well 마이크로 플레이트 전체에 PBS를 0.025ml씩 분주한다.
- 2) 가검혈청을 첫 번째 well에 각각 0.025ml씩을 분주한다. 각각의 플레이트에는 반드시 양성혈청과 음성혈청을 포함시킨다.
- 3) 자동희석 시 또는 마이크로 피펫을 이용하여 각각의 혈청을 2배 단계 희석한다.
- 4) 4 HA unit 항원 0.025ml을 각 well에 넣어준 후 진탕기로 잘 흔들어 혼합하고 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 5) 30분 후 1% 적혈구 부유액 0.025ml을 각 well에 넣어주고 플레이트를 잘 흔들어 실온에서 40분간 정치시킨 후 혈구응집억제 정도를 관찰한다.

6.2. 판정

- 1) HI 역가는 4 HA unit 항원을 완전히 억제하는 혈청의 최대 희석배수이다.
- 2) 음성대조혈청이 4배 이상의 역가를 보이지 않으며 양성대조혈청의 역가가 알려진 역가의 2배 이내에 있어야 유효하다.

* 유의사항

HI 결과는 사용하는 항원량, 희석방법, 항원과 검사시료(혈청)의 반응시간, 반응온도 등에 따라 결과에 차이가 있으므로 실험시간 결과 비교를 위하여는 동일한 방법으로 실험을 실시하는 것이 중요하다.

<부 기>

부기1. **Alsever's solution**

NaCl	8.0g
Sodium citrate	0.92g
Dextrose	2.05g
D.W	1000ml

부기2. **0.1M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)**

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W	1000ml

최종 PH 7.2로 조정.

조류인플루엔자 한천겔 면역확산반응 검사용 항원

Avian Influenza Virus Antigen, Agar Gel Immunodiffusion Test

1. 정의

조류인플루엔자(AI) 바이러스를 SPF 발육계란의 장요막에 증식시켜 유제액을 불활화하여 만든 항원이며 조류 인플루엔자 바이러스의 감염항체를 검출하기 위한 한천겔면역확산반응검사(agar gel immunodiffusion test)에 사용한다.

2. 제조용 바이러스

2.1. 바이러스주

AI 바이러스 MS96주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

SPF 발육계란의 뇨막강 내에 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/0.1ml의 바이러스를 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 48~72시간 배양하며 감염된 뇨막강액을 -50℃ 이하에 동결보존 또는 동결건조하여 4℃ 이하에 보존한다.

2.3. 성장 및 독력

혈청형은 H9N2 형이다. 닭에 접종하면 호흡기 증상을 유발하고 산란중인 닭에 접종 시에는 산란율을 저하시키는 병원성 바이러스이다. 발육계란에서 잘 증식되며 혈구응집능이 있다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

9~11일령의 SPF 발육계란을 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 바이러스 배양

종독을 $10^{3.0} \sim 10^{4.0}$ EID₅₀/0.1ml로 희석한 바이러스를 9~11일령 발육계란의 장 뇨막(chorioallantoic membrane)상에 0.1ml씩 접종하여 37℃에서 24~30시간 배양한다.

3.2.2. 바이러스 수확

접종 후 24시간 후에 검란하여 죽은 발육계란은 버린다. 접종 24~30시간 후 배양을 중지시킨다. 발육계란을 4℃의 냉장실에서 3~4시간 냉각한 후 파란

하여 장노막을 무균적으로 채취한다. 채취한 장노막을 PBS로 2회 세척한다. 세척후 저속 원심분리하여 잔여 PBS(부기1)를 제거하고 장노막만 채취한다. 장노막을 -50°C 에 동결용해를 3회 이상 반복하거나 유제기를 이용하여 충분히 유제한다. 유제액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액만 수확한다.

3.2.3. 바이러스 불활화

수확한 원액은 β -propiolacton(BPL)로 처리하여 불활화시킨다. BPL을 0.1% 되게 첨가하여 pH 7.6~7.9가 유지되도록 하면서 4시간동안 실온에서 마그네틱 바를 이용하여 교반하면서 4°C 에서 하룻밤 동안 정치시킨다. 불활화시킨 바이러스액은 1,500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 수확한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.3. 불활화 확인시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

9~10일령의 SFP 발육계란을 10개 이상 사용하여 검사품을 요막강에 접종하여 37°C 에서 5일간 배양한 후 요막강액을 채취하여 닭 적혈구응집능을 조사하여 불활화 여부를 확인한다.

3.3.3.2. 판정

닭 적혈구응집이 일어나서는 아니된다.

3.3.4. 특이성 및 동정시험

3.3.4.1. 재료 및 시험

항원을 AI 바이러스 표준양성혈청 및 음성혈청을 이용하여 한천겔침강 반응으로 반응여부를 시험한다. 또한 닭 뇌척수염 바이러스 및 닭 전염성 에프낭병 바이러스 항혈청과의 교차반응여부를 시험한다.

3.3.4.2. 판정

조류 인플루엔자 표준양성혈청에만 양성반응이 일어나고 다른 혈청에서는 양성반응이 일어나지 않아야 한다.

3.3.5. 항원역가시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

항원을 PBS(부기1)로 2^{-5} 까지 2배 단계 희석하여 각각 AI 바이러스 양성 혈청과 한천겔 면역확산반응(부기2)을 실시하여 역가를 시험한다.

3.3.5.2. 판정

항원역가는 최소 4배 이상이어야 한다.

3.4. 최종원액

3.2.4에 의하여 조절된 항원을 최종원액으로 한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-1에 의한 검사에 따라 고유의 성상을 지니고 이물 및 이취가 없고 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 순수시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-4에 의한 검사에 따른다.

4.3. 무균시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.4. 불활화 확인시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

4.5. 특이성 및 동정시험

3.3.4에 의한 검사에 따른다.

4.6. 역가시험

3.3.5에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20℃ 이하 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효한다

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 깨끗이 닦은 유리판 또는 플라스틱 디시를 수평판 위에 놓고 수평으로 맞춘다.
- 2) Gel medium을 끓는 물에 증탕하여 완전히 녹인 후 16ml를 넘치지 않게 고르

계 편 다음 굳힌다.

- 3) Gel 편치를 원하는 형태로 well을 뚫고 진공펌프로 빨아낸다.
- 4) 항원을 $50\mu\text{l}$ 을 중앙 well에 블록하게 솟아 오르도록 넣고 주위 well에는 가검혈청($50\mu\text{l}$)과 표준양성혈청($50\mu\text{l}$)을 넣는다.
- 5) Gel이 건조되지 않도록 습기가 유지되는 용기에 유리판을 넣고 뚜껑을 덮어 실온에 둔다.

6.2. 판정

48시간 동안 관찰하여 가검혈청과 항원사이에 양성혈청의 것과 동일한 띠가 생기면 양성으로 판정한다. 그러나 양성혈청에서 생긴 띠와 가검혈청에서 생긴 띠가 서로 교차되어 나타나면 가검혈청은 양성으로 판정할 수 없다.

* 유의사항

판독할 때에는 유리판을 불빛 위에 두고 보아야 혈청과 항원 사이에 생긴 띠를 관찰하기 쉽다.

<부 기>

부기1. 0.1 M 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.9g
KH ₂ PO ₄	0.2g
D.W	1000ml

최종 PH 7.2로 조정.

부기2. Agar gel 제조법

Agar(purified)	1g
Sodium chloride(8%)	8g
0.1M PBS(pH 7.2)	10ml
D.W	Up to 500ml

2-4 개

여 백

광견병바이러스 검사용 단클론성 항체

Monoclonal Antibody against Canine Rabies Virus

1. 정의

광견병바이러스에 특이적으로 반응하는 단클론성 항체 생산잡종 세포주(RABV-A주)를 증식시켜 만든 단클론성 항체이며 광견병바이러스(rabies virus) 검사에 사용한다.

2. 제조용 세포

2.1. 세포주

광견병바이러스 특이 항체를 생산하는 hybridoma RABV-[A]주 또는 국립수의 과학검역원에서 인정한 세포주를 사용한다.

2.2. 계대 및 보존

광견병바이러스 특이항체를 생산하는 hybridoma(RABV-[A]주)를 세포증식용 배지(부기1)에 증식시킨 후 그 상층액을 형광항체법으로 확인하고, hybridoma를 수확하여 세포유지용 배지(부기2)와 혼합하여 세포를 -70°C 에서 하룻밤 얼린 후 액체 질소에 동결보존한다.

2.3. 성장 및 독력

광견병바이러스의 단클론성항체는 광견병바이러스에 대한 중화능이 없다. 광견병바이러스를 감염시킨 세포 및 감염동물의 편도 또는 폐를 동결절편한 세포의 세포질에 특이적으로 반응하여 결합한다.

3. 제조방법

3.1. 제조용 재료

3.1.1. 세포주

광견병바이러스 특이항체를 생산하는 hybridoma (RABV-[A]주)를 사용한다.

3.1.2. 배지

세포증식용 배지(부기1) 및 세포유지용 배지(부기2)를 사용한다.

3.2. 원액제조

3.2.1. 잡종 세포배양

세포증식용 배지에 광견병바이러스 특이항체 생산 hybridoma를 3~5일간 배양한다.

2-4-2-01

3.2.2. 잡종 세포수확

Hybridoma의 증식을 확인한 후, 상층액을 수확한다. 수확한 원액의 일부는 원액검사에 사용하고 나머지는 -20°C 에 보존한다.

3.2.3. 항체농도조절

항체는 원액검사의 항체가 측정 시험결과에 의하여 8배 이상이 되도록 조절한다.

3.3. 원액검사

3.3.1. 무균검사

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

3.3.2. 항체가 측정시험

3.3.2.1. 재료 및 시험

Vero 세포, α -MEM, PBS, slide glass, acetone, anti-mouse IgG FITC conjugate (별도 상품이용) 및 mounting buffer(부기3)를 사용한다. 광견병 바이러스를 Vero 세포에 감염시킨 후 50%의 세포변성효과(CPE)가 보였을 때, 80% acetone(-20°C)으로 10분간 고정한 후 건조시킨다. 생산된 항체를 2배 단계 희석하여 고정된 세포에 100ul 분주한 후 30분간 반응시킨다. 이후 PBS로 3회 세척하고 2차 항체인 anti-mouse IgG FITC conjugate를 100ul 분주 후 30분간 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척한다. Mounting buffer(부기3)와 cover slide로 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.2.2. 판정

광견병 바이러스에 감염된 세포의 세포질에 특이 형광이 8배 이상에서 관찰되어야 하며 대조세포에서는 형광이 인정되어서는 아니된다.

3.3.3. 특이성 시험

3.3.3.1. 재료 및 시험

광견병 바이러스 감염배양세포의 cover slide 표본 또는 광견병바이러스 감염개의 대뇌 암몬각 조직절편표본과 대조로서 정상 배양세포 또는 건강한 개의 대뇌 암몬각 조직절편표본을 직접법에 의하여 시험품으로 37°C 에서 60분간 반응하고 형광 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.3.2. 판정

광견병 바이러스 특이항체 면역혈청으로 전처리한 표본에는 특이형광이 인정되지 않거나 또는 현저하게 약화되어야 하고 음성혈청으로 전처리하고

본표에서는 특이 형광이 인정되어야한다.

3.3.4. 목적외 항체 부정시험

개 디스토펜퍼, 개 전염성간염, 개 파보 및 개 코로나바이러스와 교차반응을 나타내지 않아야 한다.

3.3.5. 항원저지시험

3.3.5.1. 재료 및 시험

3.3.3.1의 재료 및 시험에 따라 제작된 감염재료에 중화 항체가 1,000배 이상의 광견병 항혈청 및 음성혈청을 전처리하고 세척 건조한 후 각각 시험품을 염색하여 형광현미경으로 관찰한다.

3.3.5.2. 판정

광견병 면역혈청을 전처리한 표본에서는 특이형광이 전혀 인정되지 않거나 또는 현저히 감약 되어야하고 음성혈청으로 전처리한 표본에서는 특이형광이 인정되며 염색성에 이상이 없어야 한다.

3.4. 최종원액

3.3.2 항체가 측정시험 결과에 의하여 8배 이상이 되도록 조절한다.

3.5. 분병과 용기

동물용 생물학적제제 총칙3에 따라 일정량을 멸균된 소분용기에 분주하여 봉전한다.

4. 검사방법

4.1. 특성시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따라 맑은 분홍빛의 액체로 이물이 나타내어서는 아니되며, 소분 용기별의 성상이 균일하여야 한다.

4.2. 무균시험

동물용 생물학적 제제 일반 시험법 IV-5에 의한 검사에 따른다.

4.3. 수소이온농도시험

동물용 생물학적제제 일반 시험법 IV-8에 의한 검사에 따른다.

4.4. 특이성시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

4.5. 항원저지시험

3.3.3에 의한 검사에 따른다.

2-4-2-01

4.6. 역가시험

3.3.2에 의한 검사에 따른다.

5. 저장법 및 유효기간

-20°C 이하 냉동고에 보존하여야 하며, 12개월간 유효하다.

6. 사용방법

6.1. 재료 및 시험

- 1) 광견병으로 의심되는 개 또는 소의 뇌조직을 동결절편한 후 slide glass위에 올린다.
- 2) 100% cold acetone(-20°C에 보관)으로 10분간 고정한다.
- 3) 1차 항체(특이 광견병 바이러스 단클론성항체)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 4) PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 5) 2차 항체(anti- mouse IgG FITC conjugate)를 올린 후 실온에서 30분간 반응시킨다.
- 6) Conjugate를 제거한 후 PBS로 1분씩 5회 세척한다.
- 7) Slide glass위에 mounting buffer를 올린 후 cover slide를 덮고 형광현미경으로 검사한다.

6.2. 판정

선명한 형광이 조직의 세포질 내에서 관찰이 되면 광견병 바이러스 감염으로 판정한다.

* 유의사항

형광항체 검사시 비특이적인 형광이 관찰될 수 있으니 주의하고 세포질 내 강한 형광이 관찰될 때 양성으로 판정한다.

<부 기>

부기1. 세포증식용 배지

D-MEM	430ml
HT(50X)	10ml
FBS	50ml
Antibiotic(100X)	5ml

부기2. 세포유지용 배지(cell freezing medium)

D-MEM	7ml
FBS	2ml
DMSO	1ml

부기3. Mounting buffer

Glycine	0.42g
Sodium hydroxide	0.2g
Sodium chloride	0.51g
Sodium azide	0.03g
Glycerine	70ml
D.W	30ml

여 백

IV. 동물용 생물학적제제 일반시험법

여 백

IV. 동물용 생물학적제제 일반시험법

IV-1. 특성시험법

IV-2. 진공도시험법

IV-3. 함습도시험법

IV-4. 순수시험법

IV-5. 무균시험법

IV-6. 세균시험법

IV-7. 방부제정량시험법

IV-8. 수소이온농도시험법

여 백

IV-1. 특성시험법

가. 시험

검사품 2개 이상에 대하여 색, 혼탁도, 침전물의 유무와 색채, 이물 또는 이취에 대하여 검사한다. 색, 혼탁도, 이물시험은 100룩스 광도하에서 실시한다. 현탁상태를 검사할 때는 소분된 용기마다 규정된 용해용 용액을 가하여 가볍게 흔들어서 용해도, 혼탁도, 색조를 검사한다.

나. 판정

검사품은 본래의 조성을 지녀야 하며, 그 이외의 색깔, 냄새, 혼입물이 없고 각 용기에 소분된 내용물의 성상이 균일하여야 한다. 건조제품은 용이하게 현탁되며 현탁도나 색조에 차이가 없어야 한다.

IV-2. 진공도시험법

가. 시험

암실에서 테스터코일을 검사품으로부터 5mm이내의 위치에 놓고 방전의 유무를 관찰한다.

나. 판정

검사품은 방전이 인정되어야 한다.

IV-3. 함습도시험법

이 시험법은 생물학적제제중 건조제제에 적용되는 시험법으로 감압 건조법이나 칼-피쉬 측정법중 한가지를 사용한다.

가. 검체

3개 이상의 검사품 내용을 신속히 분쇄하여 입자의 직경을 2mm이하로 하여 시험에 사용한다.

나. 함습도시험

1) 감압건조법

3개의 평량병에 적당량의 검체를 신속히 채취하고 아래의 조건으로 건조시켜 감소한 중량을 %로 표시하여 함습도로 한다. 단, 건조완료 후 건조공기를 통하여 상압으로 하고 평량병은 신속히 밀전하여 데시케이타 속에서 냉각시킨다.

① 건조조건

가) 온도 : 60℃

나) 기압 : 10mmHg

다) 시간 : 3시간

2) 칼- 피쉬법(Karl-Fischer method)

① 정의 및 원리

여러 종류의 제품중의 수분함량을 정량하는 방법으로 이산화황(SO₂)이 methyl alcohol과 반응하여 ester(아황산 methyl)을 생성하고 이때 생성된 ester는 염기에 의해 중화된다.

아황산 methyl 음이온은 칼-피쉬반응의 활성성분으로써 칼-피쉬 시약 중에 존재한다. 칼-피쉬 적정의 원리는 물이 존재하면 Iodine으로 인해 아황산 메틸 음이온이 산화되어 황산 메틸염으로 되면서 물이 제거되는 것이다.



(RN : 염기)

② 장치

자동뷰렛 1개, 적정플라스크(250ml), 교반기 및 정전압 전류적정 장치로 되어 있다. 칼-피쉬시약은 흡습성이 매우 강하므로 외부로부터의 흡습을 방지하여야 한다. 방습 재료로는 실리카겔을 쓴다.

③ 칼-피쉬시약

pH범위(5~7)를 적절히 조절할 수 있는 염기인 imidazole이나 diethanolamine을 포함하고 있는 hydranal composite 5 pyridine free시약을 사용한다. 이외에 hydranal-solvent와 hydranal-titrant, hydranal-coulomat A 와 coulomat C를 사용하여 적정할 수도 있다.

④ 조작법

가) 뷰렛에 칼-피쉬 시약(hydranal composite 5)을 넣는다.

나) 적정용기에 용제인 methanol을 넣는다.

다) 칼-피쉬시약으로 methanol내의 수분을 제거한다.

라) 시료를 가한다.

마) 칼-피쉬시약으로 시료내의 수분을 정량한다.

바) 칼-피쉬시약으로 hydranal composite 5외에 다른 시약을 쓸경우는 그 시약에 맞는 적당한 용제로 바꾸어 쓰면 된다.

다. 판정

검사품의 함습도는 감압건조법으로 검사시는 4% 이하이어야 하며, 칼-피쉬 측정법으로 검사시는 6% 이하이어야 한다. 단, 그 함습도는 시험한 성적 중 최고치로 한다.

IV-4. 순수시험법

가. 현미경검사

검사품마다 도말표본을 만들어 그람 및 일반 세균염색을 한다.

1) 직접도말법

염색시험은 따로 규정이 없는 한 다음 방법에 의하여 검체를 슬라이드 글라스에 도말 고정시킨 다음 염색하여 검경하는 방법이다.

2) 원심법

검체 약 10ml를 취하여 약 2000g에서 30분간 원심한다. 침전물을 취하여 슬라이드 글라스에 도말 건조하고 불꽃으로 고정시킨 다음 따로 규정이 없는 한 그람 염색법으로 염색하여 표본을 만들어 약 1000배로 확대하여 검경한다.

나. 배양검사

검사품마다 뉴트리언트아가 4개, 액체 디오그리코레이트 4개에 0.5ml 씩을 넣어 37℃와 22℃에 각각 2개씩 7일간 배양하며 검사품의 특성에 따라 적합한 배지를 이용하여 검사품의 순수여부를 확인한다.

다. 판정

현미경 및 배양검사에서 검사품에 함유된 생균 이외에 어떠한 세균도 인정되어서는 아니된다.

IV-5. 무균시험법

가. 검사품의 개봉

시험은 무균실에서 엄격한 무균 조작법에 의하여 실시한다.

검사품의 개봉시에는 내용이 오염되든가, 소독제가 내부에 침입하지 않도록 주의 하여야 한다.

나. 배지

배지는 뉴트리언트브로스(nutrient broth), 뉴트리언트아가(nutrient agar) 사면 및 액체 디오그리코레이트(thioglycholate)배지를 사용한다.

액체 디오그리코레이트(thioglycholate)배지의 상부에서 30%이상이 핑크색으로 변한 것은 사용하여서는 아니되며 가열하여 산소를 제거하였을 때에는 무방하다. 단, 무균시험에 필요하다고 인정될 때에는 마이코플라즈마 배지 등 각종 다른배지를 사용할 수 있다.

다. 배양재료

3개 이상의 검사품에 대하여 액상제제는 그대로, 건조제제는 첨부된 희석액으로, 첨부 희석액이 없는 건조제제는 규정량의 멸균 생리식염수로 용해한 후 다음 표와 같이 배양한다.

검사품 표시량	배양량	배지개수	배양내역
30ml이상	6ml	4개	2ml-2개 1ml-2개
30ml미만	3ml	4개	1ml-2개 0.5ml-2개

1개당 배지량은 nutrient agar는 10ml, nutrient broth는 10ml, 액체디오그리코레이트 배지는 10ml 이상으로 한다.

라. 배양

접종 후 충분히 혼합한 배양 시험관을 양분하여 37℃ 및 22℃에서 각각 7일간 배양관찰한다. 단, 세균의 발육이 의심될 때 또는 제체에 의하여 배지가 혼탁할 경우 등 필요하다고 인정될 때에는 새로운 배지에 이식하여 4일간 관찰할 수 있다.

마. 판정

시험의 결과 어떠한 세균의 발육도 인정되어서는 아니된다.

바. 재시험

시험의 결과 판정이 곤란할 때에는 시험을 반복한다.

IV-6. 세균시험법

가. 살모넬라 부정시험

이 시험은 닭질병 생백신에 대하여 적용한다.

1) 배지

세레나이트브로스(selenite broth)배지, 에스·에스·아가(SS agar) 및 디·에이취·엘(DHL)한천배지를 사용한다.

2) 배양재료

2개이상의 검사품에 대하여 액상제제는 그대로, 건조제제는 닭 피·피·엘·오(PPLO) 액체배지로 각각 용해하여 동량 혼합한 것을 배양재료로 한다.

3) 배양

20ml의 selenite broth에 배양재료 1ml를 접종하여 37℃에서 48시간 배양한다. 이 배양액의 0.1ml를 다시 SS agar 및 DHL한천 평판에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한다.

4) 판정

시험 결과 살모넬라속균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

나. 마이코플라스마 부정시험

1) 배지

닭 PPLO 액체 및 닭 PPLO 한천배지를 사용한다.

2) 배양재료

2개 이상의 검사품에 대하여 액상제제는 그대로, 건조제제는 닭 PPLO 액체 배지로 각각 용해하여 동량 혼합한 것을 배양재료로 한다.

3) 배양

20~50ml의 PPLO 액체배지에 배양재료 2ml를 접종하여 37℃에서 7일간 배양한다. 이 배양액의 1ml를 다시 10ml의 닭 PPLO 한천배지에 이식하여 37℃에서 7일간 배양한다. 이식을 다시 한번 반복한다. 이 최종 배양액 0.05ml를 닭 PPLO 한천배지에 이식하여 37℃에서 10일간 배양한다. 단, 배양액이 세균의 증식으로 변색하였을 때는 그 즉시 고형배지에 접종하여 집락의 성상을 조사한다.

4) 판정

시험의 결과 마이코플라스마의 집락이 인정되어서는 아니된다.

다. 생균수시험

1) 배지

표준 한천배지를 사용한다.

2) 배양재료

3개이상의 검사품에 대하여 액상제제는 그대로, 건조제제는 첨부된 희석액으로, 첨부된 희석액이 없는 건조제제는 규정량의 생리식염수로 각각 용해하여, 동량 혼합한 것을 배양재료로 한다.

3) 배양

검사품 각각을 4개의 페트리디시에 1ml씩 분주하고 60℃ 이하의 한천배지 15ml를 가하여 잘 혼합하고 2개는 37℃에서 48시간, 다른 2개는 22℃에서 96시간 각각 배양한 후 세균발육 유무를 조사한다.

4) 판정

시험결과 2개 이상의 검사품에서 세균의 발육이 인정되어서는 아니된다.

IV-7. 방부제정량시험법

이 시험은 동물용 생물학적제제에 방부제로서 함유되는 페놀, 포르말린 또는 치메로살 등을 정량할 때 적용된다.

가. 페놀의 정량

1) 시약

- ① 0.3% 파라니트로 아니린(p-nitroaniline)액
파라니트로 아니린($C_6H_6N_2O_2 = 138.12$, 특급시약) 1.5g을 염산(분석시약) 40ml에 용해시키고 증류수를 가하여 500ml로 한다.
- ② 50% 초산 나트륨(sodium acetate)액
무수 초산나트륨(CH_3CO_2Na , 분석시약) 50g을 증류수에 용해하여 100ml로 한다.
- ③ 10% 아질산 나트륨액(sodium nitrite)
아질산 나트륨($NaNO_2$, 분석시약) 10g을 증류수에 용해시켜 100ml로 한다.
- ④ 10% 탄산나트륨액(sodium carbonate)
무수 탄산나트륨(Na_2CO_3) 10g을 증류수에 용해시켜 100ml로 한다.
- ⑤ 5% TCA(trichloroacetic acid)액
삼염화초산(분석시약) 5g을 증류수에 용해시켜 100ml로 한다.
- ⑥ 페놀(phenol) 표준액
페놀(C_6H_6OH , 특급시약)을 증류하여 그 1g을 증류수에 용해시켜 1,000ml로 한다.

2) 시험

- ① 시험재료
2개이상의 검사품의 내용을 동량 혼합한 것을 검체로 한다.
- ② 검액의 조제
검사품 1ml에 증류수를 가하여 50ml로 하여 검액으로 한다. 검사품이 혈청일 때에는 증류수로 희석하여 이 희석액을 미리 5% TCA액에 10ml를 넣은 메스플라스크에 추가하고 증류수를 가하여 500ml로 한 다음 진탕하여 30분간 방치한 후 여과하여 그 여액을 검액으로 한다.
- ③ 시험조작

검액 1ml를 50ml의 메스플라스크에 취하고 증류수를 가하여 30ml로 하고 여기에 50% 초산나트륨액 1ml를 가한다(이하 "A"액이라 한다).
따로 0.3% 파라니트로 아니린액 25ml에 10% 아질산 나트륨 0.75ml를 가한다. 이액은 사용시 조제한다(이하 "B"액이라 한다). A액에 B액 1ml를 가하여 잘 혼합하고 1분간 방치한 후 10%탄산 나트륨액 2ml를 가하여 진탕하고 물을 가하여 50ml로 한다. 다시 이것을 진탕하고 10분간 방치한 후 파장 550nm에서 흡광도를 측정한다. 따로 0.1% 페놀 표준액을 사용하여 위와 같은 방법과 동일하게 조작하여 그 흡광도 또는 표준곡선으로부터 페놀의 함량을 산출한다.

3) 판정

시험결과 페놀의 함유량이 규정량을 초과해서는 아니된다.

나. 포르말린(formalin)의 정량

1) 비색법

① 시약

가) 섯프(Schiff)시약

잘 마쇄된 염기성 푸크신(basic fuchsin : 분석시약) 0.5g을 뜨거운 증류수에 용해하여 실온으로 방치한 다음 증류수를 가하여 300ml로 한다(이하 "a"액이라 한다). 별도로 무수 아황산나트륨(분석시약) 5g을 증류수에 용해시키고 증류수를 가하여 50ml로 한다(이하 "b"액이라 한다). b액에 a액을 소량씩 교반하면서 전량을 가하여 혼합한다. 이 혼합액에 염산(분석시약)5ml를 가하여 액이 연분홍색에서 담황색으로 변화하면 증류수를 가하여 500ml로 한 다음 착색병에 넣어 냉암소에 보존하여 1주일 후에 사용한다.

액의 색은 무색 투명하게 되나 담황색이 남아 있어도 사용할 수 있으며 연분홍색을 나타낼 때에는 소량의 황성탄으로 탈색한다.

나) 포름알데히드(formaldehyde)

파라포름알데히드(paraformaldehyde) 또는 포르말린(증류한 것)을 증류수로 희석하여 다음 표와 같은 표준용액계열을 만든다.

표준액0.2%(ml)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
정제수(ml)	9.5	9.0	8.0	7.0	6.0	5.0	4.0	3.0	2.0	1.0
포르말린농도(%)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10	0.12	0.14	0.16	0.18

② 시험

가) 시험재료

2개 이상의 검사품을 동량 혼합한 것을 검체로 한다.

나) 시험

검사품 또는 검사품을 적당히 희석한 것을 섯프시약 2ml를 가하고 이와 동일하게 포르말린 표준액에도 가하여 실온에서 30분간 방치한 후 1시간 이내에 파장 520nm에서 흡광도를 측정하여 함량을 산출한다.

2) 아세칠 아세톤법

① 시약

가) 포름알데히드 표준용액

헥사민(특급시약) 311.2mg을 증류수에 녹여 1,000ml로 하여 표준 원액으로 한다. 이 액은 포름알데히드 400 μ g/ml을 함유한다. 이 액을 다시 증류수로 희석하여 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 μ g/ml.....되게 용액을 만들어 표준용액계열로 한다.

나) 아세칠 아세톤 용액

초산 암모늄 150g을 물에 녹여, 초산 3ml 및 아세칠 아세톤 2ml를 가하여 다시 증류수를 가하여 1,000ml로 한다. 단, 사용시 조제한다.

② 시험

검사품을 포름알데히드로서 100-500 μ g에 해당되는 양을 정밀히 달아 수증기 증류 장치의 플라스크에 넣고 수증기 증류한다. 단, 수기에는 미리 증류수 5~10ml를 넣어 냉각기의 하단이 증류수에 잠기도록 한다.

유액이 200ml 가까이 되면 증류를 멈추고 증류수를 가하여 정확히 200ml로 하여 검액으로 한다. 검액 5ml를 공전시험관에 취하여, 아세칠 아세톤 용액 5ml를 가하여 흔들어 섞은 후 끓는 수욕중에서 10분간 가운 후 냉

각하여 측정과장 425nm에서 흡광도를 측정한다. 동시에 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 μ g/ml.....포름알데히드 표준용액 각각 5ml에 대하여 동일하게 조작하여 표준곡선을 만들어 비색 정량한다. 단, 검액과 가까운 표준용액의 흡광도만으로 정량할 수 있다.

③ 판정

시험결과 포르말린의 함유량이 규정량을 초과해서는 아니된다.

다. 치메로살(thimerosal)의 정량

1) 디지존법

① 시험재료

2개 이상의 검사품을 동량 혼합한 것을 검체로 한다.

② 시험

아래 <별첨>과 같이 시험을 행한다.

검체, 치메로살 표준용액 및 증류수를 동일하게 조작하여 검사, 표준 및 대조측정액을 조제한다. 검사 측정액과 표준 측정액을 취하여 대조 측정액을 대조로하여 10mm의 비색관으로 490nm에서의 흡광도 E_a 및 E_b 를 측정하며 치메로살의 함량은 아래 식으로 산출한다.

치메로살의 량(mg) = 표준품의 량(mg) x E_a/E_b

③ 판정

시험 결과 치메로살의 함유량은 규정량을 초과해서는 아니된다.

<별첨>

제제중에 함유된 수은의 량을 측정하는 방법으로, 이 시험은 수은이 없는 시약을 사용하며, 초자기구는 희석한 따뜻한 질산으로 잘 씻고 다시 증류수로 깨끗이 세척하여 사용한다.

가) 시약

- (1)황산
- (2)발연질산
- (3)세렌(분말)
- (4)붉은황산

- (5)과망간산칼륨용액
- (6)10% 염산히드록실아민
- (7)디지존·클로로포름용액
- (8)0.25N 황산
- (9)40% 브롬화칼륨용액
- (10)완충액 : 인산제 2나트륨(무수) 150g 및 탄산나트륨(무수) 35g을 증류수에 용해하여 1,000ml로 한다.

나) 장치

- (1)분해플라스크 300ml
- (2)공기냉각기(내경 1cm, 길이 40cm)
- (3)환류냉각기(냉각부의 길이 30cm)

다) 시험

(1) 전처리

검체의 용량을 정확히 계량하여 분해플라스크에 넣어 황산 10ml 및 세렌 0.1g을 가하여 공기냉각관 및 그 상단에 환류냉각관을 연결하고 약하게 가열하면서 발열질산을 주의하여 적하한다.

분해가 진행됨에 따라 서서히 가열을 강하게 하고 분해액이 무색투명하게 되면 가열을 중지한다. 냉각 후 분해액을 비이커에 옮겨 냉각관 및 분해 플라스크의 내벽을 50℃로 가온한 0.25N 황산 10ml씩 2회 세척하고 다시 증류수 20ml씩 2회 세척하여 양세척액을 분해액에 가한다. 여기에 요소 0.2g을 가하여 수욕상에서 30분간 가온한 후 과망간산칼륨 용액을 분홍색이 될 때까지 가한다. 냉각 후 10% 염산히드록실아민 용액을 가하여 탈색시킨 다음 증류수를 가하여 정확히 200ml로 하여 이것을 검액으로 한다.

(2) 측정용액의 조제

검액 20ml을 정확히 계량하여 제1분액 깔대기에 넣고 디지존클로로포름 용액 10ml를 가하고 강하게 진탕 혼합하여 방치하고 클로로포름층을 취한다.

위 조작을 반복하여 전 클로로포름층을 합하여 0.25N 황산 20ml를 미리 넣어둔 제2분액 깔대기에 옮겨 1분간 강하게 진탕 혼합하여 방치한 후 클로로포름층을 취한다. 이 클로로포름층을 0.25N 황산 20ml를 미리 넣은 제3분액 여두에 옮기고 40% 브롬화 칼륨용액 10ml를 가하여 1분간 강하게 진탕 혼합한 후 물층을

취한다. 이 물층을 클로로포름 10ml로 세척하고, 클로로포름세척액을 제거한다. 이어 물층에 완층액 10ml를 가하여 pH6.0으로 조정 한 후 디지존클로로포름 용액 10ml를 가하여 1분간 강하게 진탕 혼합한 후 방치하고 클로로포름층을 취하여 시료추정 용액으로 한다.

2) ICP 발광분광분석법

① 시험재료

2개 이상의 검사품을 동량 혼합한 것을 검체로 한다.

② 시험

제제중에 함유된 수은의 량을 측정하는 방법으로 이 시험은 동물약품 공정서(제 1개정)의 일반시험법중 ICP 발광분석법에 따라 시험하며 치메로살의 함량은 아래 식으로 산출한다.

$$\text{치메로살의 량(mg)} = \text{Hg의 량(mg)} \times 2.0182$$

③ 판정

시험결과 치메로살의 함유량은 규정량을 초과해서는 아니된다.

라. 톨루엔의 정량

1) 시험재료

2개 이상의 검사품을 동량 혼합한 것을 검사품으로 한다.

2) 시험

검사품을 강하게 진탕 혼합하여 메스 플라스크에 100ml를 분주하고 30~60분간 방치하여 중층이 형성되기를 기다린다. 완전히 중층이 형성되면 그 상층액의 용량을 %로 표시하다.

3) 판정

시험결과 톨루엔의 함유량은 규정량을 초과해서는 아니된다.

IV-8. 수소이온농도시험법

수소이온농도측정은 전자전극장치를 이용한 pH측정기를 사용한다.
수소이온농도측정은 대한약전에 따라 시험한다.

V. 부 록

여 백

V. 부록

부록1. 동물용 생물학적제제 분류번호

부록2. 동물용 생물학적제제 제품명칭

부록3. 시약, 시액, 완충액 및 배지

여 백

부록1. 동물용 생물학적제제의 분류번호

1. 동물용 생물학적제제의 분류번호는 생물학적제제의 종류, 축종, 성분 및 일련번호순으로 4단계로 분류하였음
2. 종류는 백신, 진단제제, 혈청류 및 기타로 분류하였음
3. 축종은 소, 돼지, 닭, 개, 말, 토끼, 오리 및 기타동물로 분류하였음
4. 성분은 기본적으로 원인체별 세균, 바이러스, 기생충, 복합(세균, 바이러스), 기타로 분류하였음
5. 일련번호는 종류, 축종 및 성분을 기준으로 하여 차례로 번호를 부여하였음
6. 분류번호는 총 4단위로 하였으며 구체적인 내용은 <별표1>과 같음

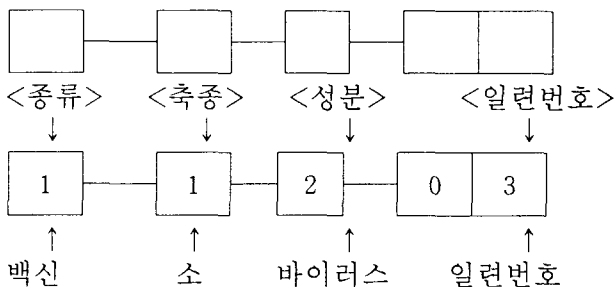
<별표 1>

⊙ 동물용 생물학적제제의 분류기준표

(4단위)

종류별 (첫째숫자)	축종별 (둘째 숫자)	성분별(원인체) (셋째 숫자)	일련번호 (4-5째 숫자)
1←백신 2←진단제제 3←혈청류 4←기타 : :	1←소 2←돼지 3←닭 4←개 5←말 6←토끼 7←오리 8←기타	1←세균 2←바이러스 3←기생충 4←세균,바이러스 (복합) 5←기타 : :	구분, 축종, 성분이 동일한 제제에 일련번호를 부여하였음

예) 소 유행열 생백신의 분류번호

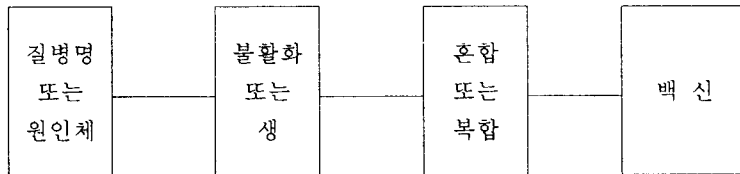


부록2. 동물용 생물학적제제의 명칭 작성요령

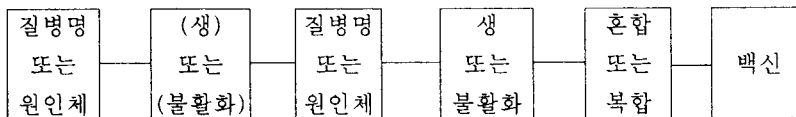
1. 동물용 생물학적제제의 명칭 작성시 순서는 세균, 바이러스, 기생충, 기타 순으로 질병명을 기록한다.
2. 백신에 사용되는 이름은 질병명을 기록함을 원칙으로 하되 “000증”인 질병은 대상원인체명을 기록한다.
 예) 돼지 파보바이러스감염증 생백신 ->돼지 파보바이러스 생백신
 뉴켓슬병 바이러스 생백신 ->뉴켓슬병 생백신
 돼지 장내바이러스(엔테로 바이러스)불활화 백신 -> 돼지 엔테로 바이러스 불활화백신
3. 혼합백신은 성분이 같은 종류 즉, 세균+세균, 바이러스+바이러스, 기생충+기생충을 사용한 제제이며 복합백신은 성분이 서로다른 종류 즉, 세균+바이러스, 세균+세균+바이러스 등을 사용한 제제를 말한다.
4. 백신의 작명순서는 아래 1)와 같은 순으로 하며, 불활화제품과 생제품이 혼합되어 있을 경우는 아래 2)와 같이 한다.

-아 래-

1)



2)



5. 소질병 백신의 표기는 아래와 같이 한다.

탄저, 기종저, 소대장균, 우역, 소 전염성비기관염, 소 바이러스성설사병,
소 파라인플루엔자 바이러스, 소 합포체성폐렴, 소 코로나바이러스,
소 로타바이러스, 아끼바네병, 소 유행열 등.

6. 돼지질병 백신의 표기는 아래와 같이 한다.

돼지 위축성비염, 돼지 파스튜렐라페렴, 돼지 흉막폐렴, 돼지 인플루엔자, 돼지
단독, 돼지 대장균, 돼지 클로스트리디움, 돼지 렙토스피라, 돼지 살모넬라, 돼지 콜레라,
돼지 일본뇌염, 돼지 전염성위장염, 돼지 파보바이러스, 돼지 로타바이러스,
돼지 오제스키병, 돼지 뇌심근염, 돼지 유행성설사 등.

7. 닭질병 백신의 표기는 아래와 같이 한다.

닭 마이코플라스마병, 가금티푸스, 뉴캐슬병, 닭 전염성 기관지염, 닭 전염성 후두기관
염, 산란저하증, 전염성F낭병, 마λεκ병, 계두 등.

8. 개질병 백신의 표기는 아래와 같이 한다.

개 전염성간염, 개 파보바이러스, 개 코로나바이러스, 개 파라인플루엔자, 개 디스토펜퍼,
개 렙토스피라 등.

9. 토끼 및 오리질병 백신의 표기는 아래와 같이 한다.

토끼 바이러스성출혈열
오리 바이러스성간염

부록3. 시약, 시액, 완충액 및 배지

1. 시약, 시액, 완충액 및 배지 등은 동물용 생물학적제제 기준에 규정된 시험에 사용하는 것으로 사용목적에 적당한 공식 상품화된 완제품 또는 처방에 의거 제조된 규격품을 사용하여야 한다.
2. 수소이온농도(pH)는 멸균한 다음에 규정한 값을 나타내도록 하여야 한다.
3. 단순히 “고압멸균한다”라고 기재한 것은 통상 121℃에서 15분간 증기멸균하여야 한다.
4. 배지는 통상 조제한 다음 목적하는 균이 증식 하는가를 시험하여야 한다.
5. “평판 또는 시험관사면에 균힌다”는 고형배지를 가온 용해하여 적당한 온도로 냉각한 다음 통상 직경 9cm의 페트리디쉬에 약 20ml씩을 균혀 평판배지로 만들거나 6부 또는 4부 시험관에 적당량씩 분주하여 사면배지로 균혀 만드는 것을 말한다.
6. 각종 시약, 완충액 및 배지의 조제는 상품의 처방에 따라 사용한다.
7. 배지의 성능시험에 사용하는 균주는 국립수의과학검역원이나 기타 공인된 기관에서 인정한 균주를 사용하여야 한다.

동물용 생물학적제제 기준(안)

- 기획, 집필, 편집 총괄

책임연구원 수의학 박사 김재학

분야별 집필 및 발간에 참여한 사람

· 생물학적제제 총칙, 통칙 및 일반시험법	김병한 우용구 조인수 안동준	소병재 이경기
· 새균성제제	이희수 이지연 문진산 김종환	허정안 문병열 윤상삼
· 바이러스성제제	권창희 송재영 탁동섭 최강석 윤소라	박종현 양동진 최은희 김성희
· 기생충성제제	강승원 정우석 박연주	이향심
· 가금용제제	성환우 장환미 조영미	이영주 한명국

2004년 12월 일 인쇄
2004년 12월 일 발행
발행처 농림부 국립수의과학검역원
인쇄처 건양인쇄사(031-466-8735)
※ 불 법 복 제 를 금 합 니 다 ※
