

양계용 백신의 제조와 사용

허 원
(대성미생물연구소)
생산부장, 수의사

양계분야에서도 백신의 인식이 날로 높아져 가고 있다. 그러나 아직까지 백신이 어떻게 제조되고 그 효능이 무엇인지 정확히 아는 사람은 많지 않다. 이에 백신의 올바른 사용법 및 제조방법을 소개한다.

I. 서 론

양계 용 백신에 대한 인식이 많이 높아졌지만 아직도 백신이 어떤 것인지 정확히 모르는 사람이 많기 때문에 백신의 인식을 더욱 높이고 백신사용의 효율을 극대화시키기 위하여 백신제조방법을 소개하고자 한다.

백신제조라고 하면 백신 그 자체 즉 병속에 들어있는 내용물의 제조공정만을 생각하고 있으나, 백신은 실수요자가 사용하고 그 효과를 볼 때까지를 백신의 제조라고 생각하여야 한다. 백신제조담당자들도 백신을 만드는 제조공정, 다시말하면 백신용기에 내용물을 담아 오래 보존할 수 있는 상태만을 백신제조로 인식하고 있으나 백신제조담당자의 백신제조 개념도 백신재료의 구입, 백신제조공정, 백신의 자가검정, 백신의 국가검정, 백신의 포장 및 보관까지 생각하여야 한다. 그러므로 백신제조회사는 백신의 수송, 거래선의 백신보관 및 백신취급점점, 실수요자의 백신사용법 교육까지를 제조에 포함시켜야 한다. 실수요자의 백신제조개념은 백신거래선 선정, 구입후 보관, 사용법의 숙

지, 면역형성시까지 감수성동물 격리, 질병예방을 자기가 맡은 백신제조 담당분야라고 생각하여야 한다.

이와같이 백신제조 개념은 굉장히 넓고 백신의 종류별 특성이 달라 필자는 양계용백신을 사독백신, 생독백신 및 조직배양백신으로 나누고 그 대표적인 뉴캐슬병 사독백신, ILT 백신, 마력병백신에 대한 제조공정 및 자가시험만을 소개하고자 한다.

II. 본 론

1. 사독백신

사독 백신이란 바이러스의 형태에 어떤 흠을 가지지 않고 죽여서 수산화알미늄겔 또는 광유를 첨가하여 백신으로서의 효력을 오래 지속할 수 있도록 만든 것을 말한다. 수산화알미늄겔에 흡착시킨 백신에는 뉴캐슬병 사독백신이 있으며, 광유로 제조된 백신은 수입 EDS 백신을 예로 들 수 있다.

1) 뉴켓슬병 사독백신의 제조

입란 및 부화

① 백색종란을 부화기에 입란시키고 부화기의 온도가 30℃일 때 포르말린과 과망간산칼리로 혼연소독한다.

② 부화기의 온도를 100° F, 습도 60%로 맞추어 놓고 4 시간마다 회전시키면서 10 일간 발육시킨다.

접종 및 배양

① 10 일령의 발육란을 부화기내에서 꺼내어 바이러스를 접종할 부위와 기실(氣室) 정상부를 표시한다.

② 선정된 2 개의 부위를 강 옥도로 소독하여 무균실로 옮긴다.

③ 선정된 2 개의 부위에 23G 주사침이 통과할 수 있을 정도의 작은 구멍을 뚫는다.

④ 접종부위 즉 혈관을 피하여 표시된 곳을 통하여 2 ml 자동주사기로 종독을 0.2ml 씩 접종한다.

⑤ 접종된 종란은 접종부위를 먼저 파라핀으로 봉하고 기실부분도 봉한다.

⑥ 파라핀으로 완전히 봉해졌는가를 확인한 후 다시 부화기에 넣고 바이러스를 증식시킨다.

⑦ 종독접종 24 시간후 발육란을 꺼내어 검란등으로 죽은 계란을 제거한다. 살아있는 발육난은 부화기에 다시 넣고 72 시간 배양을 한다.

⑧ 종독접종 96 시간후 검란하여 살아있는 발육난만 0℃ 냉장실에서 12 시간 냉각을 한다.

배양액 채취

① 냉각된 발육란을 예비무균실에서 옥도정기 또는 석탄산수로 소독을 한후 본무균실로 넣어준다.

② 소독된 발육란의 기실부 난각을 기실이 있는 곳까지 제거한다.

③ 기실이 제거된 종란의 양막강액 및 장노막강액을 흡입기로 혈액 및 난황이 혼입되지 않

도록 무균적으로 채취한다.

불활화

① 무균적으로 채취된 배양액에 포르말린을 0.2%가 되도록 첨가하고 37℃ 항온실에서 12 시간 불활화한다.

② 불활화가 완료된 배양액은 바이러스함유량 및 무균시험을 한후 5℃ 냉장실에 보관한다.

수산화 알미늄겔 흡착

① 무균이고 바이러스량이 적당한 배양액을 분병무균실에서 70 만ml의 분주탱크에 전체량의 20%가 되도록 동량으로 여과하여 넣는다.

② 수산화알미늄겔과 식염수를 전체량의 80%가 되도록 가한다.

③ 분주탱크내에서 교반하여 바이러스를 수산화알미늄겔에 흡착시킨다.

분 병

① 분주탱크에서 재료를 계속 교반하면서 100 ml 또는 500ml 백신병에 규정량을 소분한다.

② 소분된 용기는 멸균고무전으로 막아 포장실로 옮겨 알미늄겔으로 캡핑한 후 5℃에 보관한다.

자가시험

① 무균시험 ; 혐기성세균배지 및 호기성 세균배지에 백신을 1 ml씩 접종하고 37℃ 항온실에서 7 일간 배양한다. 이때 모든 배지에서 어떠한 세균의 증식도 있어서는 안된다.

② 안전시험 ; SPF 종란을 부화시켜, 14 일령 10수의 초생추에 백신을 1 ml씩 접종하고 14 일간 관찰한다. 이때 어떠한 임상증상도 인정되어서는 안된다.

③ 효력시험 ; 안전시험이 끝난 접종계군과 대조군의 시험계에서 채혈하여 혈구응집억제반응으로 항체가를 측정한다. 이때 접종계군은 100%양성이어야 하고 대조군은 100% 음성이어야

한다.

국가검정

자가시험에 통과된 백신은 시험완료일을 제조일로 하여 라벨을 부착시키고 국가검정을 의뢰한다.

2. 생독백신

생독백신이란 바이러스를 순화시켜 병원성은 없고 면역원성은 갖게 만든 약독주를 SPF (특정 전염성질병이 없는 종란)종란에 접종하고 바이러스를 증식시켜 만든 백신을 말한다. 뉴캐슬병 생독백신(B₁, Lasota), 계두백신, ILT백신, AE백신, 감보로생독백신 등이 생독백신이다. 뉴캐슬병 생독백신은 뉴캐슬병 사독백신과 같이 배양하여 불활화를 하지않고 탈지분유 또는 SPGG보호제를 첨가하여 동결건조하는 것이 다를 뿐이다. 계두백신과 ILT백신은 종독을 장노막상에 접종하여 장노막만을 채취하여 제조하고, AE백신은 발육란의 뇌를 사용하고, 감보로 생독백신은 감염태아를 사용한다는 것이 특징적인 차이점이라고 할 수 있다. 즉SPF 종란에 종독을 접종하고 바이러스가 가장 많이 함유된 부분(접종일령 및 배양기간은 다르지만)을 채취하여 보호제를 가하여 동결건조한 것이 대부분의 생독백신이다.

1) ILT 백신의 제조

입란 및 부화

뉴캐슬병 사독백신과 같이 입란 부화시킨다.

접종 및 배양

① 10 일령의 SPF 종란을 부화기에서 꺼내어 바이러스를 접종할 위치와 기공을 표시한다. 이때 접종부위선정은 혈관이 없고 계란의 최대적경부위를 택한다.

② 선정된 2 개의 부위를 강옥도정기로 소독한 후 접종무균실에서 기실부분은 난각과 난막이 완전히 찢리도록, 접종부위는 난각과 난막만 찢

리고 장노막은 찢리지 않게 작은 구멍을 뚫는다.

③ 기실부분에 흡입기 호수를 대고 음압으로 적당히 흡입해 접종부위에 장노막으로 형성된 인공기실을 만든다.

④ 인공기실에 종독을 자동주사기로 0.2ml 씩 접종하고 파라핀으로 기실부분을 먼저 봉한 후 접종부위도 봉한다.

⑤ 누워있는 상태에서 입란시키고 회전을 하지않고 배양한 후 24 시간후에 접종사검란을 하고 다시 배양한다.

⑥ 접종 4 일후 살아있는 발육란만을 꺼내어 바이러스를 채득한다.

채 득

① 채득란을 예비무균실에서 강옥도정기로 소독한 후 채득무균실로 옮긴다.

② 소독된 발육란의 난백저류부분을 핀센트로 깨고 난백, 난황, 태아를 제거한 후 바이러스 증식이 확인되는 장노막만을 무균적으로 채취한다.

③ 채취된 장노막은 채득단위별로 무균시험을 실시한 후 -80℃ 냉장고에 보관한다.

유 제

① 무균인 백신재료가 1 lot (1,000 수분 7,000 병)가 되었을 때 냉장고에서 재료를 꺼내어 빠른 속도로 녹인다.

② 백신재료 무게를 측정하여 SPGG 보호제로 50%가 되도록 첨가하여 마쇄 유제를 한다.

③ 유제된 백신재료를 5 만ml의 분주탱크에 동망으로 여과하여 넣고 항생제를 첨가 혼합한다.

분 병

① 유제혼합된 백신재료를 계속 혼합하면서 자동분주기로 10ml 진공병에 4 ml 씩 소분하고 진공고무선을 얹어 놓는다.

동결건조

① 소분된 백신을 동결건조기에서 동결시키고 재료온도가 -40°C 가 되었을 때 진공펌프와 얼음흡착판을 가동시킨 후 백신을 얼어놓은 판온을 20°C 로 상승시킨다.

② 재료온도가 10°C 가 되었을 때 판온을 다시 30°C 로 올려 완전 건조시킨다.

③ 동결건조 48 시간이면 재료중의 수분은 얼음흡착판에 옮겨지고 재료는 4% 이하의 함유도를 유지한다. 이때 진공상태에서 고무전을 막고 공기를 넣어 백신을 꺼낸다.

④ 동결건조가 끝난 백신은 알미늄캡으로 씌워 5°C 에 보관하면서 자가시험을 실시한다.

자가시험

① 진공도시험 ; 동결건조가 완료된 백신은 진공검사기로 비진공된 것을 제거한다.

② 함유도 시험 ; 백신내용물을 일정량 채취하여 무게를 전기천평으로 0.01mg 까지 측정하고 60°C 의 진공건조기에서 3시간 건조한후 건조감량을 측정하여 백분율로 표시한다. 이때 함유도는 4%이하이어야 한다.

③ 세균시험 ; 백신을 회석액으로 용해하여 YCC배지 및 PPLO배지에 접종하여 살모넬라균과 마이코플라스마균의 혼입여부를 검사하고, 표준한천배지에 비병원성세균의 집락을 계산한다. 이때 살모넬라나 마이코플라스마가 인접되어서는 안되며, 비병원성세균집락은 1ml당 100개 이하이어야 한다.

④ 바이러스 함유량시험 ; 백신을 야외량으로 용해하여 10배부터 일만배까지 회석하여 10일령의 SPF 발육란 장노막상에 각 회석단계별로 0.2ml씩 접종하고 계란감염가(EID₅₀)를 산출한다. 이때 EID₅₀은 1수분당 $\log 10^{2.5}$ 이상이어야 한다.

⑤ 안전시험 ; SPF 종란을 부화시켜 14일령에 ILT 백신을 접종하고 14일간 관찰한다. 이때 접종반응이 접종 5일부터 시작하여 10일까지

지 나타나다가 소실되며 폐사는 없어야 한다.

국가검정

자가시험에서 통과된 백신은 시험완료일을 제조일로 하여 라벨을 부착시키고 국가검정을 신청한다.

3 조직배양 백신

백신중에 조직배양을 이용하여 제조되는 것은 여러가지가 있겠으나 조직배양에 이용되는 동물의 종류 및 부위, 접종방법, 배양온도 및 방법, 채득방법에 약간의 차이는 있으나 대동소이하다고 할 수 있기 때문에 여기에서는 마력병백신을 예로 들고자 한다.

1) 마력병백신의 제조

세포제조

① 10일령의 SPF 발육란의 태아를 무균적으로 채취하여 머리, 날개, 다리, 내장을 제거한 후 조직이 1mm^3 이 되도록 세절하여 인산완충 식염수로 혈구 및 점액성 물질을 3회 세척한다.

② 단백질 분해효소제인 트립신으로 37°C 에서 15분간씩 3회 소화하여 세포를 분산시킨다

③ 소화된 세포부유액에 동량의 성장배지(10%소혈청첨가조직 배양배지)를 첨가하여 원심분리기에서 $1,500\text{rpm}$ 에 3회 원심 침전시켜 트립신을 제거한다.

④ 트립신을 제거한 세포를 성장배지에 부유시켜 120號 동망으로 여과하여 세포부유액을 만든후 혈구제산판으로 세포수를 계산한다.

조직배양

① 세포를 배양용 성장배지에 ml당300만개가 되도록 부유시키고 둥근 조직배양병에 200ml씩 소분하고 마개를 막는다.

② 37°C 항온실에서 회전하면서 배양시킨다.

바이러스접종 및 배양

① 회전배양 2일후 세포가 유리병면에 완전히 자랐을 때 성장배지를 제거하고 증독이 포함된 유지배지로 교체한 후 37℃에서 계속 회전배양한다.

② 증독접종후 3~4일이면 마렉바이러스에 의한 세포편성(CPE)이 나타나고 세포변성이 80%이상 되었을 때 바이러스배양을 완료시킨다.

바이러스 채득

① 배양완료와 동시에 배양액을 제거하고 세포분리액(트립신+버신+PBS)을 병당 50ml씩 가하고 항온실에서 10분간 소화시킨다.

② 세포가 유리병면에서 분리되면 성장배지와 동량혼합하여 원심분리기로 3회 세척하여 트립신을 제거한다.

③ 세척된 마렉감염세포를 성장배지에 ml 당 2,000 만개가 되도록 부유시킨후 DMSO(동결보호제)를 7~10% 가한다.

소분 및 동결

① DMSO 첨가 세포부유액을 자동분주기로 2ml 앰플에 2ml씩 소분하고 봉한다.

② 앰플에 제품명, 제조번호 등을 기입한후 -80℃ 냉장고에서 동결시킨다.

③ 동결 2시간후 백신을 -196℃의 액체질소통으로 옮겨 보관하면서 자가시험을 실시한다.

자가시험

① 마이코플라스마 부정시험 ; PPLO 배지에 백신을 접종하고 마이코플라스마 증식여부를 관찰한다. 이때 마이코플라스마가 인정되어서는 안된다.

② 무균시험 ; 혐기성 세균배지와 호기성 세균배지에 백신을 접종하였을 때 어떠한 세균의 증식도 인정되어서는 안된다.

③ 바이러스 함유량시험 ; 제조에 사용되었

던 세포와 같이 계태아 섬유아세포(CEF)를 만들어 5cm 짜리에 조직을 배양하고 배양 2일후 성장배지를 제거하고 유지배지로 교체한 후 백신을 야외량과 10배 희석한 재료를 0.2ml씩 접종하고 4일후 마렉바이러스에 의한 세포변성수를 계산하며 그 숫자는 1수당 1,500PFU 이상이어야 한다.

④ 미입바이러스 부정시험 ; 10일령의 SPF 종란에 10수분을 접종하고 7일후 개란하여 태아 및 장노막의 이상 유무와 장노막장액의 혈구응집성 바이러스 유무를 관찰하며, 이때 어떤 현상도 인정되어서는 안된다.

⑤ 안전시험 ; SPF 종란을 부화시켜 1일령 후에 백신을 야외량과 10수분을 각각 5수씩 접종하고 대조후 5수와 함께 21일간 사육하면서 관찰한다. 이때 어떠한 임상증상도 인정되어서는 안된다.

⑥ 역가시험 ; 안전시험에 사용된 야외량 접종계균과 대조균을 관찰 종료시에 채혈하여 젤침강반응(AGP)을 실시하여 항체 유무를 검사한다. 이때 접종계균은 50%이상 항체를 인정할 수 있어야 하며 대조균은 100%항체음성임을 확인하여야 한다.

국가검정

자가시험에 통과된 백신은 자가시험 완료일을 제조일로 하여 국가검정을 신청한다.

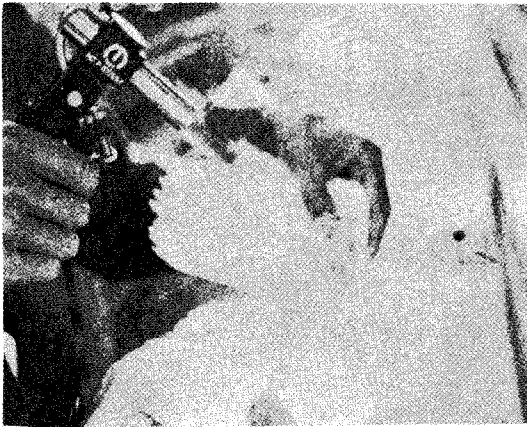
Ⅲ. 결 론

백신의 제조방법 및 자가시험 방법은 각 실험실별로 시설, 인원, 재료가 다르기 때문에 그 방법 및 순서도 조금씩 다른 방법을 사용하고 있다. 궁극적으로 제조된 백신이 효력이 높게 만들고, 백신으로서 가치가 충분히 있는가를 검사하는 것이란데 방법의 요점을 두는 것이다.

자가시험에 통과된 백신은 다시 국가검정에

서 더욱 세밀하고 완전하게 검사를 받는다. 결국 국가검정에 합격하여야만 백신으로서의 가치를 부여받게 된다 할 수 있다.

그러나 서론에서 언급했던 것과 같이 백신이라는 약은 생물학제제이기 때문에 사용되어 효력이 발생될 때까지 조심하지 않으면 백신으로서의 가치를 완전히 상실할 가능성이 있다. 이와같은 문제점때문에 82년도에는 돈콜레라백신, 83년도에는 AE백신, 84년도 현재는 ILT백신이 불신의 대상이 되고 있다.



1. 수송 및 취급상의 주의

ILT백신 등 동결건조된 백신은 생독백신이 기 때문에 제조회사의 5℃냉실을 떠나면서부터 효력에 영향을 줄 수 있는 여건이 시시각각으로 주어지고 있다. 즉 보관에 있어서는 실수요자가 백신접종을 완료할 때까지 5℃ 상태를 유지하는 것이 최상이라고 할 수 있다. 다행인지 불행인지 우리나라에서는 수송 및 보관의 숙지미비를 감안하여 유효기간을 제조일로 부터 10개월간을 인정하고 있어 유효기간이 2년인 외제백신보다 바이러스의 존재유무인 보관에 유리한 점이 있다. 그러나 국산이나 외제나 효력면에서 같은 백신이며 유효기간이 길다고 방심하면 실수의 가능성이 높아진다. 즉 약이 좋으나빠서 유효기간이 길고 짧은 것이 아니다. 백

신취급인식도가 낮기때문에 국가에서 정해줄 뿐이다.

보관에 특히 주의하여야할 백신은 마력병백신이다. 질소통의 질소가 2/3 이상 충전되지 않거나, 외부로 5초이상 꺼냈다가 다시 넣거나 녹일 때 즉시 녹이지 않거나 녹인 후에도 오래 보관한 후 접종하거나 하면 마력병백신의 효력은 거의 완전히 없어진다.

2. 부작용

생독백신중에 ILT백신, AE백신은 백신 본래의 특성 즉 접종반응을 아주 적게하면 바이러스가 많아도 면역이 안되는 여건때문에 AE백신은 종란에서 ILT백신은 성계에서도 접종반응이 나타난다.

이때 축체자체에 기생충, 호흡기성세균, 바이러스 등이 존재할 때 ILT백신을 접종하면 접종반응이 아니라 부작용과 같이 50%까지도 폐사를 일으키는 경우가 있다. 이때는 대부분 ILT 특유의 임상증상을 나타내 모두 ILT로 판정하기 쉬우나, 그러한 현상이 일어나는 것을 검사해본 결과 일반세균만 분리되고 ILT 바이러스는 분리되지 않는 경우, 습성계두바이러스만 분리되고 ILT 바이러스는 분리되지 않는 경우가 현재까지 경험으로는 대부분이다. 즉 병증이 나타나지 않던 CRD와 습성계두가 ILT백신접종으로 인하여 성대를 폐쇄시켜 질식시킴과 동시에 눈이 멀게 하여 폐사시키는 것이다. 이러한 현상을 백신의 부작용 또는 ILT발생으로 오인하는 경우가 많이 있다. 이러한 경우 진짜 야외 ILT병이 침입해도 폐사율을 50% 이상으로 나타내게 한다. 즉 어떤 양계장은 ILT가 발생해도 10%미만으로 내과하지만 어떤 양계장은 20%, 30%, 40%, 50%의 발생뿐이 아닌 폐사를 동반하고 있는 것이다. 때문에 국내에 ILT가 발생하고 있는한 지금까지의 사양관리보다 더욱 세심한 사양관리가 있어야만 양계가 존속될 수 있다고 본다.

3. 방 역

ILT의 경우 방역의 중요성은 더욱 실감케 한다. 초생주의 일령별로 면역효과가 다르고 품종별로도 달라 2주령에 ILT백신을 접종하고 5~7주령에 2차접종을 하여야만 거의 완전한 백신효력을 볼 수 있다. 이는 2차접종 2주후 즉 9주령까지 ILT에 노출되지 않도록 병아리를 사육해야 한다는 말이다. 어떤 면에서는 SPF계사의 개념을 도입하여야만 안심하고 양계를 할 수 있다.

백신의 임무가 바로 여기에 있는 것이다. 백신이 없다면 외부에 노출되어서는 안되는 일령이 평생으로 되겠지만 백신접종으로 9주령까지만 감수성 일령이 줄어드는 것이다. 백신의 경우 거의 모든 것이 이와같은 여건이 주어진다. 예를 들면 뉴캐슬병 항체가 없는 닭에 뉴캐슬병 생독백신을 접종하면 2주후에는 진짜 100% 뉴캐슬병을 방어할 수 있다. 그러나 이렇게 좋은 백신도 4주령에 백신을 접종하고 2주후 즉 6주령이 되어야 뉴캐슬병을 막기 때문에 6주령까지는 외부로부터 들어오는 바이러스와 세균을 철저히 차단하고, 일단 들어왔을 가능성이 있는 것은 소독으로 제거하여야 하며, 감수성일령인 9주령까지는 양계장에서 제일 접촉이 적은 곳을 택하여 철저히 사육하지 않으면 백신의 효력을 발생시킬 수 없는 것이다. 즉 백신의 능력에는 한계가 있으며 주어진 임무가 있다고 보아야 한다.

오늘도 보리훈식
우리는 건강가족

- 농수산부 -



메인 도계기 10번째 가족도?
만족하실 것입니다.

“최신의 도계 시설을 우리 실정에 맞게” 과학 시스템은 외국에서 10년전에 쓰던 진부한 시설이나, 우리 실정에 맞지 않는 턱 없는 시설을 공급하지는 않습니다. 항상 최신의 시설을 귀하의 실정에 맞게 적절히 조화시켜서 공급해 왔습니다.

 **과학시스템**

영업부·무역부 : 서울·성동구 능동 246-10

☎ 445-0212, 1886

공

장 : 서울·동대문구 신내동 436