국가검정 동물용의약품 검정기준 개정

수의과학연구소는 국가검정 동물용의약품의 검정기준중 일부를 개정하여 아래와같이 홍보 하였다.

▣ 1-4-04-03 개 코로나바이러스 불활화백신 검정기준

이 기준은 개 코로나바이러스를 고양이 콩팥세포에 증식시켜 불활화한 백신의 검정기준이며 다음항에 적합하여야 한다.

가. 특성시험 : 분홍색의 현탁액으로 이물이취가 없고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

나. 무균시험 : 동물용 생물학적제제 일반 검정기준에 따른다.

다. 방부제 정량시험 : 동물용 생물학적제제 일반 검정기준에 따라 치메로살 함유량은 0.01%이하 이어야 한다.

라. 불활화 확인시험

1) 시 험 : 공시품을 원심하여 적당량을 투석막에 넣고 4℃에서 공시품 100배량 이상의 인산완충용액(PBS)에서 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다. 고양이 콩팥세포주(CRFK) 및 A72 또는 감수성 있는 세포를 배양하여 단층을 형성시킨 다음 배양상층액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

2) 판 정 : 조직배양 세포에서 세포변성효과(CPE)가 인정되어서는 아니된다.

마. 안전시험

1) 동 물 : 체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 4마리, 3개월령의 중화항체 음성 건강한 개 6마리를 사용한다.

2) 시 험 : 마우스는 복강에 0.5ml, 기니픽은 근육에 2ml를 접종하여 7일간 관찰한다. 개는 2마리에 3두분, 1두분을 각각 접종하고 2마리는 대조로하여 14일간 관찰한다.

3) 판 정 : 시험동물은 관찰기간중 이상이 없어야 한다.

바. 역가시험

1) 동 물 : 안전시험이 끝난 1두분 접종 개 2마리 및 대조개 2마리를 사용한다.

2) 시 험 : 안전시험이 끝나는 날 1두분 접종개에 다시 1두분을 피하에 접종하고 2주후에 채혈한 혼합혈청과 혼합 대조 혈청을 사용하여 NPLA시험법(별첨 참조)으로 중화 항체가를 측정한다.

3) 판 정 : 1두분 접종개는 NPLA항체가가 4배 이상이어야 하며 대조개는 음성이어야 한다.

사. 검정의 반복 : "가"항에서 "바"항 까지의 그 결과를 판정하기 곤란할 때에는 해당시험을 반복한다.

▣ 1-4-04-04 개 파보바이러스, 코로나바이러스 불활화 혼합백신 검정기준

이 기준은 개 파보바이러스 및 코로나바이러스를 증식시켜 불활화하여 혼합한 백신의 검정기준이며 다음 항에 적합하여야 한다.

가. 특성시험 : 연한 분홍색의 액체이며, 이물 및 이취가 없고 흔들면 쉽게 균등한 현탁액이 되어야 하고 내용물의 성상이 균일하여야 한다.

나. 무균시험 : 동물용 생물학적제제 일반 검정기준에 따른다.

다. 방부제 정량시험 : 동물용 생물학적제제 일반 검정기준에 따라 포르말린 함유량은 0.2%이하, 치메로살 함유량은 0.01%이하 이어야 한다.

라. 불활화 확인시험

1) 시 험 : 공시품을 원심하여 적당량을 투석막에 넣고 4℃에서 공시품 100배량 이상의 인산완충용액(PBS)에서 하룻밤 투석하여 불활화제를 제거한 것을 시험재료로 한다. 고양이 콩팥세포주(CPFK) 및 A72 또는 감수성 있는 세포를 배양하여 단층을 형성시킨 다음 배양 상층액을 제거하고 시험재료를 0.1ml씩 10개 이상에 접종하고 37℃에서 7일간 배양한다.

2) 판 정 : 조직배양 세포에서 세포변성효과(CPE)가 인정되어서는 아니된다.

마. 안전시험

1) 동 물 : 체중 13~15g의 건강한 마우스 10마리, 체중 300~350g의 건강한 기니픽 4마리, 3개월령의 중화항체 음성 건강한 개 6마리를 사용한다.

2) 시 험 : 마우스는 복강에 0.5ml, 기니픽은 근육에 2ml를 접종하여 7일간 관찰한다. 개 2마리에 3두분, 개 2마리에는 1두분을 각각 접종하고 2마리는 대조로하여 21일간 관찰한다.

3) 판 정 : 시험동물은 관찰기간중 이상이 없어야 한다.

바. 역가시험

1) 동 물 : 체중 300~350g의 기니픽 7마리와 안전시험이 끝난 1두분 접종 개 2마리 및 대조개 2마리를 사용한다.

2) 시 험 :

가) 개 파보바이러스 : 기니픽 5마리에 1두분씩 3주 간격으로 2회 근육접종하고, 2마리는 무처지 대조로하여 2차 접종 1주후 채혈하여 혈구응집억제 항체가(HI)로 측정한다.

나) 개 코로나바이러스 : 안전시험이 끝나는날 1두분 접종개에 다시 1두분을 피하에 접종하고 2주후에 채혈한 혼합혈청과 혼합대조 혈청을 사용하여 NPLA시험법(별첨 참조)으로 중화 항체가를 측정한다.

3) 판 정 :

가) 개 파보바이러스 : 접종군은 HI항체가 160배(기하평균) 이상이어야 하며 대조군은 10배이하의 음성이어야 한다.

나) 개 코로나바이러스 : 1두분 접종개는 NPLA항체가가 4배 이상이어야 하며 대조개는 음성이어야 한다.

사. 검정의 반복 : "가"항에서 "바"항 까지의 그 결과를 판정하기 곤란할 때에는 해당시험을 반복한다.

[첨 부] NPLA(Neutralizing Peroxidase-Linked Assay)법

1. Microplate에 가검혈청을 2진법으로 희석하여 well당 50㎕가 되도록 한다.
2. 개 코로나바이러스를 0.1ml당 200 $TCID_{50}$ 되게하여 well당 50㎕씩 넣는다.
3. 진탕기에 20초간 혼합하여 37℃, 1시간 감작한다.
4. A72세포(약 20만개/ml)를 100㎕/well씩 넣고 3일간 37℃(5% CO_2)에 배양한다.
5. 배양 상층액을 버리고 PBS로 1회 세척한 후 Microplate를 완전히 건조시킨다.
6. 80% cold acetone를 넣고 -20℃에서 10분간 고정한다.
7. 고정액을 완전히 버리고 PBS로 1회 세척한다.
8. TGE 단크론성 항체를 PBS(2% 말혈청 함유)로 적당량 희석한 후 50㎕/well씩 넣어 37℃에서 1시간 반응 시킨다.
9. PBS로 3~4회 세척한다.
10. Biotinylated anti-mouse IgG용액 (Kit Solution)을 50㎕/well씩 넣어 37℃에서 40-60분간 반응시킨다.

    [Biotinylated anti-mouse IgG용액 제조법]

    PBS ····· 9.9 ml

    말혈청 ····· 0.1 ml

    Biotinylated anti-mouse IgG ····· 1 drop

11. 동시에 다음 단계의 시약을 제조하여 실시한다.

    [AB solution 제조법]

    PBS-T (0.05% Tween20) ····· 10 ml

    A Solution (Avidin DH) ····· 2 drop

    B Solution (Biotinylated HRPH) ····· 2 drop

12. PBS로 2회 세척한다.
13. AB solution을 100㎕/well씩 넣고 37℃에서 40-60분간 반응시킨다.
14. PBS-T로 3회 세척한 후, 1회 PBS로 세척한다
15. 물기를 완전히 제거한다.
16. Substrate DAB(10 X, 60mg DAB/9ml DW)을 50㎕/well씩 넣는다.

    [Working solution(1X)]

    PBS ····· 9 ml

    30% H_2O_2 ····· 10 ㎕

    DAB Solution (10X) ····· 1 ml

17. 증류수로 세척한 후 대조군에 비하여 염색된 세포가 60%까지 감소된 혈청희석배수의 역수를 NPLA항체가로 판정한다.