발 간 등 록 번 호
11-1470550-000288-01

BCG백신
확인, 역가시험법 매뉴얼



KFDA 식 약 청
식품의약품안전평가원
국 가 검 정 센 터

목 차

1. 서론 ····· 1

2. 확인 시험법 ····· 6

2.1 서론 ····· 6

2.2 확인시험법 - 염색시험 ····· 7

2.3 확인시험법 - PCR 시험법 ····· 10

3. 역가시험법 ····· 20

3.1 서론 ····· 20

3.2 경피용 건조BCG백신 ····· 21

3.3 피내용 건조BCG백신 ····· 26

3.4 ATP assay ····· 33

4. Appendix ····· 41

1. 서론

1.1 결핵이란 ?

결핵은 결핵균으로 알려진 *Mycobacterium tuberculosis*등이 폐와 신장, 신경, 뼈 등 우리 몸 속 거의 대부분의 조직이나 장기에서 병을 일으켜, 피로감, 식욕감퇴 체중감소와 기침, 가래, 가슴통증 등의 증세를 보이는 질병이다. 결핵균이 폐조직에 감염을 일으키는 '폐결핵'이 결핵의 대부분을 차지하기 때문에 일반적으로 결핵이라는 말은 폐결핵을 가리키는 말로 사용되기도 한다. 결핵은 사람에서 사람으로 공기를 통하여 전염된다. 그러나 결핵에 감염되었다 해도 모두 결핵환자가 되는 것은 아니며, 5-10% 정도만이 발병되는 것으로 알려져 있다.

WHO가 2009년 발표한 자료에 따르면 결핵은 전 세계적으로 연간 940여만 명의 환자가 발생하고, 130여만 명이 사망하는 높은 사망률 및 유병률을 보이는 전염성 질환이다.

우리나라의 경우, 지난 수년간 매년 30, 000 ~ 35, 000명 정도의 환자가 지속적으로 발생하고 있으며, 질병관리본부에 따르면, 2009년 한해 35,845명의 환자가 발생하였으며, 2,292명이 결핵으로 목숨을 잃은 것으로 나타났다. 연간 발생률과 사망률은 인구 10만명 당 각각 90명, 8.3명(2009년 기준)으로 경제개발협력기구(OECD) 가입국(29개국 비교) 중 가장 높은 결핵발생률과 사망률을 보이고 있다. 또한 전체 결핵환자의 45%가 20~40대 젊은 층에서 많이 발생해 여전히 후진국형 발생양상을 보이는 것으로 나타났다.

1.2 BCG 백신의 역사

결핵예방을 위해서는 BCG백신이 사용되고 있다. BCG백신은 *Mycobacterium bovis*(소 결핵균)을 약독화시켜 개발된 생균백신으로서,

BCG(Bacillus Calmette Guerin)는 1908년 프랑스의 Calmette와 Guérin에 의해서 개발되었으며 간균(Bacilli) 형태의 결핵균과 개발자의 이름을 넣어 BCG로 명명하였다. Calmette와 Guérin은 결핵 유방염을 앓고 있는 소에서 *M. bovis*를 얻어 13년간 매 3주마다 총 231번을 계대 배양하여 독성이 소실된 *M. bovis*를 얻었고, 이를 BCG백신으로 사용하기 시작하였다. 소의 결핵균은 인간의 결핵균과 유전자 구성이 98%정도 일치 한다고 알려져 있다.

BCG 백신은 현재 사용하고 있는 백신 중 가장 오래된 것으로 1921년에 처음으로 사람을 대상으로 사용되었으며 현재 전 세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 백신이다. WHO는 1974년 이후 예방접종 확대 사업(WHO Expanded Program on Immunization)에 BCG 백신을 포함시킨 후 결핵 유행지역에서 접종률을 80%까지 올렸다. 현재 매년 1억여 명의 영유아가 접종을 받고 있으며, 매년 40,000여건의 결핵성 뇌막염과 기타 파종결핵을 예방할 수 있는 것으로 추산된다. 1960년대 이후 미국과 네델란드를 제외한 거의 모든 나라에서 기본접종으로 사용하고 있다. 우리나라의 경우, 1962년부터 국가 결핵관리사업을 수립하고 BCG백신을 접종하기 시작하여 현재 국내 BCG 접종률은 출생인구의 85%에 이르고 있으며 전체 대상인구의 95%수준의 접종률을 목표로 하고 있다.

WHO는 1965년 1차 국제 표준품 선정이후 최근 2차 국제표준품 선정을 위한 국제공동연구를 진행하고 있으며 결핵 예방과 퇴치를 위한 지속적인 노력을 기울이고 있다.

1.3 BCG 백신

BCG백신을 제조하기 위한 균주는 프랑스 파리의 파스퇴르 연구소의 Calmette와 Guérin에 의해 확립된 후 여러 국가의 실험실로 분양되었으나, 각 실험실에 따라 배양조건이 다양하여 백신 균주의 생장 특징, 생화학적 성질, 지연반응에 대한 능력, 동물에 대한 독성이 서로다른 14가지 이상의 sub-strain 균주이 전 세계적으로 사용되고 있다.

이러한 BCG백신 균주는 크게 초기(early)균주 와 후기(late)균주로 나눌 수 있는데, 초기균주는 Russia BCG-I균주, Tokyo 172균주, Moreau-RJ균주, Sweden균주 등이 있으며, 이들은 후기균주에 비해 특정 유전자의 소실, 획득 및 변이가 보다 더 적은 특징이 있다. 후기균주는 Pasteur 1173P2균주, Danish 1331균주, Glaxo균주 등이 있다. 이들 중 현재 가장 널리 사용되는 균주는 Pasteur 1173 P2균주, Danish 1331균주, Glaxo균주 1077, Tokyo 172균주이다.

실험동물을 이용한 몇몇 연구에서 초기균주가 결핵에 대한 방어력이 조금 더 우수하다고 보고되었으나, 사람을 대상으로 한 시험에서는 그 평가벙법의 제한으로 인해 어떤 균주가 방어력 면에서 특별히 우수하다고 판단하는 것은 매우 어려운 문제로 현재까지 균주에 따른 효과의 차이는 확정지을 수 없다는 것이 전문가들의 공통된 의견이다.

현재 우리나라에서 사용되고 있는 백신은 Danish 1331균주(피내 투여 백신, 필수예방접종대상)와 Tokyo 172균주(경피 투여백신) 두가지 종류이다. BCG의 투여방법은 경구, 피내, 피하, 경피 등 여러 가지 방법이 과거부터 사용되었으나, 피내투여가 전 세계적으로 가장 많이 사용되고 있다. 피내투여는 정확한 용량을 일정하게 투여할 수 있는 장점이 있지만, 궤양, 림프절염과 같은 이상반응의 빈도가 다른 방법에 비해 높다. 일본은 다자기구를 이용한 경피투여 백신을 사용하고 있고, 우리나라는 두가지 다 사용하나, 경피투여 백신의 사용이 우세하다. 투여방법에 따른 방어효과의 차이에 대하여 결론을 내릴만한 보고는 아직 없으나, 다만 국소 이상반응이 경피투여에서 적게 발생된다는 것만이 일반적인 사실로 알려져 있다.

1.4 연구·개발 동향

BCG백신에 대한 국내외 연구결과에 의하면 BCG백신의 결핵 예방효과는 소아기의 결핵성 뇌막염이나 속립성 결핵과 같은 파종성 결핵의 발생

예방에는 비교적 명확하게 나타나고 있으나 성인의 폐결핵에는 그다지 큰 예방효과를 보이지 못하고 있는 것으로 나타났다.

초기 BCG백신은 폐결핵의 80%를 예방하는 성과를 거두었으나, 1960년대까지는 세균을 장기적으로 보관하는 방법이 없어 균주를 배지에서 연속적으로 배양해 왔다. 시간이 경과하면서 배양배지에서 연속 배양된 BCG균주가 폐결핵에 대한 효능을 상실하게 된 것으로 여겨지고 있으나, BCG균주가 폐결핵에 대하여 효능을 상실하게 된 정확한 이유는 밝혀지지 않았다.

대다수의 연구자들은 BCG균주가 배지에서 배양되는 동안 유전자 변화로 결핵을 예방하는 데 필요한 면역반응을 일으키지 못하게 되었다는 개념을 일단 수용하였다. 그러나 최근 미국 밴더빌트 대학의 연구진은 "BCG백신은 약해진 것이 아니라 많은 항산화제가 생성되어 면역 반응을 억제하는 성질이 강해졌기 때문"이라고 보고하기도 하였다. BCG의 예방효과는 연구자에 따라 다양한 결과가 도출되는 등 최근까지 전 세계적으로 논란의 대상이 되고 있다.

1.5 맺음말

BCG백신은 90여 년 전 처음으로 사람에게 사용되었으며, 결핵을 예방하기 위한 유일한 예방백신으로서 인류건강에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 BCG백신은 현재 영유아의 결핵성 뇌막염이나 파종성 결핵에는 예방효과를 보이고 있으나, 성인의 폐결핵에는 그다지 큰 효과를 보이지 못하는 등 여전히 그 예방효과는 논란의 대상이 되고 있다.

20세기 후반부터 새로운 결핵예방 백신을 만들기 위한 기초적인 분자생물학적 연구가 시작되었으며, 지난 10여 년 전부터는 이러한 노력이 결실을 보게 되어 최신기술을 이용한 결핵예방 백신이 현재 임상시험을 진행 중에 있다. 모든 임상시험용 백신후보들이 성공적인 결핵예방백신이 되리라는 보장은 없지만 이러한 기초적 연구 결과와 임상시험의 자료들은

결핵 퇴치를 위한 시금석으로 작용할 것으로 사료된다.

WHO는 결핵퇴치를 위한 'STOP TB 2011-2015' 계획을 통해 결핵에 대한 빠른 테스트, 신속한 치료체계, 효과적인 백신공급 등을 위한 기금 조성 및 연구를 지원하기로 하였다. 최근 유럽의회 역시 유럽 2020 전략의 일환으로 결핵퇴치를 결의안을 통과 시켰다. 이 결의안의 주요내용은 2015년 까지 결핵의 발병추이를 낮추고 이를 퇴치하고자 하는 것이다.

우리나라의 경우, 보건복지부와 질병관리본부는 현재 인구 10만 명당 90명이던 결핵발병률을 2015년까지 절반수준으로 감소시키고, 2020년까지는 선진국 수준인 20명까지 낮추기 위해 '결핵퇴치 2030플랜'을 'new 2020플랜'으로 수정하여 국가결핵관리사업을 본격 추진하기로 하였다.

이러한 전세계적인 노력과 과학적 연구결과들이 모여 지구상에서 결핵이 퇴치되는 그날을 기대해 본다.

2. 확인시험법

2.1 서론

BCG 백신의 확인 시험법의 수행은 WHO Technical Report Series (TRS)에서는 균주 단계 및 완제의약품 단계에서 실시하도록 지정하고 있으며, 유럽약전(Ph. Eur., EP) 의 경우 역시, 균주 단계 및 완제의약품 단계에서 실시하도록 지정하고 있다.

WHO TRS 및 EP의 경우 확인 시험법으로 BCG균의 형태학적 관찰 및 도말에 의한 염색시험법이 포함되는 미생물학적인 시험법이외에도 PCR 등과 같은 분자생물학적 시험법도 가능하도록 규정하고 있다.

일본 생기의 경우, 최종원액 및 완제의약품 단계에서 실시하도록 지정하고 있는데 이는 일본의 경우, 균주를 국립감염증연구소(NIID)로부터 분양받아 제조에 사용하기 때문이다.

또한 일본 생기의 경우, WHO TRS나 EP에서와는 달리 확인시험이라는 용어대신 염색시험이라는 용어를 사용하고 있으며 그 시험법은 항산성 염색법에 의한 검경을 실시하도록 규정하고 있다.

2.2 확인시험법 - 염색시험법

Mycobacterium 속의 균들은 소수성의 왁스성 외포 (mycolic acid)로 싸여 있어 잘 염색이 되지 않으나 한번 염색되면, 금속이나 산, 염기 혼합용액에 의해서도 잘 탈색되지 않는 특성을 이용한 항산성 염색법(acid fast staining)을 사용한다.

<시험재료>

표준품

본 시험법을 수행하는 데 표준품은 사용되지 않는다.

검체

완제의약품과 첨부용제를 각 2개씩 채취해 검체로 한다.

시약 및 기구

Carbo Fucshin 용액
Acid alcohol 용액
Methylene Blue 용액
슬라이드글라스, 커버글라스
알코올, 알코올램프
백금이
파이펫(1 000 uL, 200 uL, 20 uL)
forcep
현미경
멸균 정제수

<시험방법>

1. 완제의약품을 첨부용제를 이용하여 적당한 농도로 현탁 한다 (예를들어 경피용 건조BCG백신의 경우, 0.5 mg/mL 등).

2. 70 % 알코올 등을 이용하여 슬라이드글라스를 깨끗이 닦고 멸균 정제수 1방울을 슬라이드글라스 위에 떨어뜨린다.

3. 백금이 등을 이용하여 현탁한 시료를 취하여 정제수와 섞어준 후 슬라이드글라스 표면위에 넓게 펴 도말한다.

4. 도말한 슬라이드글라스 뒷면을 불꽃에서 떨어진 곳에서 서서히 건조시켜 고정한다.

5. 도말한 면에 Carbo Fucshin 용액을 충분히 가한 후 가온 염색한다. 불꽃에서 멀리 놓고 증기가 올라오기 시작하면 불에서 내려놓는다. 이것을 여러 번 반복하고 멸균정제수로 세척해 건조한다.

   *** 이때 슬라이드상의 염색액이 끓거나, 건조되어서는 안된다.**

6. Acid alcohol로 약 2분간 탈색한 후 멸균 정제수를 이용하여 세척한다.

7. 도말면에 methylene blue 용액을 가하여 몇 초 동안 염색한다.

8. 물로 세척하여 건조한 후, 커버 글라스를 덮고 현미경을 이용하여 검경(1000배)한다.

<시험의 판정>

항산성 균 이외의 여하한 균도 발견되어서는 안되며, 옅 푸른색 배경에 붉게 염색된 간균의 형태를 보일 때 적합으로 판정 한다 (그림 1).

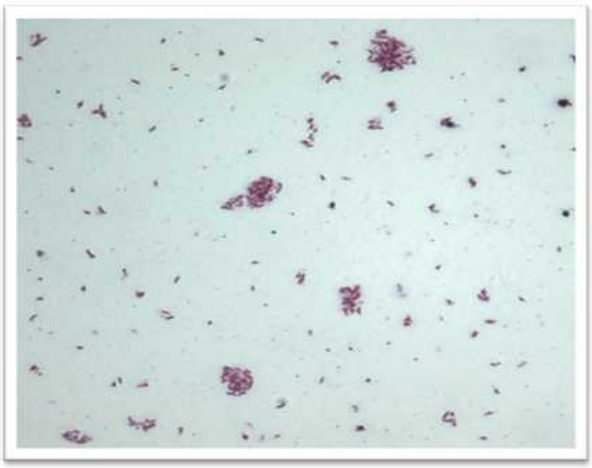


그림 1. 염색시험법의 예 (경피용 건조BCG백신, X1000)

*** BCG균주가 슬라이드 도말면에 골고루 분포 되도록 할 것을 권장한다.**

<재시험>

각 시험기관은 재시험에 관한 규정을 마련해야 한다. 식약청은 동 예규 "시험결과 판정에 관한 규정"에 의거하여 재시험을 실시하고 있다.

2.3 확인시험법 - PCR 시험법

BCG백신의 확인시험의 경우 현재 염색시험법(항산성염색법)이나 배양 후 균주의 형태를 보고 판별하는 시험법이 사용되고 있다. 그러나 이러한 고전적인 시험법으로는 BCG균주의 sub-strain을 구별하지 못하는 단점이 있다. 오늘날 전 세계적으로 14종 이상의 BCG sub-strain이 결핵예방을 위한 백신균주로 사용되고 있으며, 우리나라의 경우도 2종류의 sub-strain(Tokyo 172균주(경피용 건조BCG백신), Danish1331균주(피내용 건조BCG백신))이 사용되고 있는 실정이다. 현재 백신으로 사용되는 균주들의 경우, 계대를 거듭하며 아래 그림 2와 같이 고유한 유전자 부위의 결실 (RD, Region of deletion)이 발생 되었으며, PCR 시험법은 이 결실 유전자 부위를 증폭하여 sub-strain 구별에 사용하고자 하는 시험법이다.

본 절에서 소개하고자 하는 시험법은 식약청이 WHO 국제 공동연구 참여 참여한 시험법이다.

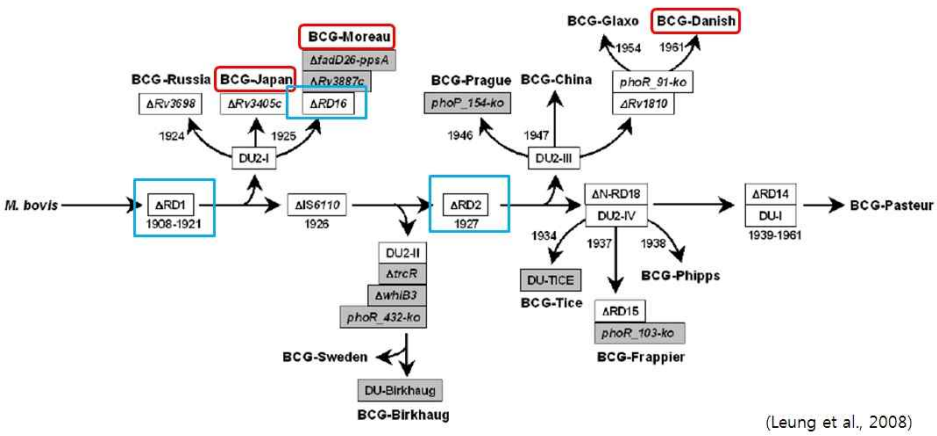


그림 2. BCG균주의 유전적 다양성

<시험재료>

표준품

본 시험법을 수행하는 데 표준품은 사용되지 않으나 음성대조로서 salmon sperm DNA의 사용을 권장한다.

검체

완제의약품과 첨부용제를 최소 2개씩 채취해 검체로 한다.

단, 완제의약품의 분량이 소량인 경우, 검체를 추가할 수 있으며, DNA 추출을 위해서는 최소 1.5 mg 이상을 사용할 것을 권장한다.

시약 및 기구

PCR machine (thermocycler)

DNA extraction kit (단, 검증된 자가 시험법 적용 가능)

Taq DNA polymerase

5X or 10X reaction buffer

dNTP mixture (10 mM stock or equivalent)

MgCl2 (25mM stock or equivalent)

PCR tube (0.2 mL or 0.5 mL)

DNA ladder (50 bp ladder or equivalent))

TBE (Tris-borate-EDTA) buffer

Agarose gel electrophoresis equipments

EtBr (Ethidium Bromide)

Agarose

6X gel loading buffer

파이펫 (1 000 uL, 200 uL, 20 uL 2 uL)

primer (표 1 참조)

표 1. PCR primers

Primer name	Primer sequence (5`~ 3`)
ET1	AAGCGGTTGCCGCCGACCGACC
ET2	CTGGCTATATTCCTGGGCCCGG
ET3	GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG
RD2l	CCAGATTCAAATGTCCGACC
RD2r	GTGTCATAGGTGATTGGCTT
RD8l	ACTCCTAGCTTTGCTGTGCGCT
RD8r	GTACTGCGGGATTTGCAGGTTC
RD14l	CAGGGTTGAAGGAATGCGTGTC
RD14r	CTGGTACACCTGGGGAATCTGG
RD16l	ATCGTTCACGGACAGCCGTAGT
RD16r	CTCGATCCAAGGTCAACCACG
C3	GCGCGAGAGCCCGAACTGC
C5	GCGCAGCAGAAACGTCAGC

<시험방법>

가. DNA extraction

1. 완제의약품을 첨부용제를 이용하여 현탁한다.

2. 검증된 자가 시험법이 있을 경우, 그 방법을 사용하며, 상용 DNA extraction kit을 사용할 경우 제조원의 SOP에 따른다.

3. 추출한 DNA는 흡광도법 등 적절한 방법을 이용하여 그 농도 및 순도를 구한다.

나. PCR 실시

1. PCR 반응에 필요한 DNA의 농도는 sub-strain 별로 상이하며, 일반적으로 15 ng 이상을 사용할 것을 권장한다.

*** 식약청 연구결과 PCR 반응의 최저검출농도는 피내용 건조BCG백신인 Danish 1331균주의 경우 15ng, Moreau 균주의 경우 10 ng이, 경피용 건조BCG백신인 Tokyo 172균주의 경우 3ng의 DNA가 필요한 것으로 나타났다 (그림 3).**

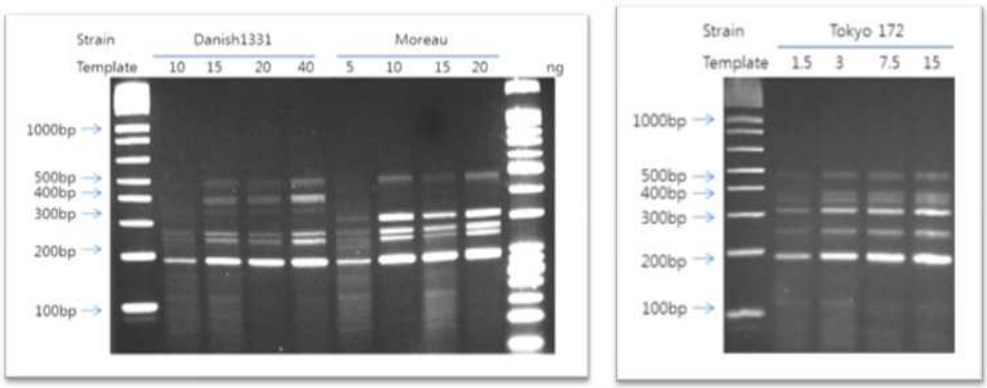


그림 3. PCR 반응의 민감도

2. PCR 반응물의 조성법은 자가 시험법이 있을 경우 이를 사용가능 하다. 일반적으로는 아래 표 2와 같이 master-mix를 만들어 사용할 것을 권장한다 (on ice에서 실시).

*** 본 절에서 소개하고있는 PCR 시험법은 multiplex PCR 시험법이다.**

표 2. master-mix의 제조

components		Stock Conc.	volume in 1X	volume in 11X
5X reaction bf.		5X	10ul	110
dNTPs		10mM	1ul	11
$MgCl_2$		25mM	3ul	33
Primers	ET1	5uM	2ul	22
	ET2	10uM		22
	ET3	5uM		22
	RD2L RD2R	10uM	2ul	22
	RD8L RD8R	10uM	2ul	22
	RD14L RD14R	10uM	2ul	22
	RD16L RD16R	10uM	2ul	22
	C3 C5	10uM	2ul	22
Taq Polymerase		5unit/ul	0.3ul	3.3
D.W			4.7ul	51.7
DNA samples			5ul (15 ng)	각 tube에 구분하여 주입
Total			50ul	

*** primer를 제외한 다른 조성물의 농도는 최종농도에 맞추어 필요량을 조절가능하다.**

3. 각각의 PCR tube에 45 uL의 master-mix를 분주한다 (on ice에서 실시).

4. 추출한 DNA sample 과 음성대조군인 salmon sperm DNA를 master mix가 분주된 각각의 PCR tube에 넣는다.

5. 모든 PCR 조성물의 주입이 완료되면 잘 섞어준 후 가볍게 spin down 해준다.

6. 아래 표 3과 같은 조건으로 PCR 반응을 실시한 후 PCR 산물은 확인하기 전까지 4 ℃에서 보관한다.

표 3. PCR 조건

Step	No.cycles	Temp. (℃)	Time (min)
1	1	94	10
2	30	94	1
		55	1
		72	2
3	1	72	10
4	1	4	Hold

다. PCR 산물의 확인

*** agarose gel을 이용한 PCR 산물의 확인법에 대한 예이며, 검증된 자가시험법이 있는 경우 자가시험법을 사용할수 있다**

1. 1X TBE buffer를 이용하여 3% agarose gel을 만든다.

*** agarose gel의 농도가 높아 취급시 주의가 요구되는바 고농도 전용 agarose를 사용할 것을 권장한다.**

2. 6X gel loading buffer 10 uL를 PCR 산물 50 uL에 넣고 잘 섞어 준다.

3. DNA ladder의 경우, 제조원의 지침대로 준비한다.

4. 3% agarose gel을 agarose gel electrophoresis equipments에 정치 시킨 후 1X TBE buffer를 3% agarose gel이 잠길 만큼 넣어준다.

5. DNA ladder 및 PCR 산물을 3% agarose gel에 loading 한 후 전기 영동한다.

6. 전기영동이 끝난 gel은 EtBr로 염색하여 UV light를 이용하여 확인하며, 이미지화 한다.

*** agarose gel은 3%를 사용하길 권장하며 만들 때 EtBr을 넣어도 무방하나 이 경우 취급시 특별히 주의한다.**

*** 전기영동 시간은 사용 apparatus에 따라 다르나, 일반적으로 100V에서 40 ~ 45분 정도 running 하여 xylene blue dye 가 agarose gel 의 4/5 정도 왔을 때 정지하는 것을 권장한다**.

*** agarose gel 에서의 전기영동을 할 경우, PCR 산물의 해상도를 위하여 TBE buffer를 사용할 것을 권장한다.**

<시험의 판정>

PCR 산물을 확인 하였을 때 BCG백신의 경우 아래 표 4와 같은 크기의 band가 확인되어야 하며 음성대조군에서는 어떠한 밴드도 나타나서는 안된다.

표 4. 국내 유통BCG백신의 band profile

경피용 건조BCG백신 (Tokyo 172균주)	피내용 건조BCG백신 (Danish 1331 균주)
472 bp	472 bp
372 bp	**401 bp**
353 bp	353 bp
-	**276 bp**
315 bp	-
252 bp	252 bp
196 bp	196 bp

위의 표 4에서 보듯이 경피용 건조BCG백신과 피내용 건조BCG백신 모두 6개의 band profile을 보이지만, 굵은 글씨로 나타낸 크기에서 둘 사이의 차이를 보인다 (그림 4 참고). 이러한 차이는 앞서 설명한 바와 같이 두 균주간의 결실 유전자 부위의 차이 (그림 2)에 따른 것으로 두 균주 이외에도 Moscow 균주, Moreau 균주 등도 구별해 낼 수 있는 시험법이다.

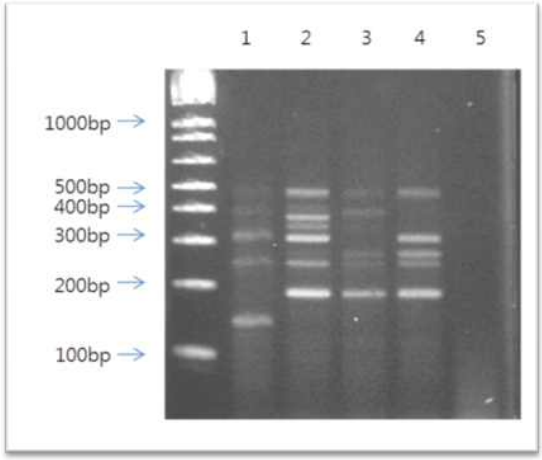


그림 4. PCR 시험법의 예

(lane 1 : *Mycobacterium tuberculosis*, lane 2 : 경피용 건조BCG백신 (Tokyo 172주), lane 3 : 피내용 건조BCG백신 (Danish 1331주), lane 4 : 피내용 건조BCG백신 (Moreau주), lane 5 ; Salmon sperm DNA)

*** 위의 그림 4는 WHO 국제공동연구 및 식약청 자체 연구과제 수행의 결과물로서 Tokyo172균주, Danish1331균주, Moreau균주가 multiplex PCR시험법을 통해 sub-strain 수준에서 구별 가능함을 나타낸다.**

<재시험>

각 시험기관은 재시험에 관한 규정을 마련해야 한다. 식약청은 동 예규 "시험결과 판정에 관한 규정"에 의거하여 재시험을 실시하고 있다.

※ 참고문헌

[1] Requirements of Dried BCG vaccine. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 1985 (WHO Technical Report Series, No. 745. Annex 2).

[2] Requirements of Dried BCG vaccine. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 1987 (Ammnments of WHO Technical Report Series, No. 771. Annex 12).

[3] Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccine, WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 2012

[4] International collaborative study to evaluate and establish the 1st WHO Reference Reagent of BCG vaccine of Moreau-RJ sub-strain, WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 2012

[5] Markey K, Ho MM, Choudhury B, Seki M, Ju L, Castello-Branco L.R, Gairola S, Zhao A, Shibayama K, Andre M, & Corbel MJ. Report of an international collaborative study to evaluate the suitability of multiplex PCR as an identity assay for different sub-strains of BCG vaccine. Vaccine 2010. 28:6964-6969.

[6] Leung AS, Tran V, Wu Z, Yu X, Alexander DC, Gao GF, Zhu B, Liu J. Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. BMC Genomics. 2008. 9:413.

[7] European Pharmacopoeia 7th Edition 2011. BCG vaccine, freeze-dried. Council of Europe, Strasbourg.

[8] 生物學的製劑基準, 2012, 건조BCG백신 일본 厚生勞働省 第348号.

[9] 생물학적제제기준 및 시험방법 2012. 피내용 건조BCG백신 및 경피용 건조BCG백신, 식품의약품안전청 고시 제54호.

3. 역가시험법

3.1 서론

BCG백신의 역가시험은 현재 surrogate marker가 없어 백신을 적절한 농도로 희석하여 배양배지에서 배양한 후 균의 수를 산정하는 생균수 측정법이 사용되고 있다. 그러나 이 방법은 균주의 배양기간이 오래 걸리고, 시험자간 또는 시험간의 편차의 발생이 높다는 단점이 있다.

역가 시험 (생균수 측정법)에 대한 외국 공정서의 가이드라인을 살펴보면 WHO Technical Report Series (TRS)에서는 numbers of culturable particle 이라는 항목으로 최종원액 및 완제의약품 단계에서 실시하도록 지정하고 있으며, 유럽약전(Ph. Eur., EP) 의 경우 역시, count of viable unit이라는 항목으로 최종원액 및 완제의약품 단계에서 실시하도록 지정하고 있다.

WHO TRS 및 EP의 경우 생균수 측정시험법 이외에도 ATP assay 등과 같은 적절한 생화학적 시험법이 가능하도록 규정하고 있다.

일본 생기의 경우, 우리나라에서와 같이 역가시험이라는 명칭을 사용하며 완제의약품 단계에서 실시하도록 지정하고 있다. 일본의 경우, 자국내에서는 경피용 건조BCG백신만을 사용하고 있으며, 우리나라의 경우 피내용 건조BCG백신과 경피용 건조BCG백신을 모두 사용하고 있다.

3.2 경피용 건조BCG 백신

경피용 건조BCG백신의 경우 우리나라와 일본에서만 접종이 이루어지고 있으며, *M.bovis* Tokyo 172균주를 사용하여 제조된다. BCG 습균 0.5 mg 당 생균수를 BCG 백신 역가로 하여 CFU(Colony Forming Unit)로 나타낸다.

첨부용제(생리식염액) 1 mL 중에 0.5 ㎎의 습균을 함유하도록 한 시료를 원액농도로 하여 멸균 정제수로 일정농도까지 희석한 접종 균액을 배지(1 % ogawa 또는 Lowenstein-Jenson)에 접종한다. 37 ℃에서 4주간 배양한 후 생성된 콜로니에 대해서 통계학적으로 처리해 통계값의 적부를 판정한다.

<시험재료>

표준품

본 시험법을 수행하는 데 표준품은 사용되지 않는다.

검체

완제의약품 및 첨부용제 각 10개

시약 및 기구

멸균 정제수 (또는 멸균 생리식염수도 사용가능)

Lowenstein-Jenson 배지 (또는 1% ogawa 배지도 사용가능)

5.5부 시험관 70개와 시험관뚜껑 70개 (또는 Silistopper 70개)

Eppendorf dispensor (or equivalent)

Pipette (1 000 uL, 200uL)

멸균된 disposable tip

생물학적안전작업대 (Biological safety cabinet(Class Ⅱ))
멸균 주사기 1.0 mL 또는 5.0 mL
멸균 주사바늘 0.5 × 16 mm (25G × 5/8")

<시험방법>

가. 균체 희석

경피용 건조BCG백신의 경우 1mL 중 0.5mg의 습균을 함유하도록 한 후 추가 희석하여 접종하는 것을 권장하며, 아래 시험방법은 경피용 건조 BCG백신(일본균주, 12mg)을 예를 들어 설명한 것이다.

1. 시험관 10 개는 빈 것, 10개는 4 mL, 50개에는 4.5 mL의 정제수를 분주하여 멸균한다.

   *** 빈 시험관은 건조시켜 실온보관하고, 나머지는 충분히 식힌 후 시험 실시 전까지 냉장보관할 것을 권장한다.**

2. 첨부용제(생리식염수, 0.15 mL)를 각각의 검체 10 개에 1 mL 주사기 등을 사용하여 분주한 후 용해한다.

   *** pipette을 이용하여 정확히 0.15 mL을 분주할 것을 권장한다.**

3. 얼음 위에서 3분간 방치하며, 용해한 검체는 얼음 위에 보존하면서 실험을 실시 할 것을 권장한다.

4. 0.45 mL의 멸균정제수를 각 10 개의 앰플에 첨가한 후, 검체가 흘러넘치지 않게 조심스럽게 tapping하여 잘 희석한다.

   *** vortex등을 사용하여 vigorous하게 희석하는 것을 권장하지 않으며, 이 단계**

이후 동일하게 적용할 것을 권장한다.

5. 멸균된 빈 시험관 10개에 0.9 mL의 멸균정제수를 분주한다.

   *** 분주할 멸균정제수는 냉장보관품을 권장한다.**

6. 4의 각각의 앰플에서 0.3 mL을 취하여 5의 시험관 10개에 이식한 후 tapping등을 통하여 잘 희석한다.

7. 6의 시험관에서 0.5 mL을 취하여 4.5 mL의 멸균정제수가 든 시험관에 이식하여 잘 흔들어서 희석하며, 나머지 9개에 대해서도 동일하게 반복한다 (0.5 mg/mL).

8. 7의 조작을 4회 더 반복한다.

9. 8의 시험관에서 1 mL을 취하여 4 mL의 멸균정제수가 든 시험관에 이식하고 잘 흔들어 희석하며, 나머지 10 개의 시험관에 대해서도 동일하게 반복한다.

나. 균의 접종 및 배양

1. 가-9의 시험관에서 0.1 mL씩을 Lowenstein-Jenson배지 2개에 접종한 후, 표면에 골고루 분포되도록 펼쳐 준다.

2. 나머지 9개도 나-1과 같은 작업을 반복한다.

3. 20개의 배양 배지의 표면이 마를 때 까지 골고루 펼쳐 준 후 37 ℃에서 4주간 배양한다.

*** 37 ℃ 배양기에서 배양하기 전까지 모든 작업은 BSC에서 수행할 것을 권장하며, daylight 및 자외선의 노출에 주의하여야 한다. 또한, 실험에 소요되는 시간이 2시간을 넘지 않을 것을 권장한다.**

*** 균의 초기 배양시에는 배양 배지의 표면이 지면과 수평이 될 수 있도록 사면대를 사용할 것을 권장하며 사면대가 없을 경우, 두꺼운 종이 등을 사용할 것을 권장한다.**

*** 1 ~ 2일이 경과 후 사면대위에서 배양중인 배지는 세워서 배지박스 등에 넣어 배양 할 것을 권장한다.**

*** 배양 배지는 시험 하루 전 37 ℃에서 배양하여 pre-warm 시킬 것을 권장한다.**

*** 균을 배양 배지에 접종전에 배지에 고여 있는 응축수를 배지의 표면이 상하지 않게 잘 제거 할 것을 권장한다.**

다. 집락수의 계산

1. 균의 집락수는 4주 후 계수 한다.

*** 집락수의 계수는 균의 생장속도가 각각 다르므로, 보다 정확한 집락수의 산출을 위하여 균 접종 후 3주, 4주에 걸쳐 계수 할 것을 권장한다.**

<시험의 판정>

집락수의 평방근 합계 및 분산값을 통계학적으로 처리할 때 허가 받은 기준에 적합하여야 한다.

아래 그림 5의 예에서 같이, 두 배지의 평균 집락수를 결과값에 기입하고 집락수의 평방근의 합계와 분산값을 아래그림 우측 도표에 적용 하였을 경우, 합격역에 분포할 때 적합한 것으로 판정한다.

1) 판정결과

	배지No.	결과값=A	A × 5 =X	√X
생균수판정수	1	31	155	12.45
	2	23	115	10.72
	3	19	95	9.75
	4	21	105	10.25
	5	30	150	12.25
	6	30	150	12.25
	7	29	145	12.04
	8	22	110	10.49
	9	17	85	9.22
	10	24	120	10.95
평균		31.0	∑√X	110.37
n		10	u^2	1.32
BCG 0.5mg에 해당 생균수(×10^5개)				155.0

2) 판정도표

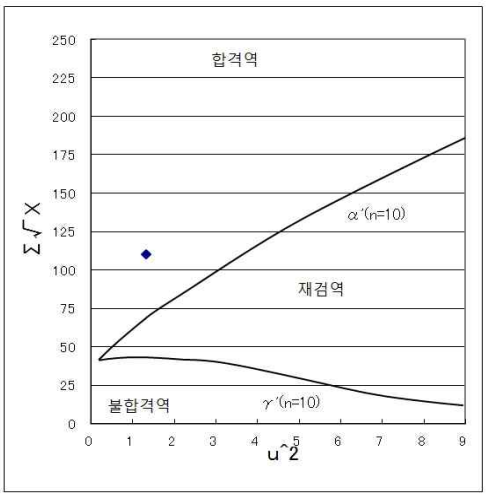


그림 5. 경피용 BCG백신의 역가시험 결과 및 판정예

<재시험>

각 시험기관은 재시험에 관한 규정을 마련해야 한다. 식약청은 동 예규 "시험결과 판정에 관한 규정"에 의거하여 재시험을 실시하고 있으며, 위 그림의 재검역면에 분포시 재시험을 실시한다.

3.3 피내용 건조BCG 백신

현재 국내 유통중인 피내용 건조BCG백신의 경우, *M.bovis* Danish 1331균주를 사용하여 제조된다. 역가의 판정은 일정 희석농도까지 희석한 완제의약품을 Lowenstein-Jenson배지에 접종 한 후 37℃에서 5주간 배양한 후 생성된 콜로니를 **WHO/TB/Technical Guide 77.9: "In vitro Assays of BCG Product"** 에 따라 구하여 판단한다. 또한, 생균수를 이미 알고 있는 표준품을 동시에 시험해 기술 및 기타 요인을 확인한다.

<시험재료>

표준품

본 시험법을 수행하는 데 사용되는 표준품의 경우, 역가의 적합범위가 검증된 표준품을 사용한다.

검체

완제의약품 및 첨부용제 각 10개, 표준품

시약 및 기구

멸균 정제수 (또는 멸균 생리식염수도 사용가능)
Lowenstein-Jenson 배지
둥근바닥 플라스크 4개
5.5부 시험관 6개
Eppendorf dispensor (or equivalent)
Pipette (1 000 uL, 200uL), autopipette
멸균된 disposable tip (50 mL, 25 mL, 10mL, 1mL, 0.2 mL)
생물학적안전작업대 (Biological safety cabinet(Class Ⅱ))

멸균 주사기 1.0 mL 또는 5.0 mL
쏘똥 배지 (Sauton medium)

<시험방법>

가. 균체 희석

아래 시험방법은 피내용 건조BCG백신(Danish 1331균주)을 예를 들어 설명한 것이다.

1. 둥근바닥 플라스크, 시험관, 1/4 쏘똥 배지를 멸균한 후, 시험관은 드라이오븐에서 말려 습기를 제거하고 1/4 쏘똥 배지는 충분히 식힌 후, 냉장보관 한다.

2. 첨부용제(1/4 쏘똥 배지)를 각각의 검체 5 개에 1 mL 주사기 등을 사용하여 분주한 후 용해한다.

   *** Pipette을 이용하여 정확히 1 mL을 분주할 것을 권장한다.**
   *** 첨부용제를 주입하기 전 고무전 부위를 2 ~ 3회 정도 가볍게 쳐서 고무전에 붙어있는 균주를 떨어뜨릴 것을 권장한다.**
   *** 용해시 절대로 vortexing 하여서는 안되며 2회 정도 inverting 한 후 조심스럽게 용해하여야 한다.**

3. 용해한 각각의 검체는 멸균된 빈 시험관에 모은다 (pooling).

   *** Pipette 등을 이용할 경우, 하나의 pipette tip을 사용할 것을 권장한다.**

4. 아래 표 5 에서와 같이 단계 희석을 실시한다.

   *** 표 5는 단지 예시일 뿐이며, 검증된 시험법이 있는 경우 그 방법을 사용하여도 무방하다.**

표 5. 시험액의 단계희석

	검체	희석액 (1/4 쏘똥배지)	희석배수
시험관 1	5 mL (가-3 pooling)	0	x 1
둥근바닥플라스크 1	1 mL	99 mL	x 100
둥근바닥플라스크 2	1 mL	99 mL	x 10 000
시험관 2	4 mL (10 000배 희석액)	4 mL	x 20 000
시험관 3	2 mL (10 000배 희석액)	6 mL	x 40 000

*** 단계 희석중에 vortex등을 사용하여 vigorous하게 희석하는 것을 권장하지 않으며, 얼음위에서 희석을 수행할 것을 권장한다**

*** 희석배수의 경우, 접종하고자 하는 단계 희석배수 중 중간희석배수(표 5의 경우 20 000) 의 CFU 값이 20 CFU 이내가 되는 값을 선정하고 그 전후로 2배가 되는 단계희석 배수를 선정하여 실험을 실시할 것을 권장한다 (Tube 형 배지를 사용할 경우).**

나. 균의 접종 및 배양

1. 표 5의 10 000배, 20 000배 희석액은 각각 0.1 mL 씩을 Lowenstein-Jenson 배지 5개에 접종한 후, 표면에 골고루 분포되도록 펼쳐 준다.

2. 40 000 배 희석액은 (표 5) Lowenstein-Jenson배지 10개에 접종한 후, 표면에 골고루 분포되도록 펼쳐준다.

3. 20개의 배양 배지의 표면이 마를 때 까지 골고루 펼쳐 준 후 37 ℃에

서 5주간 배양한다.

*** 피내용 건조BCG백신 (Danish 1331균주)의 경우, 배양 배지로서 Lowenstein-Jenson 배지를 사용할 것을 권장한다. 왜냐면 동등이상의 다른 배지를 사용하였을 경우 결과 값의 불일치가 발생할 수 있기 때문이다.**

*** 배지의 개수는 첫 단계 희석액 (표 5의 10 000배) 3개, 두 번째 희석액 3개, 세 번째 희석액 6개를 사용하여도 무방하나, 위의 예에서와 같이 5, 5, 10의 사용을 권장한다.**

*** 37 ℃ 배양기에서 배양 전 까지 모든 작업은 BSC에서 수행할 것을 권장하며, daylight 및 자외선의 노출에 주의하여야 한다. 또한, 실험은 2시간 이내에 종료할 것을 권장한다.**

*** 균의 초기 배양시에는 배양 배지의 표면이 지면과 수평이 될 수 있도록 사면대를 사용할 것을 권장하며 사면대가 없을 경우, 두꺼운 종이 등을 사용할 것을 권장한다.**

*** 1 ~ 2일이 경과 후 사면대위에서 배양중인 배지는 세워서 배지박스 등에 넣어 배양 할 것을 권장한다.**

*** 배양 배지는 시험 하루 전 37 ℃에서 배양하여 pre-warm 시킨 후 균을 배양 배지에 접종 전에 배지에 고여 있는 응축수를 배지의 표면이 상하지 않게 잘 제거 할 것을 권장한다.**

*** 참조백신의 경우도 위와 동일한 방법으로 수행하여 시험의 적합성을 검증할 것을 권장한다.**

다. 집락수의 계산

1. 균의 집락수는 5주 후 계수 한다..

*** 집락수의 계수는 균의 생장속도가 각각 다르므로, 보다 정확한 집락수의 산출을 위하여 균 접종 후 4주, 5주에 걸쳐 계수 할 것을 권장한다.**

*** 집락수를 계수 할 때는 2인 이상이 적어도 2번에 걸쳐 계수하여야 하며, 두 명의 결과값의 편차가 10% 이내이거나 colony 개수의 차이가 2개 이하 일 때 채택할 것을 권장하며, 만약 이 범위를 벗어날시 제 3자가 다시 한번 더 계수하여 검증할 것을 권장한다.**

<시험의 판정>

허가받은 기준에 적합하여야 한다.
단, Danish 1331균주의 경우 $2 \sim 8 \times 10^6$ CFU 이어야 한다.

아래 그림 6의 예에서 같이, 단계 희석별 집락수를 결과값에 기입하고 각 희석배수에서 집락수의 평균을 그림 7을 참고하여 구한다. 최종 역가는 각 희석구간의 희석배수를 고려하여 구하도록 한다.

보관온도	4℃		
희석배수 / NO. tubes	10,000	20,000	40,000
1	48	18	16
2	46	15	14
3	52	41	13
4	64	35	19
5	46	29	13
6			17
7			6
8			16
9			14
10			15
평균	51.2	27.6	14.3
역가			**5.461 x10^{6}CFU/ml**

그림 6. 피내용 건조BCG백신의 역가시험 결과예

(1) $2\omega(80) \geq \overline{X}_1 + \overline{X}_2 + 2\overline{X}_3$ 일 때, $CFU = \frac{d_1}{v} \times \frac{1}{2} \times (\overline{X}_1 + \overline{X}_2 + 2\overline{X}_3)$

(2) $\overline{X}_1 + \overline{X}_2 + 2\overline{X}_3 \geq 80 \geq \overline{X}_2 + 2\overline{X}_3$ 일 때, $CFU = \frac{d_2}{v} \times \frac{\omega \times \overline{X}_1}{2\omega + \overline{X}_1 - (\overline{X}_2 + 2\overline{X}_3)}$

(3) $\overline{X}_2 + 2\overline{X}_3 \geq 80 \geq 2\overline{X}_3$ 일 때, $CFU = \frac{d_3}{v} \times \frac{\omega \times \overline{X}_2}{2\omega + \overline{X}_2 - 2\overline{X}_3}$

(4) $2\overline{X}_3 \geq 80$ 일 때, $CFU = \frac{d_3}{v} \times \overline{X}_3$

w : 배지 1 개에 셀 수 있는 균수로 40
d_{1-3} : 희석배수
$\overline{x}_{1-3}$: 평균치
V : 접종량

그림 7. 결과 계산 기준

<재시험>

각 시험기관은 재시험에 관한 규정을 마련해야 한다. 허가 받은 기준에 적합하지 않을 경우 재시험을 실시한다. 식약청은 동 예규 "시험결과 판정에 관한 규정"에 의거하여 재시험을 실시하고 있다.

3.4 ATP assay

생균수 측정법을 통한 역가시험의 가장 큰 단점은 앞서 언급한 바와 같이 균주의 배양기간이 오래걸린고 시험자간 또는 시험간의 편차의 발생이 높으며, 많은 노동을 필요로 한다는 점이다.
따라서 이를 보완할 수 있는 새로운 시험법이 최근 들어 개발중에 있으며 이 중 한 예가 ATP assay 이며 그 원리는 아래 그림 8과 같다.

ATP assay ; Intralcellular ATP + luciferin/luciferase → bioluminescence

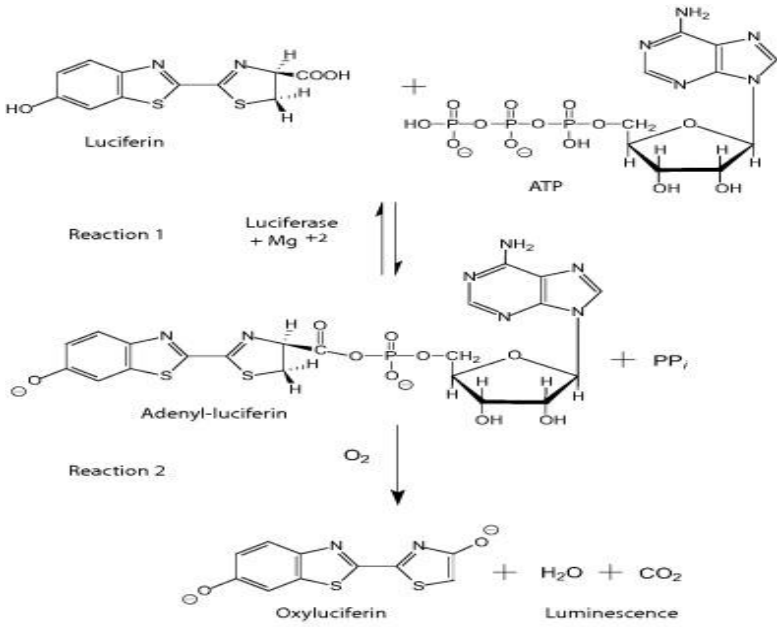


그림 8. ATP법의 원리

이 절에서는 WHO BCG백신 국제표준품 제조 공동연구시 역가시험법의 대체 시험법으로 적용되었던 ATP assay 및 식약청의 국제공동 연구결과에 대하여 소개하고자 한다.

<시험재료>

표준품

본 시험법을 수행하는 데 표준품은 사용되지 않는다.

검체

완제의약품 3개

시약 및 기구

Dubos medium (supplemented with 0.045% Tween 80 and 0.5% bovine albumin) 또는 Middlebrook medium 7H9

ATP Kit SL (144-041, BioThema, Haninge, Sweden or equivalent)

- o Tris-EDTA (TE) buffer (0.1 M) with 2 mM EDTA, pH 7.75
- o ATP Reagent SL.
- o ATP Standard, 1 x 10^{-5} M.

2 ml sterile screw capped tubes

Luminescence reader

Heat block

Incubator

Pipette (1 000 uL, 200uL)

멸균된 disposable tip

생물학적안전작업대(Biological safety cabinet(Class Ⅱ))

96 well plate (black or opaque)

<시험방법>

가. 검체의 준비

; 검체는 pooling 하여서는 안되며, 3개의 각각 검체에 대하여 1:2로 단계 희석하여 3번 측정할 것을 권장한다 (그림 9 참조).

1. 각각의 검체에 1 mL의 Dubos 배지를 넣은 후 잘 현탁한다.

   *** 경피용 건조비씨지백신과 같이 용량이 많은 백신은 적당히(1:5) 희석한 것을 현탁액으로 할 것을 권장한다.**

2. 현탁한 검체를 screw cap tube로 옮긴 후 37 ℃에서 22 ~ 26 시간 배양 한다.

3. 다음날 2 mL screw cap tube에 TE buffer 0.5 mL을 넣은 후 Heat block에서 (96 ℃ ~ 98 ℃)에서 충분한 시간동안 Pre-heating 시킨다.

나. 96 well plte를 이용한 luminescence 측정

1. 가-2의 배양된 현탁액을 아래의 표 6과 같이 pre-warm 된 Dubos media를 이용하여 현탁한다.

표 6. ATP 추출을 위한 단계희석의 예

희석배수	백신 현탁액	Dubos media
1	200 uL	-
1:2	100 uL	100 uL
1:4	100 uL	300 uL

2. ATP를 추출하기 위하여 표 6의 각각의 검체를 가-3에 0.1 mL씩 넣어 준 후 다시 Heat block에서 (96 ℃ ~ 98 ℃)에서 정확히 6분간 반응한다. Dubos 배지 0.1 mL을 음성대조군으로 사용한다.

*** 만약 많은 양의 검체를 사용하여야 할 경우 시험간의 시간차(예를 들어 매 30초 등)를 정확히 지킬 것을 권장한다.**

3. 정확히 6분 후, 나-2의 검체를 차례대로 heat block에서 꺼내어 실온에서 30분정도 식힌다.

4. 표준곡선용 ATP standard를 준비하기 위해 ATP standard 용액을 단계 희석하여 10 ~ 0.312 5 pmol/100 uL가 되도록 희석한 후 각각의 희석액 0.1 mL을 TE buffer 0.5 mL과 잘 섞어 준다.

*** 이때 사용되는 TE buffer는 실온에 있던 것을 사용한다.**

5. 나-3의 검체 및 나-4 (ATP standard)를 96 well plate에 0.15 mL씩 분주한 후, 각각의 well에 ATP reagent 50 uL를 넣어준다.

6. 정확히 5분 후 bioluminescense를 읽는다.

*** reading time 은 1초로 셋팅한다. luminescence는 시간이 지남에 따라 감소하기 때문에 시험간 시간차이를 정확히 지킬 것을 권장한다.**

<시험결과의 예>

1. 시험 결과의 기록지 (그림 9)

Modified ATP Assay

Date test completed:
BCG strain:
Number of sample tested:

ATP standard (pmol/ 100 μl)	1	2	3
10	xxx	xxx	xxx
5	xxx	xxx	xxx
2.5	xxx	xxx	xxx
1.25	xxx	xxx	xxx
0.625	xxx	xxx	xxx
0.3125	xxx	xxx	xxx

		Luminescence count/ 100μl sample		
Sample	Dilution factor	1	2	3
1	1	xxx	xxx	xxx
	2	xxx	xxx	xxx
	4	xxx	xxx	xxx
2	1	xxx	xxx	xxx
	2	xxx	xxx	xxx
	4	xxx	xxx	xxx
3	1	xxx	xxx	xxx
	2	xxx	xxx	xxx
	4	xxx	xxx	xxx
etc.				
Blank (Dubos medium in TE buffer and ATP reagent)	1	xxx	xxx	xxx
Blank (TE buffer and ATP reagent only)	1	xxx	xxx	xxx

그림 9. 실험결과기록지의 예

*** 본 시험결과지상의 ATP standard의 농도범위는 참고사항일 뿐이다. 실제 luminescence reader의 감도에 따라 결과값이 다르기 때문에 사용하고 있는 기기에 맞추어 농도를 설정할 것을 권장한다.**

2. 시험 결과의 예 - standard curve

위의 결과지의 3반복 시험의 결과를 평균하여 한 세트로 표시된 시험 결과의 예이다.

ATP Standard (pmol/100ul)

	1st	2nd	3rd	4th	average	SD	CV
10	183176.0	185437.7	172651.7	203885.7	186287.8	12987.6	7.0
5	92187.7	93023.3	87567.7	103470.0	94062.2	6715.1	7.1
2.5	42429.3	45315.0	43680.0	51575.0	45749.8	4059.2	8.9
1.25	22044.7	22105.7	21129.7	24980.0	22565.0	1670.7	7.4
0.625	10022.4	10360.3	9410.3	11921.0	10428.5	1069.9	10.3
0.3125	4337.9	4431.8	3888.0	5017.4	4418.8	464.3	10.5

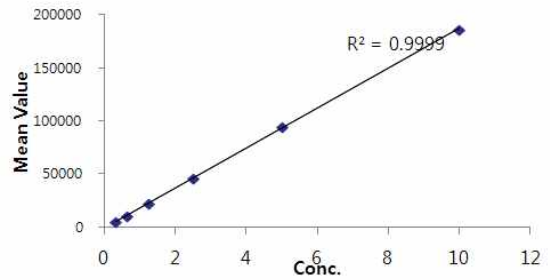


그림 10. ATP standard curve의 작성

2. 시험 결과의 예 - 결과값

Samples	Dilution factors	1st	2nd	3rd	4th
1	1	56001.3	68367.0	21892.7	26219.3
	2	34698.0	36272.3	11229.0	9423.2
	4	14211.0	20244.7	6410.5	6258.6
2	1	35458.7	25593.3	48884.0	32184.0
	2	13433.0	7387.3	12602.7	12532.7
	4	9172.4	4669.7	11828.0	8392.2
3	1	31459.0	59821.3	32307.0	
	2	16444.3	24881.0	9595.9	
	4	8021.8	20441.0	7592.6	
Blank1	1	0.0	0.0	0.0	0.0
Blank2	1	0.0	0.0	0.0	0.0

그림 11. ATP bio-luminescense 측정값

11개의 검체에 대하여 각각 3반복 시험의 평균값을 각 각 나타내었다.

※ 참고문헌

[1] Requirements of Dried BCG vaccine. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 1985 (WHO Technical Report Series, No. 745. Annex 2).

[2] Requirements of Dried BCG vaccine. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 1987 (Ammnments of WHO Technical Report Series, No. 771. Annex 12).

[3] Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccine, WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 2012

[4] Intermational collaboative study to evaluate and establish the 1st WHO Reference Reagent of BCG vaccine of Moreau-RJ sub-strain, WHO Expert Committee on Biological Standardization. Geneva, World Health Organization, 2012

[5] Ho MM, Markey K, Rigsby P, Hockley J, & Corbel MJ. Report of an International collaborative study to establish the first WHO reference reagents for BCG vaccines of three different sub-strains. Vaccine 2011; 29: 512-518.

[6] Jensen SE, Hubrechts P, Klein BM, Haslov KR. Development and validation of an ATP method for rapid estimation of viable units in lyophilised BCG Danish 1331 vaccine. Biologicals 2008; 36: 308-14.

[7] European Pharmacopoeia 7^{th} Edition 2011. BCG vaccine,

freeze-dried. Council of Europe, Strasbourg.

[8] 生物學的製劑基準, 2012, 건조BCG백신 일본 厚生勞働省 第348号.

[9] 생물학적제제기준 및 시험방법 2012. 피내용건조BCG백신 및 경피용건조BCG백신, 식품의약품안전청 고시 제54호.

4. Appendix

4.1 WHO/TB/Technical Guide 77.9: "In vitro Assays of BCG Product"

BCG 백신 확인, 역가시험법 매뉴얼

발 행 처 식품의약품안전평가원

발 행 일 2012년 9월

발 행 인 이광호

편 집 위 원 장 홍성화

편 집 위 원 김병국, 남경탁, 김현국

363-951

충북 청원군 오송읍 오송생명2로 187

오송보건의료행정타운

문 의 처 **식품의약품안전평가원 국가검정센터**

전화: 043-719-5410 ~ 5416

팩스: 043-719-5400

http://www.kfda.go.kr, http://nifds.go.kr