

## PCR 기법을 이용한 *Mycoplasma gallisepticum*의 검출

이영주 · 김기석 · 김종완 · 탁연빈\*

농림부 국립수의과학검역원  
경북대학교 수의과대학\*  
(1998년 5월 2일 접수)

### Detection of *Mycoplasma gallisepticum* using Polymerase Chain Reaction(PCR)

Young-ju Lee, Ki-seuk Kim, Jong-wan Kim, Ryun-bin Tak\*

National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Forest  
College of Veterinary Medicine Kyungpook National University\*

(Received May 2, 1998)

**Abstract** : A species-specific 760 base pair(bp) *Bam*HI to *Eco*RI DNA fragment(fMG-2) of lipoprotein gene was isolated from a *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) genomic library. Based on the DNA sequence data of fMG-2, a pair of 25bp primers was synthesized. When used in the polymerase chain reaction(PCR), 732bp DNA products were amplified from 6 standard strains and 10 field isolates of *M. gallisepticum*, but not from 2 *Mycoplasma synoviae* and 7 other *Mycoplasma species*. The lower detection limit was 100fg of the genomic DNA. Identity of the PCR products was confirmed by comparison of patterns of restriction endonuclease analysis with *Ase*I, *Dra*I, *Eco*RV and *Ssp*I.

**Key words** : *Mycoplasma gallisepticum*, polymerase chain reaction, DNA.

## 서 론

*Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*)은 닭에서 만성 호흡기성 질병(chronic respiratory disease)과 칠면조에서 전염성 부비동염(infectious sinusitis)을 유발하는 주요 원인체로서 전세계적으로 발생되고 있는 세균성 난계대

전염병의 하나이다<sup>1,2</sup>. 특히 닭에 있어서 *M. gallisepticum*의 감염증은 호흡기증상이 주증상이지만 그 외에도 발육불량, 산란율 및 부화율의 감소, 난중감소, 난질의 저하 및 사료효율의 감소 등을 유발할 수 있는 대표적인 가금의 만성 소모성 질병이라 할 수 있다. 또한 바이러스성 호흡기계 질병의 예방목적으로 사용되는 생독백신의 접종시 부작용을 유발할 수 있으며 대장균증이나 전

Address reprint requests to Dr. Young-ju Lee, National Veterinary Research and Quarantine Service, Ministry of Agriculture and Forest, Anyang, Republic of Korea.

염성 기관지염, 뉴캐슬병 등의 원인체와의 복합감염시에도 양계농가에 더욱 심한 피해를 초래할 수 있어 여러 나라에서 이 질병의 박멸을 위해 많은 노력을 경주하고 있는 실정이다.

조류에서 감염되는 *Mycoplasma spp*은 현재 약 20여종이 존재하는 것으로 알려져 있지만<sup>2</sup> 이들 균종중에서 *M gallisepticum* 과 *M synoviae* 가 닭의 가장 주된 병원체로 밝혀져 있다<sup>1,3</sup>. 야외감염계로 부터의 *M gallisepticum* 의 감염을 확인하기 위한 방법으로는 혈청평판응집반응을 이용한 혈청학적 방법이 가장 널리 이용되어 오고 있지만 이 방법의 사용시 단시간내 많은 개체를 검사할 수 있는 장점은 있지만 이에 반하여 일반적인 혈청검사법에서 볼 수 있는 교차반응에 의한 비특이반응으로 인하여 특이성에 있어서 다소의 문제점이 야기되고 있는 것으로 알려져 있다<sup>4-7</sup>. 또한 원인균 동정을 위한 검사법으로서 생화학적인 특성을 이용한 검사법과 표준항혈청을 이용한 간접형광항체법 등이 주로 이용되고 있으나<sup>8</sup> 최소 2~3주간의 장시간이 소요되는 단점으로 신속한 진단이 요구되는 야외농장에서의 직접적인 적용을 위해서는 많은 제약이 뒤따르고 있는 것이 사실이다.

한편 최근들어 *M gallisepticum* 을 보다 신속정확하게 동정하기 위한 방법들로서 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)법<sup>9,10</sup> 등을 이용한 혈청학적 검사법과 DNA probe<sup>11-16</sup>나 PCR 기법<sup>17-22</sup> 등을 이용한 항원의 직접적인 동정법이 외국에서는 이미 많이 개발, 보고되어 왔다. 특히 최근들어 많은 분야에서 적용되고 있는 PCR 기법은 이미 많은 질병 원인체의 동정에 있어 단지 소량의 DNA만으로도 신속하고 특이적으로 표적 병원체를 동정해낼 수 있는 방법으로 잘 알려져 왔다.

따라서 본 연구에서는 *M gallisepticum* 의 신속한 동정을 위하여 PCR primer를 작성하여 진단특이성과 민감성을 시험하였으며 또한 야외분리주 적용시험을 실시하였다.

## 재료 및 방법

시험균주 및 배양 : 시험에 사용한 표준균주는 *M gallisepticum* 6주와 *M synoviae* 2주, 기타 *M iners*, *M glycophilium*, *M gallinaceum*, *M gallinarum*, *M columinum*, *M iowae* 및 *M meleagridis* 각 1주이었으며(Table 1) 야외분리주로는 국립수의과학검역원에서 분리 보관중이던 *M*

Table 1. Standard *Mycoplasma species* and strains utilized in this study

Species	Strains	Origin
<i>M gallisepticum</i>	A5969	Chicken traches
	S6	Turkey brain
	PG31 & X95	Tracheal & airsac tissue of chicken
	L	Vaccine strain
	R(K781)	Vaccine strain
	F(K860)	Vaccine strain
<i>M synoviae</i>	WVU 1853	Chicken trachea
	K870	Vaccine strain
<i>M iners</i>	PG30	Respiratory tract of chicken
<i>M glycophilium</i>	486	Adult chicken oviduct
<i>M gallinaceum</i>	DD	Chicken trachea
<i>M gallinarum</i>	PG16	Respiratory tract of fowl
<i>M columbinum</i>	MMP1	Pigeon trachea
<i>M iowae</i>	695	Turkey embryo
<i>M meleagridis</i>	17529	Turkey sinus

*gallisepticum* 10주를 사용하였다.

중균용 배지의 조제는 Frey의 방법<sup>8</sup>에 준하여 *Mycoplasma* -base에 thallium acetate(0.03%) 및 phenol red(0.002%)를 첨가한 후 121℃에서 15분간 고압멸균하고 여기에 fresh yeast extract(10%), swine serum(12%), glucose(0.3%), penicillin(0.1mg/ml) 및 cystein(0.2%)을 무균적으로 첨가하여 제조하였다. *Mycoplasma* 의 계대시에는 총배지량의 10% 되게 배양액을 접종하였으며 배양액의 pH가 변하면 실험에 사용하였다.

Genomic DNA 추출 : *Mycoplasma spp*에 대한 genomic DNA의 추출은 Silveria *et al*<sup>18</sup>의 방법을 변형하여 실시하였던 바 원심수거한 균체를 TE buffer(10mM Tris-cl, 1mM EDTA, pH 7.4) 1ml, 10%(w/v) sodium dodecyl sulfate 40μl, proteinase K(10mg/ml) 10μl에 부유시켜 37℃에서 2시간 반응시킨 후 phenol : chlorform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 1ml 첨가하여 혼합하였다. 이를 12,000rpm에서 15분간 원심한 뒤 상층액 400μl에 absolute ethanol 800ul와 3M sodium acetate 40μl를 첨가하여 혼합후 -50℃

에 2시간 반응시켰으며 이를 재원심하여 DNA를 침전시킨 후 20 $\mu$ l의 증류수에 풀어 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Primer 제작과 PCR 조건 : *M. gallisepticum* 특이 primer 제작은 lipoprotein을 산생하는 gene에서 *Bam*HI과 *Eco*RI DNA구조를 가지는 760bp의 염기서열을 기초<sup>17</sup>로 하여 최종산물이 732bp가 증폭되게 forward primer 5'-GGA-TCCCATCTCGACCACGAGAAAA-3'와 reverse primer 5'-CTTTCAATCAGTGAGTAA CTGATGA-3'를 DNA 합성기 (abi 392 DNA/RNA synthesiser)를 이용하여 합성하였다.

PCR은 Biorad thermal cycler(Gene cycler<sup>TM</sup>)을 이용하여 최종 volume 50 $\mu$ l양으로 반응하였다. PCR용 tube에 10X PCR buffer(500mM KCl, 100mM Tris-HCl(pH 9.0), 1.0% Triton X-100, Promega) 5 $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> 6 $\mu$ l(3mM/reaction), 10mM dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1 $\mu$ l(각각 200 $\mu$ M/reaction), 100ng forward 및 reverse primer 2 $\mu$ l, Taq polymerase 3 $\mu$ l(1.5 units/reaction), 100ng의 target DNA를 각각 첨가하여 최종량이 50 $\mu$ l가 되도록 증류수를 넣어 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation 시킨 다음 denaturation 94 $^{\circ}$ C 1분, annealing 50 $^{\circ}$ C 1분, elongation 72 $^{\circ}$ C 2분을 35 cycles 수행하고, postelongation을 72 $^{\circ}$ C 3분간 실시하였다. PCR 산물은 ethidium bromide(0.5mg/ml)가 포함된 1.5% agarose에서 전기영동하여 UV lamp 하에서 특이 band를 관찰하였다.

특이성 및 민감성 조사 : PCR 조건이 *M. gallisepticum*에 특이적인지를 알아보기 위하여 Table 1에 제시한 표준주에 대하여 상기의 PCR을 적용하였으며 민감성 검사는 *M. gallisepticum*의 genomic DNA를 DNA calculator (Pharmacia Gene Quant)에서 농도를 측정하여 1ng/ $\mu$ l가 되도록 정량한 후 1ag/ $\mu$ l까지 10진 희석하여 PCR 실시후 특이증폭산물을 확인하였다.

야외분리주에 대한 PCR 적용 : 확립된 PCR 조건을 *M. gallisepticum* 야외분리주 10주에 적용하여 특이증폭산물을 확인하였다.

PCR 증폭산물의 제한효소부위 분석 : PCR 증폭산물이 정확한 부위에서 증폭되었는가를 확인하기 위하여 먼저 GenBank(X64450)를 통하여 732bp의 제한효소 절단 부위를 찾아낸 후 *Ase*I(NEB), *Dra*I(NEB), *Eco*RV(NEB), *Ssp*I(GibcoBRL) enzyme을 PCR 증폭산물과 37 $^{\circ}$ C에서 2시간반응시킨 후 그 양상을 GenBank에서 얻어진 예상절편치와 비교하였다.

## 결 과

*M. gallisepticum* PCR의 특이성을 조사하기 위하여 표준주인 *M. gallisepticum* 6주와 *M. synoviae* 2주, 기타 *M. iners*, *M. glycyphiliium*, *M. gallinaceum*, *M. gallinarum*, *M. columinum*, *M. iowae* 및 *M. meleagridis* 각 1주에 대한 PCR을 실시한 결과 *M. gallisepticum* 표준주에서만 732bp의 특이 band가 관찰되었으며 다른 *Mycoplasma spp*에 대해서는 어떠한 증폭산물도 관찰되지 않아 작성된 primer의 특이성이 확인되었다(Fig 1).

Fig 1. Specific amplification of *M. gallisepticum* DNA by the PCR.

M : DNA size marker(123bp ladder), lane 1: *M. gallisepticum* A5969, 2: *M. gallisepticum* S6, 3: *M. gallisepticum* PG31&X 95, 4: *M. gallisepticum* L, 5: *M. gallisepticum* R, 6: *M. gallisepticum* F, 7: *M. synoviae* wvu1853, 8: *M. synoviae* K870, 9: *M. iners*, 10: *M. glycyphiliium*, 11: *M. gallinaceum*, 12: *M. gallinarum*, 13: *M. columbinum*, 14: *M. iowae*, 15: *M. meleagridis*.

PCR의 민감성을 조사하기 위하여 DNA calculator로 *M. gallisepticum*의 genomic DNA 양을 측정하여 1ng/ $\mu$ l에서 1ag/ $\mu$ l까지 10진 희석하여 PCR을 실시한 결과 100fg의 DNA 농도까지 검출이 가능하였다(Fig 2).

이미 *M. gallisepticum*으로 동정된 야외분리주 10주를 배양한 후 PCR을 실시한 결과 10주 모두에서 *M. gallisepticum* 특이증폭산물을 관찰할 수 있어 *M. gallisepticum* 야외분리주의 진단이 가능함을 알 수 있었다(Fig 3).

PCR 증폭산물이 *Bam*HI과 *Eco*RI DNA 구조를 가지는 760bp중 732bp가 정확하게 증폭된 것인지 알아보기 위하여 제한효소를 반응시킨 결과 *Ase*I에 의해 312bp, 470bp로, *Dra*I에 의해 154bp, 221bp, 357bp로, *Eco*RV에 의해 131bp, 601bp로, *Ssp*I에 의해 106bp, 265bp, 361bp로 절단되어 GenBank에서 나타난 예상절편부위와 일치하는 것

으로 나타나 정확한 부위에서 증폭되었음을 확인할 수 있었다(Fig 4).

## 고 찰

현재까지 알려진 바에 의하면 조류에서 감염을 유발할 수 있는 *Mycoplasma* spp은 약 20여종이 존재하는 것으로 밝혀져 있는데<sup>2,23</sup> 그 중에서도 *M. gallisepticum*은 닭의 만성 호흡기질병을 유발하는 주요 원인균으로 만성 소모성 증상 및 난계대전염으로 인한 피해도 중요하지만 전염성 기관지염이나 뉴캐슬병, 대장균증과 같은 호흡기 질병과의 복합감염으로 인한 병증의 악화와 더불어 생독백신의 접종시 나타나는 부작용 유발로 더욱 많은 피해가 초래되는 만큼 많은 나라에서는 *Mycoplasma*의 청정화를 위한 대책수립의 일환으로 *M. gallisepticum*에 대한 신속하고 정확한 진단과 박멸대책들을 수립해 오고 있다.

*Mycoplasma* 증의 원인체를 동정하기 위한 일반적인 방법은 항원의 증식 후 기본적인 생화학적 검사와 더불어 형광항체법<sup>8</sup> 등이 주로 적용되고 있다. 그러나 이들 방법은 최종적인 확인동정에 이르기까지 최소 2-3주의 장시간이 소요되는 단점이 있으며 또한 이 방법들도 *M. gallisepticum*의 감염초기나 보균닭의 경우에 항생제 처치 등으로 인한 균증식 억제 등으로 인하여 균분리 성적과 혈청검사 성적간에는 상당한 차이가 인정되고 있다. 최근들어 *M. gallisepticum*을 보다 신속하고 민감하게 진단할 수 있는 방법들이 연구되어 왔으며 초기에는 DNA probe을 이용한 *M. gallisepticum* DNA 검출법이 많이 보고되었다<sup>12-16</sup>. 그러나 개발된 *M. gallisepticum* probe 중에는 특이성은 높으나 민감성에서 다소 문제가 제기되고 있으며 이는 probe를 이용하여 검출할 수 있는 *M. gallisepticum* DNA의 최소량이 평균  $10^5 \sim 10^6$  colony forming units 정도에 해당되는 1ng 정도로, 이 정도의 균량은 보통 급성 감염시 나타나는 것으로 알려져 있기 때문이다<sup>13,17</sup>. 따라서 현재에는 probe 법과 더불어 여러 병원체의 동정에 널리 사용되고 있는 PCR 진단법 또한 *Mycoplasma*의 동정을 위해 많이 보고되고 있다<sup>17-22</sup>.

본 실험에 적용된 *M. gallisepticum* PCR에 대한 특이성은 표준균주인 *M. gallisepticum* 6주, *M. synoviae* 2주, 기타 *Mycoplasma* spp 7주를 검색하였을 때 *M. gallisepticum* 6주에서만 특이증폭산물을 확인할 수 있었으며 *M. synoviae*

Fig 2. Sensitivity of the PCR for the detection of *M. gallisepticum* DNA.

M: DNA size marker(123bp ladder), lane 1 to 10, 10 fold dilutions of genomic DNA from 1ng to 1ag.

Fig 3. Detection of *M. gallisepticum* field isolates by PCR.

M: DNA size marker(123bp ladder), lane 1: *M. gallisepticum* A5969, 2 to 11; *M. gallisepticum* field isolates, 12: *Mycoplasma* broth medium.

Fig 4. Electrophoresis pattern of *M. gallisepticum* PCR products digested with restriction enzyme.

M: DNA size marker(123bp ladder), lane 1: PCR products, lane 2: *AseI*, lane 3: *DraI*, lane 4: *EcoRV*, lane 5: *SspI*.

2주와 기타 *Mycoplasma spp* 7주에 대해서는 특이증폭산물을 확인할 수 없었다. 또한 이미 형광항체법 등을 이용하여 *M gallisepticum* 로 동정된 10주의 야의 가검물유래 균주에 대하여 PCR을 적용한 결과 10주 모두에서 특이증폭산물을 확인할 수 있어 본 시험에서 개발된 PCR 진단법을 이용시 *M gallisepticum* 과 다른 *Mycoplasma spp* 와의 감별이 용이한 것으로 확인되어 형광항체법 등을 이용하지 않더라도 특이적으로 *M gallisepticum* 의 동정이 가능함을 알 수 있었다.

Silveira *et al*<sup>18</sup>이 동일한 primers를 사용하여 *M gallisepticum* 에 대한 PCR을 실시하였을 때 PCR의 민감도는 약 1ag의 DNA까지를 검출할 수 있는 것으로 보고하였는 바 이는 한개의 *M gallisepticum* cell에서 추출된 chromosomal DNA에 의해서도 항원진단이 가능한 수준인 것으로 알려져 있다. 그러나 본 시험에서의 민감성은 100fg의 DNA까지 검출할 수 있는 것으로 나타나 성적에 다소 차이를 보였으며 이는 사용하는 PCR 기기의 차이와 더불어 Silveira *et al*<sup>18</sup> 보고한 DNA 추출방법 등에 의해서도 영향을 받는 것으로 사료된다.

PCR 기법을 통한 *Mycoplasma spp*의 동정과 아울러 restriction fragment length polymorphism 기법<sup>19,21,24</sup>을 이용한 *M gallisepticum* strains간의 감별진단 또한 보고되고 있으며 최근에는 arbitrary primers PCR<sup>22</sup>을 이용한 *M gallisepticum* strains의 동정으로 야의 병원성 균주와 백신균주와의 감별이 가능한 것으로 나타나 *M gallisepticum* 의 감염예방을 위해 생독백신을 사용하고 있는 외국의 경우 이 기법을 이용하여 야의 분리주와 백신주를 감별하고 있다.

이 시험에서 적용된 PCR 진단법은 많은 종의 *Mycoplasma spp*중 *M gallisepticum* 의 DNA 만을 동정함으로써 특이성이 인정되어 보다 신속하게 원인체를 진단할 수 있는 유효한 방법으로 생각되며 추후 *M gallisepticum* 의 야의분리주와 백신주를 구별할 수 있는 유효한 시험법 및 *M gallisepticum* 균주간의 감별진단을 위한 시험법 등의 개발이 진행되어야 할 것이라고 생각한다.

## 결 론

조류에서 감염이 가능한 것으로 알려진 20여종의 *Mycoplasma spp*중에서 특히 *M gallisepticum* 만을 특이적으로 동정하기 위한 PCR 진단기법을 확립하여 이 PCR

기법의 민감성 및 특이성을 조사하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. PCR의 특이성을 조사하기 위하여 표준균주인 *M gallisepticum* 6주와 *Mycoplasma synoviae* 2주, 기타 *M iners*, *M glycyphilium*, *M gallinaceum*, *M gallinarum*, *M columinum*, *M iowae* 및 *M meleagridis* 각 1주 대하여 PCR을 실시하였던 결과 *M gallisepticum* 6주에서만 732bp의 위치에서 특이증폭산물을 확인할 수 있었으며 다른 *Mycoplasma* 균종에서는 어떠한 증폭산물도 관찰되지 않았으며 또한 이들 primer는 100fg의 genomic DNA까지 검색이 가능하였다.

2. 야의분리주 *M gallisepticum* 10주에 대하여 이 시험에서 개발된 PCR 기법을 적용하였던 결과 이들 야의분리주 10주 모두에서 732bp 크기에서 특이증폭산물을 확인할 수 있었다.

3. PCR 증폭산물의 정확한 위치를 확인하기 위하여 제한효소 *AseI*, *DraI*, *EcoRV* 및 *SspI*을 처리한 결과 GenBank의 예상절편과 일치함을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

1. Fabricant J, Levin PP. Experimental production of complicated chronic respiratory disease infection. *Avian Dis*, 6:13-23, 1962.
2. Yamamoto R, Bigland CH, Ortmayer HB. Characteristics of *Mycoplasma meleagridis* spp. in : isolated from turkeys. *J Bacteriol*, 90:47-49, 1965.
3. Morrow CJ, Bell IG, Warkham SG, *et al*. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from infectious synovitis chickens. *Aust Vet J*, 67:121-124, 1990.
4. Glisson JR, Dqwe JF, Kleven SH. The effect of oil-emulsion vaccines on the occurrence of nonspecific plate agglutination reactions for *Mycoplasma gallisepticum* and *M synoviae*. *Avian Dis*, 28:397-405, 1984.
5. Yodr HW. Nonspecific reactions to *Mycoplasma* serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. *Avian Dis*, 33:60-68, 1989.
6. Roberts DH. Non-specific agglutination reactions with *Mycoplasma gallisepticum* antigens. *Vet Rec*, 87:125-126, 1970.
7. Harry W. Yoder Jr. Nonspecific reactions to Myco-

- plasma serum plate antigens induced by inactivated poultry disease vaccines. *Avian Dis* , 33:60-68, 1989.
8. Kleven SH, Yoder HW. Mycoplasmaosis. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avina pathogens* , 3rd ed, The American Association of Avian Pathologists Pub, 57-62.
  9. May JD, Branton SL. Identification of *Mycoplasma* Isolates by ELISA. *Avian Dis* , 41:93-96, 1997.
  10. Imada Y, Nonomura I, Furuta K. Indirect immunoperoxidase technique for the assay of antibodies against *Mycoplasma gallisepticum* and *M synoviae* in chicken serum. *Natl Inst Anim Health Q (Jpn)*, 22:16-22, 1982.
  11. Jackwood MW, Head M, Levisohn S, *et al*. Use of species-specific oligonucleotide probes to detect *Mycoplasma gallisepticum* , *M synoviae* , and *M iowae* PCR amplification products. *J Vet Diagn Invest* , 8:56-63, 1996.
  12. Khan MI, Kirkpatrick BC, Yamamoto R. A *Mycoplasma gallisepticum* strain-specific DNA probe. *Avian Dis* , 31:907-909, 1987.
  13. Levisohn S, Hyman H, Perelman D, *et al*. The use of a specific DNA probe for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in field outbreak. *Avian Path* , 18:535-541, 1989.
  14. Kan MI, Kleven SH. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in field samples using a species-specific DNA probe. *Avian Dis* , 37:880-883, 1993.
  15. Geary SJ, Intress R, Gabridge M. Species-specific biotinylated probe for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* . *Mol Cell Probes* , 2:237-244, 1988.
  16. Hyman HC, Levisohn S, Yogev L, *et al*. DNA probes for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* : application in experimentally infected chickens. *Vet Microbiol* , 20:323-337, 1989.
  17. Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, *et al*. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* . *Avian Dis* , 35:62-69, 1991.
  18. Silveira RM, Fiorentin L, Marques EK. Polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma gallisepticum* and *M synoviae* diagnosis. *Avian Dis* , 40:218-222, 1996.
  19. Garcia M, Jackwood MW, Levisohn S, *et al*. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* , *M synoviae* , and *M iowae* by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Avian Dis* , 39:606-616, 1995.
  20. Nascimento ER, Yamamoto R, Khan MI. *Mycoplasma gallisepticum* F-vaccine strain-specific polymerase chain reaction. *Avian Dis* , 37:203-211, 1993.
  21. Lauerman LH, Chilina AR, Closser JA, *et al*. Avian *Mycoplasma* identification using polymerase chain reaction amplicon and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Dis* , 39:804-811, 1995.
  22. Fan HH, Kleven SH, Jackwood MW. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum* . *Avian Dis* , 39:729-735, 1995.
  23. Dierks RE, Newman JA, Pomeroy BS. Characterization of avian *Mycoplasma* . *Ann N Y Acad Sci* , 143:170-189, 1967.
  24. Kleven SH, Morrow CJ, Whithear KG. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis* . 32:731-741, 1988.