

동물용 생 바이러스 백신에서 Mycoplasma 검출을 위한 PCR 기법 적용

전우진 · 김병한* · 정병열 · 안동준 · 이철현 · 장환 · 정갑수
농림부 국립수의과학검역원

동물용 생 바이러스 백신 내에 mycoplasma를 검출하기 위해 polymerase chain reaction (PCR) 기법과 2가지의 상품화된 PCR 검출키트를 평가하였다. PCR 기법은 시험에 사용된 모든 mycoplasma를 특이적으로 검출할 수 있었으나, 2가지의 상품화된 PCR 검출키트는 일부의 mycoplasma를 검출하지 못하였다. 또한, PCR 기법의 검출 특이도는 조류 유래 mycoplasma에 속한 4주의 표준주 및 7주의 야외분리주들 모두 검출할 수 있었다. PCR 기법의 민감도는 9 CFR Mycoplasma 액체배지에서 배양한 *Mycoplasma* 속균 및 *Acholeplasma* 속균에 대해 1~100 colony forming units/ml까지 검출할 수 있었다. 동물용 생 바이러스 백신에 대해 PCR 기법의 적용가능성을 평가하기 위해, 돼지 전염성위장염 및 로타바이러스 혼합백신과 개 파코바이러스 백신내에 *A. laidlawii*를 인공적으로 접종한 후, PCR 기법의 민감도를 조사하였을 때 배양액을 이용한 검출한계와 유사하였다. 본 연구에서 사용된 PCR 기법은 동물용 생 바이러스 백신내의 mycoplasma를 신속하고 민감하게 검출할 수 있을 것으로 판단되었다.

Key words □ mycoplasma detection, PCR, veterinary live viral vaccines

*Mycoplasma*는 Mollicutes 강에 속하며 현재까지 8개 속의 180여종 이상이 존재한다고 알려져 있다(16). Hayflick (10)은 20여종의 *Mycoplasma*속과 *Acholeplasma*속이 세포배양의 주요 오염원이며, 5~35% 이상에 이르는 세포주들이 6종의 mycoplasma (*M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *Acholeplasma laidlawii*)에 주로 오염되어 있다고 보고하였다. 오염의 근원은 초대배양에 사용되는 동물조직, 배양에 사용되는 혈청 또는 실험자 등에 의해서 유발되며, 실험실내 세포주의 교차 오염으로 인해 다른 세포주로 오염이 확산될 수 있다(4, 10, 19). *Mycoplasma*는 세포벽이 있는 세균과는 달리 세포벽이 없어 형태가 쉽게 변하며, 직경이 0.2~2 µm로 작아 세포배양용 배지 여과에 사용되는 0.22~0.45 µm의 멤브레인 필터를 통과할 수 있기 때문에 세포배양용 배지를 통하여 오염될 수 있다(9). 또한, 세포주가 고농도의 mycoplasma에 오염되어 있어도 배지의 혼탁도, pH의 변화, 그리고 세포번성효과 등의 가시적인 변화가 없기 때문에 오염사실이 간과되는 것으로 보고되고 있다(9, 13, 18).

동물용 생 바이러스 백신은 일반적으로 세포주, 초대배양세포, 종란 등을 이용하여 생산하고 있다. 백신 제조과정시 대량의 바이러스 생산과 세균증식 억제 목적으로 항생·항균제가 사용되고 있으며 이로 인해 제조과정 내 무균작업을 요하는 과정을 쉽게 간과하여 mycoplasma의 기회 증식 가능성을 유발할 수도 있다(22). 또한, mycoplasma가 백신제조용 세포주에 오염되면 세포의 증식속도를 저하시키고 동시에 세포형태 및 염색체 변화와 세포핵산 대사이상을 초래함으로써 생 바이러스 백신의 효율을 저하

시킬 수 있으며, 안전성에도 영향을 끼칠 수 있는 것으로 알려져 있다(1, 5, 8, 22). 현재 국가검정동물용 의약품검정기준에 포유동물용 생 백신을 제외한 조류용 생백신에 한하여 세균시험의 일부로서 직접배양법을 이용한 mycoplasma 부정(검출)시험법을 적용하고 있다(3). *Mycoplasma* 오염유무를 확인하기 위한 방법 중 직접배양법은 시간이 많이 소요될 뿐만 아니라, 분리배지의 조성, 시료의 특성 및 배양조건 등 많은 요인에 의해 영향을 받을 수 있는 단점이 있다(2). 따라서, 최근에는 세포주 및 seed virus 내의 mycoplasma 오염을 보다 신속·정확하게 동정하기 위한 방법들로서 DNA fluorochrome 염색법, 효소면역법, 형광염색법, 생화학 검사법, 그리고 DNA probe 기법 등이 보고되고 있다(1, 11, 18, 20). 그러나 이러한 기법들도 결과해석 및 세포배양에서 오염될 수 있는 모든 종류의 mycoplasma 오염을 검출하는 데에는 한계가 있다(18). 현재 가장 신속하고 손쉽게 사용하는 오염 검출방법으로 mycoplasma의 특정 rRNA를 대상으로 한 PCR 기법이 보고되고 있으며, 일부 개발된 키트가 상품화되어 있다(7, 8, 11, 13, 20).

본 연구에서는 동물용 생 바이러스 백신의 안전성 및 품질향상을 위해 Wong-Lee와 Lovett(26)가 언급한 PCR 기법과 2종류의 PCR 키트를 이용해 다양한 종류의 mycoplasma 검출효율을 비교하였으며, mycoplasma 배양액 및 시판백신 내 mycoplasma를 인공적으로 접종한 후 PCR 기법의 검출한계를 비교·조사함으로써 동물용 생 바이러스 백신에 오염된 mycoplasma를 효과적으로 검출하기 위한 PCR 기법의 적용가능성을 평가하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-467-1782, Fax: 82-31-467-1797
E-mail: kimbh@nvrqs.go.kr

재료 및 방법

사용균주 및 배양

Table 1에 나타난 바와 같이 본 연구에 사용된 균주는 11주의 mycoplasma 표준균주, 1주의 mycoplasma 백신주, 7주의 *M. synoviae* 분리주는 미국약전(15)에 등재된 9 CFR Mycoplasma 액체배지에서 37°C, 5% CO₂하에 10일간 증균하였다. 배양물의 증균 농도를 확인하기 위하여 새로운 배지로 10진 희석하여 각 희석단계별 배양물 100 µl를 9 CFR Mycoplasma 한천배지 3 plates에 접종한 다음 동일조건에서 5일 배양한 후 균증식성을 위상차현미경하에서 colony forming unit (cfu) 단위로 계수한 다음 평균치를 산출하였다. 8주의 세균은 각각의 권장배지에서 배양하여 실험에 사용하였다.

Genomic DNA 추출

Genomic DNA 추출은 Sasaki 등(17)의 방법을 이용하였다. 즉, template DNA 용액은 mycoplasma 배양액 1 ml를 12,000 × g에 30분 원심분리한 다음 상층액을 제거한 후 25 µl lysis buffer [10

mM Tris-HCl (pH 8.3), 100 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1% Tween 20, 1% Triton X-100, proteinase K (120 µg/ml)]을 첨가하여 60°C, 60분간 반응시켰다. 다시 100°C, 10분동안 반응시킨 다음 얼음에 5분간 방치하였다. 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 template DNA로 사용하였다.

일반 세균은 PBS를 이용하여 세척한 다음, Qiamp Tissue Kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다.

PCR 반응 조건

Mycoplasma universal primers 및 2종류의 시판 검출키트의 mycoplasma 검출 유효성을 비교조사하기 위하여 8주의 mycoplasma 표준주, 1주의 *M. gallisepticum* 백신주(ts-11), 그리고 8주의 세균을 이용하여 실시하였다. 또한, mycoplasma universal primers의 조류유래 mycoplasma 검출 유효성조사는 조류유래 mycoplasma 표준주 4주 및 *M. synoviae* 분리주 7주를 이용하여 추가로 실시하였다.

Mycoplasma universal primers는 유전자 변이가 거의 없는 것으로 알려진 16S rRNA 유전자를 기초로 하여 464 bp의 PCR 산물이 증폭되도록 고안된 Wong-Lee와 Lovett (25)의 방법에 준하여 작성하였으며, 반응조건에서 전술한 연구자들이 PCR의 각 반응온도(94, 60, 72°C)에서 매 cycle 마다 ramp time을 1초씩 설정하였으나 본 실험에서는 ramp time을 설정하지 않았다(Table 2). PCR 반응액은 2 µl의 10 × PCR buffer(MgCl₂ 첨가, 20 mM), 1 µl dNTP(10 mM), 각각 1 µl의 universal primer A와 B(10pM/µl), 0.1 µl Taq DNA polymerase(5U/µl), 2 µl sample DNA를 혼합한 후 최종 반응량이 20 µl가 되도록 멸균 증류수를 첨가하였으며 DNA thermal cycler(GeneAmp PCR system 9600, Perkin-Elmer, USA)를 이용하여 Table 2와 같이 반응을 실시하였다. 그 외 시판 검출키트인 PCR Mycoplasma detection kit(Takara Bio inc., Japan)와 Mycoplasma PCR ELISA kit(Roche, Germany)는 제조사의 권장 사용술식에 준하여 시험에 이용하였다. 단, 본 실험은 PCR기법간 mycoplasma 검출특이성 비교를 목적으로 하여 R사의 Mycoplasma PCR ELISA kit중 제조사의 lysis reagent와 PCR premix만을 이용하였다. PCR 증폭산물은 ethidium bromide (0.5 µg/ml)이 첨가된 1.5 % agarose gel에서 전기영동한 후 UV transilluminator에서 특이 band를 관찰하였다.

PCR 기법의 특이도 조사

Universal primers, R사 및 T사 PCR 키트를 이용한 각각의 PCR 반응의 특이성을 조사하기 위하여 양성 대조로 *M. orale*를 사용하였으며, 가축에 흔히 감염되는 8주의 세균배양액에 대하여 앞에서 언급한 PCR 반응조건으로 PCR을 실시하여 각각의 PCR

Table 1. List of bacterial and Mycoplasma species used in this study

Species	Source
<i>M. bovis</i>	ATCC ^A 25025
<i>M. flocculare</i>	ATCC 27399
<i>M. gallisepticum</i>	ATCC 19610
<i>M. gallisepticum</i>	ATCC 15302
<i>M. gallisepticum</i>	ts-11 ^B
<i>M. hyorhinis</i>	ATCC 25021
<i>M. hyopneumoniae</i>	ATCC 25934
<i>M. orale</i>	ATCC 15539
<i>M. synoviae</i>	WVU 1853
<i>M. iowae</i>	ATCC 33552
<i>M. gallinaceum</i>	ATCC 33550
<i>A. laidlawii</i>	ATCC 31166
<i>M. synoviae</i> (7 isolates)	Field isolates, NVRQS ^C
<i>Staphylococcus aureus</i>	Field isolate, NVRQS
<i>Escherichia coli</i>	Field isolate, NVRQS
<i>Pasteurella multocida</i>	Field isolate, NVRQS
<i>Salmonella pullorum</i>	Field isolate, NVRQS
<i>Salmonella gallinarum</i>	Field isolate, NVRQS
<i>Salmonella enteritidis</i>	Field isolate, NVRQS
<i>Rimerella anatipestifer</i>	Field isolate, NVRQS
<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	Field isolate, NVRQS

^AATCC, American Type Culture Collection.

^Bts-11, Mycoplasma gallisepticum (MG) live vaccine strain.

^CNVRQS, National Veterinary Research and Quarantine Service.

Table 2. PCR conditions for detection of mycoplasma DNA by using universal primers

Primers	Nucleotide sequence(5' → 3')	Reaction condition			
		Denaturation	Annealing	Extension	Cycles
A	GGC GAA TGG GTG AGT AAC ACG	94°C, 1min	60°, 1min	72°, 5min	30
B	CGG ATA ACG CTT GCG ACC TAT G				

반응의 특이성을 조사하였다.

PCR 기법의 민감도 조사

민감도를 조사하기 위하여 4주의 mycoplasma 표준주를 이용하여 universal primers로 PCR을 실시하였다. 4개의 표준주를 10 일간 배양한 후, 9 CFR Mycoplasma 액체배지로 10진 희석한 다음, 계수를 위해 각 희석단계별 배양물 100 µl를 9 CFR Mycoplasma 한천배지에 접종하였으며, PCR 실시를 위해 각 희석단계별 배양물 1 ml를 사용하였다.

동물용 생 바이러스 백신에 대한 PCR 기법의 민감도 조사

인공 배양한 mycoplasma를 이용한 PCR 민감도 결과를 근거로 시판 백신에 대하여 적용 가능한 PCR 기법의 민감도를 조사하기 위해 배양한 mycoplasma를 시판되는 동물용 생 바이러스 백신에 접종한 후 검출한계를 비교조사 하였다. 돼지 전염성 위장염 및 로타바이러스 생 혼합 건조백신과 개 파보바이러스 생 건조백신을 각각 희석액으로 용해한 후 *A. laidlawii* 배양액($10^{6.0}$ cfu/ml)을 첨가한 다음 10진희석하여 37°C에서 20시간 배양하고 증식된 집락을 계수한 후 PCR 기법의 검출한계를 비교 조사하였다.

결 과

각각의 PCR 조건에 따른 포유동물 유래 mycoplasma 검출

9주의 mycoplasma에 대하여 universal primers와 시판 검출 키트(T사, R사)간의 검출 유효성을 비교조사 하였다. Universal primers의 경우, *A. laidlawii*, *M. orale*, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M.*

flocculare 및 음성대조군에 대해 PCR을 실시한 결과, 음성대조군을 제외한 모든 mycoplasma에 대하여 464 bp의 특이 band가 관찰되었다(Fig. 1). 반면에 시판 검출키트인 R사의 키트를 사용하여 검출 유효성 조사를 실시한 결과 음성대조군, *M. synoviae* 및 *M. flocculare*를 제외한 모든 mycoplasma에 대하여 약 550 bp의 특이 band가 관찰되었다. 그리고 T사 키트를 사용한 경우 *A. laidlawii*를 제외한 모든 mycoplasma를 검출할 수 있었으며, 증폭산물의 크기는 군중에 따라 *M. orale*는 423 bp, *M. hyopneumoniae*는 681 bp, *M. hyorhinis*는 448 bp, 양성대조군은 810 bp 산물이 관찰되었다. 또한, 제조사의 사용설명서에 언급되지 않은 균주에 대한 검출능을 조사한바 *M. gallisepticum*과 백신주인 ts-11는 약 850 bp, *M. synoviae*와 *M. bovis*는 약 510bp, *M. flocculare*는 약 590 bp 크기의 다양한 유전자 증폭산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1).

Universal primers를 이용한 조류 유래 mycoplasma 검출

조류 유래의 mycoplasma에 대해 universal primers의 검출가능성을 추가로 조사한 바, 4주의 mycoplasma 표준주 및 7주의 *M. synoviae* 분리주에서 모두 464 bp의 특이 band가 관찰되었다(Fig. 2).

각각의 PCR 조건에 따른 mycoplasma 검출 특이도

Mycoplasma 속군이 아닌 *S. aureus* 등 일반세균 8주에 대하여 universal primers와 시판 검출 키트인 T사 및 R사의 검출특이성을 비교·조사한 결과, 사용한 모든 PCR 기법에서 양성 대조군인 *M. orale*를 제외하고 공시한 일반세균들에 대해서는 DNA 증폭산물이 관찰되지 않아 각각의 PCR 검출기법의 특이성이 인정되었다(Fig. 3).

PCR 기법의 mycoplasma 검출 민감도

Universal primers를 이용한 PCR 기법으로 *A. laidlawii* 등 총 4주의 Mycoplasma속군의 PCR 검출한계를 조사한바, *A. laidlawii*와 *M. bovis*는 $10^{2.5}$ cfu/ml, *M. orale*는 $10^{0.3}$ cfu/ml, *M. gallisepticum*은 $10^{0.1}$ cfu/ml로 균주에 따라 각각의 민감도가 상이한 것으로 확인되었으나 약 1~100 cfu/ml의 농도에서 mycoplasma 검출이 가능함을 확인하였다(Fig. 4).

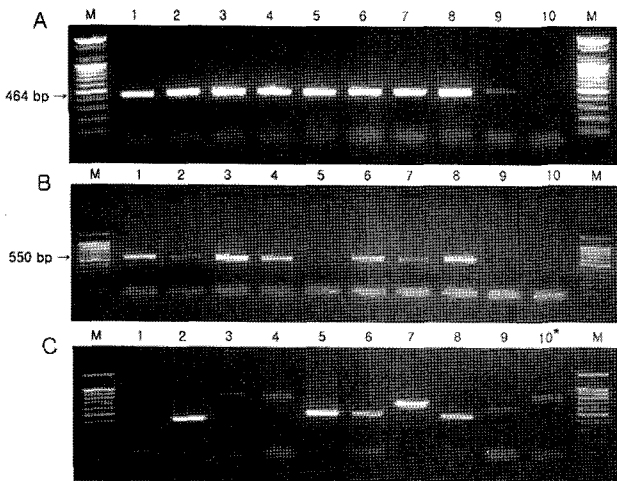


Fig. 1. Detection of *Mycoplasma* spp. by PCR using universal primers(A), R company's kit(B), and T company's kit(C). Lane M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Korea). Lane 1, *A. laidlawii*; lane 2, *M. orale*; lane 3, *M. gallisepticum*; lane 4, *M. gallisepticum* (vaccine strain, ts-11); lane 5, *M. synoviae*; lane 6, *M. bovis*; lane 7, *M. hyopneumoniae*; lane 8, *M. hyorhinis*; lane 9, *M. flocculare*; lane 10, mock; lane 10*, positive control template of T company's kit.

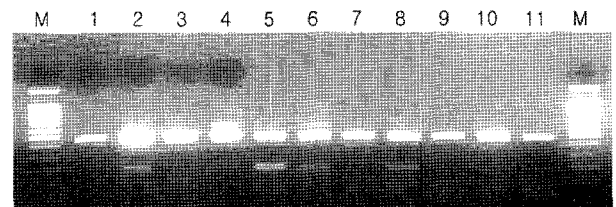


Fig. 2. Detection of avian *Mycoplasma* spp. by PCR using universal primers. Lane M, 100bp DNA ladder (Bioneer, Korea); lane 1, *M. gallisepticum*; lane 2, *M. synoviae*; lane 3, *M. iowae*; lane 4, *M. gallinaceum*; lane 5 to 11, *M. synoviae* isolates.

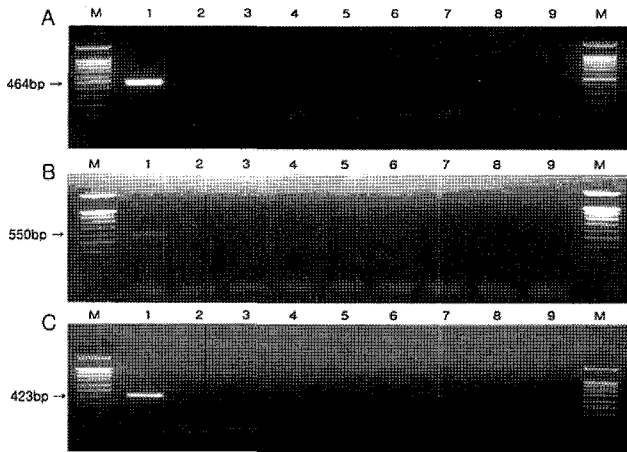


Fig. 3. Specificity of PCR using universal primers (A), R company's kit (B), and T company's kit (C). Lane M, 100 bp DNA ladder; lane 1, *M. orale*; lane 2, *Staphylococcus aureus*; lane 3, *Escherichia coli*; lane 4, *Pasteurella multocida*; lane 5, *Salmonella pullorum*; lane 6, *S. gallinarum*; lane 7, *S. enteritidis*; lane 8, *Rimerella anatipestifer*; lane 9, *Ornithobacterium rhinotracheale*.

동물용 생 바이러스 백신 내의 mycoplasma 오염검출

동물용 생 바이러스 백신인 돼지 전염성 위장염 및 로타 바이러스 생 혼합 건조백신과 개 파보바이러스 생 건조백신에 대하여 PCR 기법의 적용가능성 및 그 민감도를 확인하기 위하여, *A. laidlawii*의 배양액을 각각의 백신에 접종하여 10진 희석한 후 20시간 배양한 결과, 배양균의 최종농도는 $10^{6.1}$ (1.3×10^6)cfu/ml로 확인되었고, PCR 기법의 검출한계는 돼지 전염성 위장염 및 로타 바이러스생 혼합 건조백신의 경우 $10^{1.1}$ (1.3×10^1)cfu/ml, 개 파보바이러스 생 건조백신의 경우 $10^{2.1}$ (1.3×10^2)cfu/ml로 조사되어, 동물용 생 백신내의 mycoplasma 오염 검출한계는 약 10~100 cfu/ml로 균 배양액에 대한 검출한계와 유사한 민감도가 확인되었다(Fig. 5).

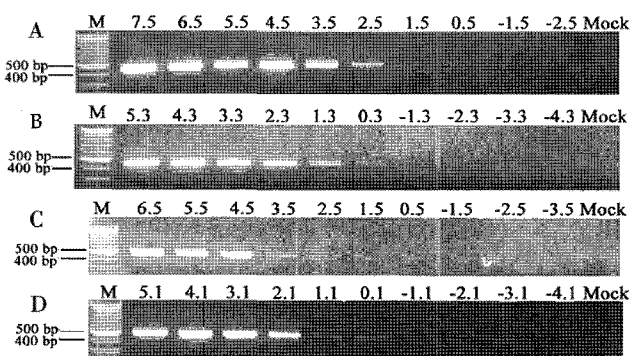


Fig. 4. Sensitivity of the PCR assay for the detection of *A. laidlawii*(A), *M. orale*(B), *M. bovis*(C), and *M. gallisepticum*(D) using universal primers. The numbers of organisms in a assay were indicated over the panels(in log cfu/ml). Lane M, 100 bp DNA ladder.

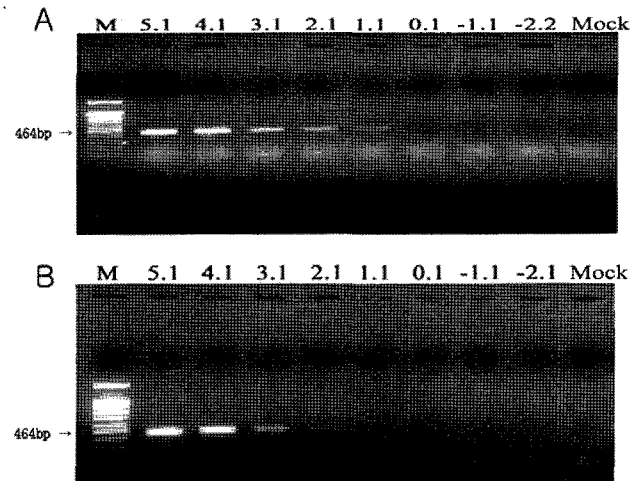


Fig. 5. Sensitivity of the PCR for detection of mycoplasma spiked into the vaccine. *A. laidlawii* ($10^{6.0}$ cfu/ml) was artificially inoculated into swine transmissible gastroenteritis-rotavirus combined vaccine (A) and canine parvovirus vaccine (B). Decimal dilutions of the mixture were incubated for 20 hr and then were amplified by the PCR. The numbers of organisms in the PCR assay were indicated on both upper and lower panels (in log cfu/ml). Lane M, 100 bp DNA ladder.

고찰

각종 세포배양 등에 오염된 mycoplasma를 검출하기 위한 많은 PCR 기법 및 시판키트가 개발되어 실용화되고 있다(8, 11, 12, 13, 17, 18, 20, 21, 26). 본 연구에서는 시판되는 2종의 mycoplasma 검출키트와 mycoplasma 검출 특이성과 민감도가 높다고 알려져 있는 Wong-Lee와 Lovett (26)의 universal primers를 자체 제작하여 PCR 반응조건을 일부 변경한 후, 각종 mycoplasma 및 세균들에 대한 PCR 검출특이성을 비교·평가하였다. 또한, 동물용 생 바이러스 백신의 안전성 및 품질향상을 위해 universal primers를 이용한 동물용 생 바이러스 백신에 대한 PCR 검사법의 적용 가능성을 평가하였다. 기존의 연구자들에 의하면 universal primers는 16S rRNA 유전자를 근거로 하여 세포배양내 주된 오염균인 *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. pirium*, *A. laidlawii*, *Spiroplasma mirum* 등을 특이적으로 검출하는 것으로 알려져 있으며 다른 세균이나 효모 등과는 교차반응이 일어나지 않도록 설계되었다고 보고하고 있다(26). 본 시험에서는 기존 연구자들이 보고한 균주 이외에 송아지에서 만성폐렴을 야기하는 *M. bovis*, 돼지에서 유행성 폐렴을 일으킨다고 알려진 *M. hyopneumoniae*, 돼지의 호흡기계에 흔하게 존재하며, 비병원성인 *M. flocculare*, 닭에서 만성 호흡기성 질병을 야기하는 *M. gallisepticum*과 닭에서 호흡기 질병 및 관절염을 야기하는 *M. synoviae*을 대상으로 universal primers의 검출특이성을 조사한 바 사용균주 모두에서 특이증폭산물을 확인되어 광범위한 mycoplasma를 검출하기 위해 충분히 사용가능할 것으로 판단되었다. 또한, 기존 연구보고에서 적용한 적이 없는 조류유래의 *M.*

iowae 및 *M. gallinaceum*과 국내분리주인 *M. synoviae* 7주에 대하여 PCR 기법을 적용한 결과, 시험균주 모두에서 특이증폭산물을 확인할 수 있어, 조류 병성감정 시료, 사육환경, 조류 백신 등에서 mycoplasma 감염 또는 오염유무를 1차적으로 확인 가능함을 알 수 있었다. Mycoplasma 종에 따라 염기서열 및 그 크기에 차이가 있는 것으로 알려진 16S~23S rRNA spacer 부위를 증폭시켜 각각의 균종에 따라 다양한 크기의 증폭산물이 검출되게 하여 각각의 mycoplasma 균주를 PCR 증폭산물의 크기로 동정할 수 있도록 제작한 T사의 키트를 사용하여 8주의 mycoplasma 표준주 및 백신주를 검사하였을 때, 제조사의 사용설명서에 언급되지 않은 *A. laidlawii*을 제외하고 7주에서 약 420 bp에서 850 bp 사이의 다양한 크기의 증폭산물들을 확인할 수 있었다. PCR 증폭산물을 biotin-labeled capture probe로 hybridization시켜 효소면역법으로 mycoplasma 오염유무를 확인하는 R사 키트의 경우, 제조사의 사용설명서에 언급되지 않은 *M. synoviae* 및 *M. flocculare*에 대해서는 증폭산물을 확인할 수 없었다. 한편, 본 실험에서는 PCR 기법에 의한 mycoplasma 검출특이성 조사에 중점을 두어 시험을 수행하였기 때문에 PCR에서 검출되지 않은 2주의 mycoplasma가 효소면역법(ELISA)에서 추가 검출될 가능성은 조사하지 못하였으므로, 키트 내 primers의 검출특이성 문제로 단정지을 수 없어 앞으로 다양한 mycoplasma 균주에 대하여 상기 키트의 효소항체법에 의한 분석 및 PCR 증폭산물의 염기서열 분석에 대한 조사가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

최근 Eldering 등(7)의 보고에 의하면 mycoplasma와 계통학적으로 유사한 *B. subtilis* 등 7주의 그람양성균에 대해 universal primers로 PCR을 실시하였을 경우, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. bovis*, *C. sporogenes*, *M. luteus*, *C. pseudodiphtheriticum*에서 430~464 bp의 증폭산물이 확인되어, 교차반응성이 있음을 보고하고 있다. 본 연구에서는 그람양성인 *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Streptococcus gallolyticus* (ATCC 9809), *Clostridium difficile* (ATCC 9689)과 그람음성균인 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), 효모균인 *Candida albicans* (ATCC 90028)를 추가로 공시하여 시험한 결과, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *C. difficile*에서 400~500 bp사이의 다양한 크기의 PCR 증폭산물들이 관찰되어 교차반응성이 일부 있음이 확인되어 Eldering 등(7)의 성적과 유사함을 알 수 있었다(data not shown). 그러나, 현행 동물용백신의 국가검정기준에서 모든 생 바이러스 백신은 mycoplasma 배양을 위한 특수배지가 아닌 일반세균배양용 배지를 이용한 무균(세균)시험을 실시하므로 균의 증식에 의한 배지의 탁도 및 균동정 시험 등의 방법으로 PCR에서 비특이적으로 검출되는 그람양성균에 대한 교차반응성을 배제할 수 있을 것으로 생각되며, 추가로 PCR 증폭산물에 대한 염기서열 분석을 병행하여 실시한다면 쉽게 균종을 동정할 수 있어 특이성에 대한 문제점이 개선되리라 생각된다.

일반적으로 세포배양에 오염된 mycoplasma 검출 PCR 기법의 민감도는 10^4 cfu/ml의 검출한계를 보인다고 알려져 왔으나(18,

20, 23), 최근에는 DNA 추출방법(17), nested PCR법(20), hot-start *Taq* DNA polymerase과 Touch-down PCR법의 사용(7), PCR 조건의 재설정(21, 24) 등의 개선을 통하여 미국(15) 및 유럽약전(6)에 언급된 생 바이러스 백신에 대한 직접배양법의 검출한계인 1~100 cfu/ml과 유사한 민감도를 보인다고 보고하고 있다. 특히 Wirth 등(25)은 16S rRNA 유전자의 변이가 적은 부분에 대한 primers를 작성한 후 nested PCR을 수행하였을 때 1-2 genome copy에 해당하는 1 fg의 Mycoplasma DNA를 검출할 수 있음을 보고하였다. 한편, Sasaki(17) 등은 동일한 lysis buffer를 사용하여 인체용 생 백신에 인공적으로 첨가시킨 *M. hominis*에 대한 PCR을 실시하였을 때 민감도가 300 cfu/ml로 보고하여, 본 시험에서 4주의 mycoplasma 배양액을 직접 사용한 경우 및 2종의 생 건조백신에 *A. laidlawii* 배양액을 접종하여 20시간 배양한 후 시험한 PCR의 민감도를 비교 조사한바 두 가지 방법 모두 10~100 cfu/ml의 검출한계를 나타내어 기존의 연구 결과와 유사한 민감도를 확인하였다. 그러나, Kojima(14) 등은 *M. gallisepticum*의 성장곡선을 근거하여 동물용 생 바이러스 백신에 *M. gallisepticum* 배양액을 첨가한 후 7일간 배양하여 PCR을 실시한 결과, $10^{0.2}$ (1.6)cfu까지 검출한 것으로 보고하여 본 시험의 mycoplasma 검출 민감도가 다소 떨어지는 것으로 나타났으나 대체적으로 기존에 발표된 연구결과들과 비교해 볼 때 비교적 양호한 성적으로 생각되었다. 이러한 mycoplasma 균종에 따른 PCR 검출기법의 민감도가 상이하게 나타나는 이유로는 표준검사법으로 사용하는 cfu/ml 산정방법이 균 증식에 사용한 배지의 종류, 배양 조건, 균의 증식단계 및 균의 생존 유무 등에 따라 민감도가 다르게 나타날 수 있을 것으로 추정된다. 그리고 1개월 이상의 많은 시간이 요구되는 직접배양법에 사용되는 배양액을 배양시간대 별로 시료를 채취하여 PCR 기법과 병행한다면 보다 민감하고 정확하게 mycoplasma의 오염유무를 검사할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구의 결과를 통하여 종합하여 볼 때 universal primers를 이용한 PCR 기법은 광범위한 mycoplasma 검출능 및 높은 민감도를 나타내어 동물용 생 바이러스백신내 mycoplasma 오염유무를 신속·정확하게 검출할 수 있는 1차 스크리닝 기법으로 활용 가능할 것으로 판단되었다.

참고문헌

1. 장명웅, 김광혁. 1993. 배양 세포주에서 Mycoplasmas의 오염검색. *대한미생물학회지* 28, 209-221.
2. 전우진, 김병한, 정병열, 안동준, 이철현, 박수제, 주이석, 정갑수. 2004. 동물용 생물학적제제 및 세포배양에서 Mollicutes의 신속배양을 위한 배지의 선발. *한국마이크로플라스마학회지* 15, 28-34.
3. 한국동물약품협회. 1995. 국가검정동물용의약품검정기준. 1-9-18-06.
4. Barile, M.F., H.E. Hopps., M.W. Grabowski., D.B. Riggs, and R.A. DelGiudice. 1974. The identification and sources of mycoplasmas isolated from contaminated cell culture. *Ann. NY. Acad. Sci.* 225, 251-264.

5. Benton, W.J., M.S. Cover, and F.W. Melchior. 1967. *Mycoplasma gallisepticum* in a commercial laryngotracheitis vaccine. *Avian Dis.* 11, 426-429.
6. Druckerei, C.H.B. 2002. *Mycoplasmas*, p.128-131. European Pharmacopoeia, 4th ed. Strasbourg press, Germany.
7. Eldering, J.A., C. Felten., C.A. Veilleux, and B.J. Potts. 2004. Development of a PCR method for mycoplasma testing of Chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. *Biologicals* 32, 183-193.
8. Harasawa, R., H. Mizusawa., K. Nozawa., T. Nakagawa., K. Asada, and I. Kato. 1993. Detection and tentative identification of dominant *Mycoplasma* species in cell cultures by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer regions. *Res. Microbiol.* 144, 489-493.
9. Hay, R.J., M.L. Macy, and T.R. Chen. 1989. Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature.* 339, 487-488.
10. Hayflick, L. 1965. Tissue cultures and mycoplasmas. *Tex. Rep. Biol. Med.* 23, 285-303.
11. Hopert, A., C.C. Uphoff., M. Wirth., H. Hauser, and H.G. Drexler. 1993. Specificity and sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in comparison with other methods for the detection of mycoplasma contamination in cell lines. *J. Immunol. Methods.* 164, 91-100.
12. Hu, M., C. Buck., D. Jacobs., G. Paulino, and H. Khouri. 1995. Application of PCR for detection and identification of mycoplasma contamination in virus stocks. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31, 710-715.
13. Kobayashi, H., K. Yamamoto., M. Eguchi., M. Kubo., S. Nakagami., S. Wakisaka., M. Kaizuka, and H. Ishii. 1995. Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 769-771.
14. Kojima, A., T. Takahashi., M. Kijima., Y. Ogikubo., M. Nishimura., S. Nishimura., R. Harasawa, and Y. Tamura. 1997. Detection of mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Biologicals.* 25, 365-371.
15. Raymond, A.M. 2002. Detection of mycoplasma contamination, p. 599-600. Code of Federal Regulations title 9, U.S. Government Printing Office Press, Washington.
16. Razin, S., D. Yogevev, and Y. Naot. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1094-1156.
17. Sasaki, T., R. Harasawa., M. Shintani., H. Fujiwara., Y. Sasaki., A. Horino., T. Kenri., K. Asada., I. Kato, and F. Chino. 1996. Application of PCR for detection of mycoplasma DNA and pestivirus RNA in human live viral vaccines. *Biologicals.* 24, 371-375.
18. Spaepen, M., A.F. Angulo., P. Marynen, and J.J. Cassiman. 1992. Detection of bacterial and mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 89-94.
19. Stipkovits, L., L. Bodon., J. Romvary, and L. Varge. 1975. Direct isolation of mycoplasmas and achleplasmas from sera and kidneys of calves. *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 22, 45-51.
20. Tang, J., M. Hu., S. Lee, and R. Roblin. 2000. A polymerase chain reaction based method for detecting *Mycoplasma/Acholeplasma* contaminants in cell culture. *J. Microbiol. Method.* 39, 121-126.
21. Teyssou, R., F. Poutiers., C. Saillard., O. Grau., F. Laigret., J.M. Bove, and C. Bebear. 1993. Detection of mollicute contamination in cell cultures by 16S rDNA amplification. *Mol. Cell. Probes.* 7, 209-216.
22. Thornton, D.H. 1986. A survey of mycoplasma detection in veterinary vaccines. *Vaccine* 4, 237-240.
23. Toji, L.H., T.C. Lenchitz., V.A. Kwiatkowski., J.A. Sarama, and R.A. Mulivor. 1998. Validation of routine mycoplasma testing by PCR. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 34, 356-358.
24. Uphoff, C.C. and H.G. Drexler. 2002. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 38, 79-85.
25. Wirth, M., E. Berthold., M. Grashoff., H. Pfutzner., U. Schubert, and H. Hauser. 1994. Detection of mycoplasma contaminations by the polymerase chain reaction. *Cytotechnology* 16, 67-77.
26. Wong-Lee, J.G. and M. Lovett. 1993. Rapid and sensitive PCR method for identification of *Mycoplasma* species in tissue culture, p. 257-260. In Persing D.H., T.F. Smith, F.C. Tenover, and T.J. White (eds.), *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

(Received October 17, 2005/Accepted November 24, 2005)

ABSTRACT : Application of a PCR Method for the Detection of Mycoplasma in Veterinary Live Viral Vaccines
Woo-Jin Jeon, Byoung-Han Kim*, Byeong-Yeal Jung, Dong-Jun An, Chul-Hyun Yi,
Hwan Jang, and Gab-Soo Chung (National Veterinary Research and Quarantine Service,
 Ministry of Agriculture and Forestry, Anyang 430-824, Korea)

We evaluated the PCR assay and two commercialized PCR kits for the detection of mycoplasma in veterinary viral live vaccines. The PCR assay could specifically detect all the tested *Mycoplasma* spp. and *Acholeplasma* spp., whereas two commercialized PCR kits did not. Also, the specificity of the PCR assay showed that 4 reference strains and 7 field isolates belonging to avian mycoplasma species could be all detected. The sensitivity of the PCR assay was determined using pure cultured *Mycoplasma* spp. and *Acholeplasma* spp. with a range of 1 to 100 colony forming units/ml in 9 CFR Mycoplasma broth. To test the availability of the PCR assay for veterinary live viral vaccines, *A. laidlawii* was artificially inoculated into the swine transmissible gastroenteritis-rotavirus combined vaccine and canine parvovirus vaccine, respectively and the sensitivity of the PCR assay was similar with the result of cultured samples. In this study, the PCR assays could be used as rapid and sensitive methods for the detection of mycoplasma in veterinary live viral vaccines.