

도축돈의 마이코플라즈마성 폐렴에 관한 연구 2. 폐조직에서의 균분리와 nested-PCR방법에 의한 동정

임영택, 석호봉*

단국대학교 생명자원과학부 동물자원 전공
(게재승인 : 2002년 4월 24일)

Studies on the mycoplasmal pneumonia in slaughter pigs. 2. Isolation of mycoplasmas from lung tissues and identification of isolates by nested-PCR technique

Young-Taek Lim, Ho-Bong Seok*

Department of Animal Science, College of Life Sciences, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea
(Accepted : April 24, 2002)

Abstract : We report that mycoplasma organisms from lung tissues of slaughter pigs were identified to genes fragments with references use of nested-PCR technique(nPCR). Seven strains of mycoplasma species were isolated from 70 lung tissues. The organisms were detected by in vitro amplification of 16S rRNA and 23S rRNA genes. Nucleotide sequences of the spacer between 16S and 23S in the ribosomal RNA operons of mycoplasma were identified by the analysis of products from the nested PCR. Four common PCR primers, MhF1, MhF2 MhR1 and MhR2, were designed by analysis between these sequences by first amplified with F1, R1 and second with F2, R2, respectively. Specific amplification of the spacer region for reference strains of *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinitis*, *M. flocculare* were confirmed by first round of PCR in which the produced fragments of 690bp, 460bp, 630bp. But amplications of second round was changed to 240bp, 210bp, 230bp, respectively. Three different strains (*M. hyopneumoniae*:4, *M. hyorhinitis*:2, *M. flocculare*:1) were detected by the nested-PCR technique. The results suggest that the detection of swine mycoplasma by n-PCR can be analyzed the nucleotide sequences between rRNA operons and homology study.

Key word : mycoplasmal pneumonia, slaughter pigs, Mycoplasma species, lung tissues, nested-PCR

서 론

*Mycoplasma hyopneumoniae*는 돼지 mycoplasmal pneumoniae (MPS) 또는 swine enzootic pneumoniae (SEP)의 원 인체로서 돼지를 생산하는 거의 모든 나라에서 문제가 되고 있다.^{1,2}

돼지에 문제되는 마이코플라즈마균종은 *M. hyopneumoniae*

이외에도 *M. hyorhinitis*, *M. hyosynoviae*, *M. flocculare* 등 3 종이 중요하며 *M. hyopneumoniae*는 돼지의 enzootic pneumonia의 1차 병원균으로 육성돈의 폐장에 특이병변을 나타내며 현재 백신주사로 효과적인 예방을 하고 있지만 근절시키지 못하고 있다. *M. hyorhinitis*균은 비루접촉에 의하여 모돈에서 자돈에 전파되며 몇몇균주에 의해 장막염과 관절염 등 경미한 임상증상을 보이며 *M.*

이 연구는 2000학년도 단국대학교 대학연구비의 지원으로 연구되었음.

* Corresponding author : Dr. Ho-Bong Seok, Department of Animal Sciences, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea
Phone : +82-41-550-3654, Fax : +82-41-553-1618 (E-mail : hobong@dankook.ac.kr)

*hyosynoviae*는 편도선에 존재하면서 자돈이 어느정도 자란 후에 관절부위의 증상을 나타내고 *M. flocculare*는 정상 비정상 비강이나 폐장에 존재하면서 enzootic pneumonia와 유사한 증상을 나타내거나 나타내지 않을 수도 있다.² 그러나 국내 돼지에서 마이코플라스마균종에 대한 연구는 *M. hyopneumoniae*에 치중하고 있고 경미한 증상을 나타내는 다른 균체에 대한 분리동정은 미진하며 기존 진단방법으로는 균 교차반응에 의해 감별진단이 쉽지 않았다.

현재까지 알려진 마이코플라스마균의 진단방법으로는 1) 육안적 폐병변 검사 및 조직 이용법, 2) 배양법, 3) 혈청학적 진단, 4) PCR법이 있다. 마이코플라스마성 폐렴에 감염된 경우, 폐의 심엽과 첨엽의 끝부분에 plum color의 특징적인 병변 부위를 쉽게 관찰 할 수 있다. 조직을 이용한 진단법으로는 immunofluorescent antibody assay가 있는데, 이는 폐조직에서 *M. hyopneumoniae*를 직접검출 할 수 있는 신뢰성 있는 진단방법이나 만성으로 진행되는 경우 민감도가 떨어지는 단점이 있다.^{4,5}

기존 혈청학적 진단법인 보체결합반응, 면역효소소항체법, 간접 응집반응법은 *M. flocculare*와 *M. hyorhinis*와의 교차 반응과 만성 진행 시 정확한 진단을 내리는데 어려움이 있다.^{6,7,8} 이러한 문제를 해결하기 위한 새로운 면역효소항체법인 dot-ELISA법, 단클론 항체를 이용한 blocking ELISA법이 소개되고 있으나 항체검출의 특이반응에 제한적으로 사용되고 있다.^{9,10}

최근에 polymerase chain reaction (PCR)법의 이용으로 병원체의 생존유무에 관계없이 빠르고 정확하게 검출할 수 있게 되었으며 진단특이성과 민감성이 기존의 다른 방법에 비하여 매우높기 때문에 마이코플라스마의 균검출에 많이 사용되어 왔다. PCR을 이용한 돼지 mycoplasma 균종을 검출하기 위한 연구는 주로 살아 있는 동물에서 비강재료와 편도선에서 죽은 동물에서는 폐장재료에서 각각 성공적으로 검출할 수 있다.

따라서 국내의 mycoplasma균종을 정확히 파악하고 이에 대한 예방조치에 대한 기초자료를 위해 도축돈의 폐조직으로부터 mycoplasma균을 분리하고 분리균을 nested-PCR 기법으로 동정하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양조건

American Type Culture Collection (ATCC) 으로부터 *Mycoplasma hyopneumoniae* (Vpp11, ATCC 25617), *M. flocculare* (Ms42, ATCC 27399), *M. hyorhinis* (GDL, ATCC 23839) 를 구입하여 표준균주로 사용하였으며,

Friis medium에서 37°C, 5% CO₂와 humidity를 유지하는 조건에서 배양하였다

균분리

1999년 8월부터 2000년 7월까지 도축장에서 육안으로 마이코플라스마성 폐렴 소견을 보이고 균감염으로 의심되는 도축돈의 폐장 일부를 가능한 무균적으로 수집하였다. 시료는 즉시 실험실로 운반하여 감염부위를 3g씩 절단하고 끓는 물에 5초간 살균한 후 멸균식염수 5ml과 함께 stomacher를 이용하여 3분간 분쇄하였다. 작업 후, 이를 5,000rpm으로 4°C에서 5분간 원심분리하여 상청액을 Friis broth에서 2주간 정제 배양하여 황색으로 변화된 것을 택하여 Friis agar에 옮겨 접종하고, 이를 37°C, 5% CO₂에 10일 이상 배양하였다. 광학현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 colony의 형태를 확인하였으며 특유의 fried-egg colony의 형태를 띄는 시료만을 선별하여 순수·배양하여 사용하였다.

Genomic DNA 분리

Genomic DNA의 분리는 phenol extraction방법을 사용하였다. Friis medium에서 배양한 것을 원심 (4°C, 14,000rpm, 15분) 하여 균체를 회수하고, 멸균 PBS을 이용하여 1회 원심세척 하였다. 멸균 PBS를 이용하여 균체를 재부유시킨 후, 동량의 soluble buffer (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 0.3% SDS, 20µg/ml proteinase K [pH 8.0])를 가하여 50°C에서 2시간 용균 시켰다. 다시 원심하여 상청액만을 수거하고 1회씩 2회에 걸쳐 phenol extraction과 chloroform extraction을 실시하였으며, 1/3 (v/v) 의 7.5M ammonium acetate와 2.5배의 ethanol 첨가한 후 -70°C에서 24시간 침전시켰다. 이를 재원심 (4°C, 12,000 rpm, 30분) 하여 genomic DNA를 수거한 후 TE 완충액 (10mM Tris, 1mM EDTA [pH 8.0]) 에 녹여 4°C에서 보관하면서 PCR의 주형으로 사용하였다.

Nested-PCR

1) Oligonucleotide primer

Mycoplasma spp.의 nested-PCR용 primer는 Harasawa 등¹¹을 수정·보완하여 조성을 구성하였으며, 2쌍의 primer를 (주)바이오니아에 주문하여 제작하였다(Table 1).

2) Nested-PCR 반응

Nested-PCR 기법은 step 1과 step 2로 구분하여 MJ Research Co.의 thermal cycler를 사용하여 실시하였다. Step 1의 경우 1µl의 template (표준주와 분리주의 Genomic DNA), 각 1µl의 primer (10pmol/µl), 4µl의 dNTP (each

Table 1. Nested-PCR oligonucleotide primers for the detection of mycoplasma species.

	Primer	Oligonucleotide sequence
Step 1.	SLF1	5'-ACACCATGGGAGCTGGTAAT-3'
	SLR1	5'-TTCATCGACTTTCAGACCCAAGGCAT-3'
Step 2.	SLF2	5'-GTTCTTTGAAAACCTGAAT-3'
	SLR2	5'-GCATCCACCAAAAACCTCTT-3'

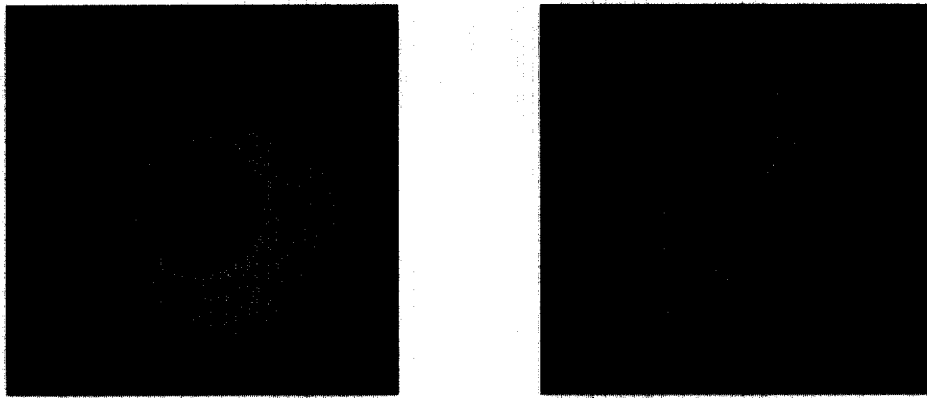


Fig 1. Typical fried-egg colonies of mycoplasma on Friis agar plate incubated at 37°C, 5% CO₂ for 10 days (×100).

200μmol), 5μl의 10×반응 완충액 (100mM Tris-HCl, pH 8.3; 400mM KCl; 15mM MgCl₂, 5μg/ml activated BSA), 2.5U Taq polymerase를 각각 넣고, PCR 반응액이 50μl가 되도록 멸균 증류수를 첨가하였다. Thermal cycler의 반응조건은 초기 변성단계 (94°C, 3min)를 실시한 후, 94°C에서 30초, 57°C에서 2분, 72°C에서 2분의 주기를 35회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 표적 염기서열의 증폭여부를 확인하기 위해 1%의 agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. Step 2의 경우, step 1에서 생성된 PCR 산물을 주형으로 PCR 반응액을 step 1과 동일하게 제작하여, 94°C에서 3분간 초기변성 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 2분, 72°C에서 2분의 주기를 30회 반복하고 마지막으로 72°C에서 5분간 반응시켰다. 표적 염기서열의 증폭여부를 확인하기 위한 전기영동은 3%의 nusieve agarose gel (Takara Co., Japan)에서 실시하였다.

결 과

Mycoplasma균 분리

충남지방 도축돈 가운데 마이코플라스마성 폐렴증상

으로 mycoplasma균 감염으로 의심되는 70두의 폐조직에서 균배양법에 의한 균분리를 실시하였다. Friis agar상에서 마이코플라스마균 7주를 분리하고 특유의 “fried-egg colony”의 집락을 관찰한 다음 nested-PCR을 이용한 실험에 사용하였다 (Fig 1).

Nested-PCR을 이용한 분리균의 동정

표준균인 *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis*와 7개의 분리균의 genomic DNA를 추출하여 nested-PCR 반응한 후, 전기영동으로 밴드를 확인한 결과 step 1의 경우 *M. hyopneumoniae*는 690bp, *M. flocculare*는 630bp, *M. hyorhinis*는 460bp에서 밴드가 확인되었으며, 분리균 역시 표준균주와 동일한 밴드의 양상을 보였으며 (Fig 2), 음성대조 (증류수, Friis medium)에서는 밴드를 관찰할 수 없었다.

Step 1의 산물을 주형으로 반응시킨 step 2의 경우 특이 밴드의 경향이 *M. hyopneumoniae*는 240bp, *M. flocculare*는 230bp, *M. hyorhinis*는 210bp에서 각각 확인되었다. 분리균 역시 표준균주와 동일한 밴드의 양상을 보였으며 (Fig 3), 음성대조 (증류수, Friis medium)에서는 밴드를 관찰할 수 없었다.



Fig 2. Agarose gel electrophoresis of step 1 PCR products.

Template DNA from reference 3 mycoplasma species and isolated mycoplasmas were used PCR, and PCR products were electrophoresed in 1% agarose gel. (M, marker; Lane 1, *M. hyorhinis*; Lane 2, *M. flocculare*; Lane 3, *M. hyopneumoniae*; Lane 4-7, isolated mycoplasma DNAs).

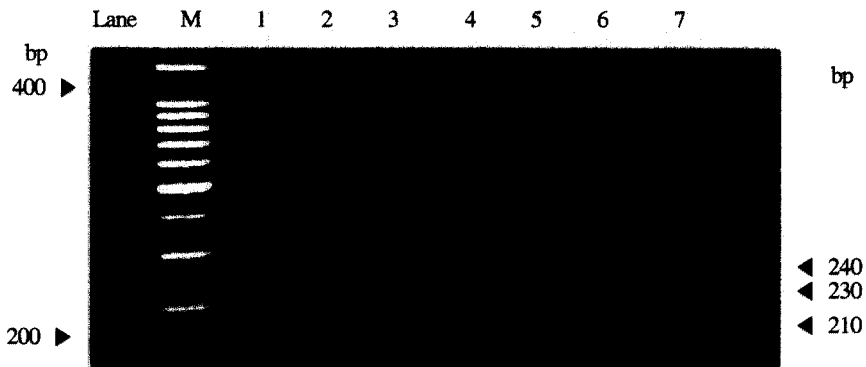


Fig 3. Agarose gel electrophoresis of step 2 PCR products.

Template DNA from three reference mycoplasma species and isolated mycoplasmas were used PCR, and PCR products were electrophoresed in 3% nusieve agarose gel. (M, marker; Lane 1, *M. hyorhinis*; Lane 2, *M. flocculare*; Lane 3, *M. hyopneumoniae*; Lane 4-7, isolated mycoplasma DNAs).

고 찰

세균간의 계통발생학적 추적에 의한 도구로 rRNA sequence를 이용한 분리동정하는 방법이 개발되어 이용되고 있다. 본 연구에서도 16S rRNA와 23S rRNA의 특이 sequence를 증폭함으로써 mycoplasma 균의 특이 band pattern을 확인할 수 있었다. 최근 돼지에서 문제 시 되는 MPS가 *M. hyopneumoniae*에 의하여 기인됨은 잘 알려진 사실이나 기존 혈청학적 진단 방법으로는 다른 균

과의 교차반응 등으로 특이적으로 감별하지 못하였다. 이 문제를 해결할 수 있는 방법이 PCR법으로 높은 민감도와 신뢰도를 주고 있으며 기존PCR방법을 반복한 nested-PCR법에 의해 최상의 민감도를 부여하고 있다.^{12,13}

도축돈에서 마이코플라스마성 폐렴병소를 나타내며 균감염으로 의심되는 70두의 폐 조직을 채취하여 균 분리를 실시한 결과 7마리(분리율 10%)에서 분리주를 얻을 수 있었다. 이처럼 병변이 있음에도 불구하고 아주 낮은 분리율을 보인 것은 배양방법, 가검재료, 분리시기

및 분리방법 등 기술적인 원이도 있지만 병변내의 기존 항체에 의한 분리균의 소멸이 가장 큰 것으로 추측된다.¹² 마이코플라스마성 폐렴의 감염초기 시 원인균인 *M. hyopneumoniae* 가 넓게 분포하기 때문에 균 분리가 용이하나, 만성화될 경우 시간이 감에 따라 병변조직이 위축되고 변성되어 균분리가 더욱 어려워지며, 사용 배지인 Friis medium의 조성이 까다롭고, *M. hyopneumoniae*의 성장이 느려 2차 감염균의 성장이 빨라 균분리가 어려운 것으로 알려졌다.^{2,12,14}

민감도를 높이기 위해 nested-PCR 기법을 사용하여 표준주와 분리주의 16S rRNA와 23S rRNA의 intergenic spacer region을 증폭시킨 결과 전기영동상에서 유사한 밴드 양식을 보였다.¹⁵ 이러한 결과는 16S rRNA와 23S rRNA를 이용한 *Mycoplasma spp.*의 형태학적 분류방법을 국내 분리균에도 적용할 수 있으리라 보아진다.

본 실험은 도축돈을 대상으로 폐렴의 병변 부위에서 mycoplasma균을 분리하여 nested-PCR기법으로 표준균주와 분리균주를 비교하였다. 마이코플라스마성 폐렴에 감염된 도축돈 70두의 폐조직에서 7주의 균을 분리하였다(분리율 10%). 표준주와 분리주를 nested-PCR로 증폭한 결과, 표준주인 *M. hyopneumoniae*, *M. flocculare*, *M. hyorhinis*는 step 1의 경우 690bp, 630bp, 460bp에서 step 2의 경우 240bp, 230bp, 210bp에서 각각 특이 band pattern을 보였다. 따라서 7개의 분리주 가운데 *M. hyopneumoniae*가 4주, *M. flocculare*가 1주, *M. hyorhinis*가 2주로 각각 확인되었다.

참고 문헌

- Ross RF. Mycoplasmal disease. In: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL et al. Diseases of Swine, 7th ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 537-551, 1992.
- Kobisch M, Friis NF. Swine mycoplasmoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15(4):1569-1605, 1996.
- Weisburg WG, Tully JG, Rose DL et al. A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas : Basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171:6455-6467, 1989.
- Livingston CW Jr, Stair EL, Underdahl, NR et al. Pathogenesis of mycoplasmal pneumoniae in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33:2249-2258, 1972.
- Amanfu W, Weng CN, Ross RF. et al. Diagnosis of mycoplasmal pneumoniae of swine : Sequential study by direct immunofluorence. *Am. J. Vet. Res.* 45:1349-1352, 1984.
- Armstrong CH, Freeman MJ, Sands-Freeman L et al. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and the indirect hemmagglutination and complement fixation tests for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 47:464-470, 1983.
- Ross RF, Whittlestone P. Recovery, identification and serological response to porcine mycoplasmas. In : J. G. Tully, S. Razin, eds. *Methods in mycoplasmaology*, Vol. 2. New York Academic Press, 1983.
- Piffer IA, Ross RF. Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* 45:478-481 1984.
- Nicolet J, Paroz P, Bruggmann S et al. Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme-linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 29:305-309, 1980.
- Le Potier MF, Abiven P, Kobisch M. A blocking ELISA using a monoclonal antibody for the serological detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Ann. Rech. Vet.* 23:239-247. 1994.
- Harasawa R, Mizuasawa H, Nozawa K et al. 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, 1993a.
- 이순신, 이동석, 한정희 등. *Mycoplasma hyopneumoniae*의 검출과 DNA fingerprinting에 관한 예비적 연구. *한국마이코플라스마학지*, 11(1):3-12, 2000.
- Sternke GW, Phan R, Young TF et al. Differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. flocculare*, and *M. hyorhinis* on the basis of amplification of a 16S rRNA gene sequence. *Am. J. Vet. Res.* 55:81-84, 1994.
- Morton HE, Roberts RJ. Production of anti-mycoplasma (PPLO) in rabbits. *PSEBM.* 125:538-543 1966.
- Harasawa R, Uemori T, Asada K et al. Sensitive detection of mycoplasmas in cell cultures by using two-step polymerase chain reaction. In "Rapid Diagnosis of Mycoplasmas" Kahane I and Adoni A (eds) Plenum, New York, 227-232. 1993b.