

## 경기지역 도축우 및 도축돈의 폐렴병변에서 *Mycoplasma* spp. 원인체에 관한 연구

제미성<sup>1</sup> · 이찬희<sup>1</sup> · 김용백<sup>2</sup> · 박건택<sup>3</sup> · 정우경<sup>1\*</sup> · 박용호<sup>1\*</sup>

서울대학교 수의과대학 <sup>1</sup>미생물학실, <sup>2</sup>임상병리학실, <sup>3</sup>인제대학교 바이오오테크놀로지학부

## Prevalence of *Mycoplasma* spp. in Slaughtered Cows and Pigs with Pneumonic Lung Lesion in Gyeonggi Province

Mi Seong Je<sup>1</sup>, Chan-Hee Lee<sup>1</sup>, Yongbaek Kim<sup>2</sup>, Kun Taek Park<sup>3</sup>, Woo Kyung Jung<sup>1\*</sup>, and Yong Ho Park<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Microbiology, <sup>2</sup>Laboratory of Clinical Pathology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 08826, Korea

<sup>3</sup>Department of Biotechnology, Inje University, Injero 197, Kimhae-si, Gyeongsangnam-do, Korea

(Received June 8, 2018/Revised July 5, 2018/Accepted July 24, 2018)

**ABSTRACT** - The present study was conducted to investigate the prevalence of *Mycoplasma* spp. in cows and pigs with pneumonic lung lesions in Gyeonggi province in 2017. One hundred ninety two and 257 lung tissues were collected from slaughtered cows and pigs with pneumonic lesions, respectively, and examined for the presence of *Mycoplasma* spp. by a genus specific PCR. Among the examined animals, 147 cows (76.5%) and 203 pigs (80.9%) were found to be infected with *Mycoplasma* spp.. The infected tissues were further examined to identify the specific species of *Mycoplasma* using species specific PCRs. The only identified species in cows was *M. agalactiae* which was detected from 16 cows (8.3%), whereas *M. dispar*, *M. bovis*, and *M. bovirhinis* were not detected. In pigs, *M. hyopneumoniae* was detected from 74 pigs (28.8%) and *M. hyorhinis* from 13 pigs (5.1%). *M. hyosynoviae* was not detected. Taken together, the current study indicates *Mycoplasma* spp. are commonly associated with lung infection in cows and pigs in Korea. Further studies are needed to evaluate the impact of mycoplasma infection on the development of lung diseases in farm animals.

**Key words** : Slaughtered cows, Slaughtered pigs, *Mycoplasma* spp., PCR

국민 소득이 높아짐에 따라 식생활이 변화하여 육류 소비가 증가하고 있다. 이에 따라 소고기 및 돼지고기의 수요가 증가하고 이를 충족시키기 위해 사육두수가 늘고 있지만 시설의 현대화는 늘어나는 사육 두수를 감당하지 못하고 있다. 이러한 사육 환경은 밀사와 환기 불량에 따른 질병을 초래하고, 번식장애와 폐사율의 증가, 성장 지연 등의 생산력 저하를 초래한다.

*Mycoplasma* spp.는 산업동물에서 유방염, 관절염, 비뇨생식기 질환을 일으키며, 소와 돼지에서 호흡기 복합 질환(Bovine/Porcine respiratory disease complex)을 일으키는 주요 원인체이다<sup>1)</sup>. 이러한 호흡기 질환은 일반적으로 급작스러운 폐사보다는 만성적인 소모성 질환으로 이어져 생산

성 감소 및 2차 감염에 의한 치료 비용의 증가로 추가적인 경제 손실을 준다. 폐렴을 일으키는 주요 *Mycoplasma* spp.는 소에서 *M. bovis*, 돼지에서 *M. hyopneumoniae* 등 여러 species가 있고 이들은 그 자체로 유행성 폐렴을 일으키면서 다른 감염체에 의한 2차 감염의 원인이 되기도 한다<sup>2,3)</sup>. 현재 국내에서는 가축에서 다양한 *Mycoplasma* spp.에 의해 호흡기 질환이 발생하고 있음에도 불구하고, 돼지에서는 *M. hyopneumoniae*에 연구가 국한되어 있으며, 특히 소의 경우에는 거의 연구가 진행되지 않고 있다<sup>4,6)</sup>. 이에 본 연구에서는 도축장에 출하되는 소와 돼지 중 육안적 폐병변을 가진 조직으로부터 추출된 DNA를 이용한 *Mycoplasma* spp. 특히 PCR 검사에 의해 국내 주요 가축에서 *Mycoplasma* spp.의 분포 실태를 알아보고자 한다. 이러한 연구는 소비자에게 더 안전한 육류를 공급하고 국내산 축산 식품에 대한 소비자의 신뢰를 향상시킬 수 있는 기초 자료로 활용될 수 있다.

\*Correspondence to: Woo Kyung Jung, Yong Ho Park, Department of Veterinary Microbiology

Tel: 82-2-880-4175, Fax: 82-2-871-7524

E-mail: fanta2@snu.ac.kr, yhp@snu.ac.kr

## Materials and Methods

### 샘플채취 방법

경기도 부천에 소재한 도축장에서 2017년 8월부터 10월 사이 도축된 소와 돼지 중 도축 후 육안 검사에 의해 폐렴 병변부가 확인된 개체로부터 병변 부위 조직을 일정량 채취하고 냉장 보관하여 즉시 실험실로 운반하여 실험을 진행 하였다. 최종적으로 폐병변이 있는 소 192두와 돼지 257두에서 폐조직을 실험에 사용하였다.

### DNA 분리

DNA 분리를 위해서 각 조직 2 g을 먼저 무균적으로 칼로 최대한 잘게 조각낸 후, 20 mL의 5% PBS와 함께 Whirl-

pak (Nasco, USA)에 옮겨 담았다. 스토머커(stomacher 400, Seward, UK)를 이용하여 10분간 균질화 한 후, 1 mL 균질액을 1.5 mL 코니칼 튜브로 옮겨 담은 후, 12,000 xg에서 10분간 원심분리 후, 상층액을 제거하고 tissue pellet로부터 QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Netherland)를 이용하여 100 µL의 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA sample은 여러 개의 튜브로 나누어 분주 한 후 -20°C에서 보관 후 PCR에 이용하였다.

### PCR 수행

추출된 DNA에 대해 PCR을 실시하였다. 먼저 *Mycoplasma* universal primer를 이용하여 *Mycoplasma* spp.를 확인하고, species에 특이적인 primer를 사용하여 실험하였다(Table

**Table 1.** Primer sequences used for PCR identification

Specificity	Primer	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Size (bp)	References
Universal <i>Mycoplasma</i>	F	GGCGAATGGGTGAGTAACACG	464bp	(13)
	R	CGGATAACGCTTGCACCTATG		
<i>M. dispar</i>	F	GGCTGTGTGCCTAATACATGC	583bp	(14)
	R	CAGCGTGGACTACCAGGGTATC		
	<i>M. dispar</i> F	GGTGCGCAACATTAGTTAGTTTGC		
<i>M. agalactiae</i>	STJB1	ATATCAGAAACAAAACACCCAGT	409bp	(15)
	STJB2	TGCAGAAGAAAGTCCAATCA		
<i>M. bovis</i>	MBOUVRC2-L	TTACGCAAGAGAATGCTTCA	1626bp	(16)
	MBOUVRC2-R	TAGGAAAGCACCTATTGAT		
<i>M. bovirhinis</i>	F	GGCTGTGTGCCTAATACATGC	358bp	(14)
	R	CAGCGTGGACTACCAGGGTATC		
	<i>M. bovirhinis</i> F	AGCATTAGAGGAAATGCCAG		
<i>M. hyorhinis</i>	F	GTAGTCAAGCAAGAGGATGT	346bp	(17)
	R	GCTGGAGTTATTATACCAGGA		
<i>M. hyopneumoniae</i>	F	GGGCCGATGAAACCTATTAATAAGCT	948bp	(17)
	R	GCCGCGAAATTAATATTTTAATTGCATCCTG		
<i>M. hyosynoviae</i>	F	GCAGTTGAGGAAATGCAACTG	400bp	(11)
	R	TTAGCTGCGTCAGTGATTTGG		

**Table 2.** PCR conditions for DNA amplification of the indicated bacteria

Steps	PCR conditions							
	Universal <i>Mycoplasma</i>	<i>M. dispar</i>	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. hyorhinis</i>	<i>M. hyopneumoniae</i>	<i>M. hyosynoviae</i>
Initial denaturation	94°C, 7min	95°C, 5min	94°C, 7min	94°C, 7min	95°C, 5min	94°C, 7min	94°C, 7min	94°C, 7min
Denaturation	94°C, 1min	95°C, 30sec	94°C, 30sec	94°C, 30sec	95°C, 30sec	94°C, 60sec	94°C, 60sec	94°C, 30sec
Annealing	60°C, 1min	52°C, 30sec	60°C, 30sec	52°C, 30sec	52°C, 30sec	50°C, 60sec	50°C, 60sec	60°C, 30sec
Extension	72°C, 1.5min	72°C, 45sec	72°C, 30sec	72°C, 60sec	72°C, 45sec	72°C, 90sec	72°C, 90sec	72°C, 90sec
Cycles	30	33	33	35	33	35	35	30
Final extension	72°C, 10min	72°C, 5min	72°C, 5min		72°C, 5min	72°C, 10min	72°C, 10min	72°C, 10min

**Table 3.** Prevalence of *Mycoplasma* spp. in selected lung samples by PCR

Species (Total number of samples, A)	Species	Positive number (B)	B/A (%)
Bovine (192)	<i>M. spp.</i>	147	76.5
	<i>M. dispar</i>	0	0
	<i>M. agalactiae</i>	16	8.3
	<i>M. bovis</i>	0	0
	<i>M. bovirhinis</i>	0	0
Porcine (257)	<i>M. spp.</i>	208	80.9
	<i>M. hyopneumoniae</i>	74	28.8
	<i>M. hyorhinis</i>	13	5.1
	<i>M. hyosynoviae</i>	0	0

1). 반응 조건은 Table 2에 나타난 바와 같으며 PCR 증폭 산물 10  $\mu$ L를 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 특이 유전자 증폭 유무를 관찰하였다.

## Results and Discussion

폐렴 병변을 보인 소 192두 및 돼지 257두에 대한 PCR 검사 결과, *Mycoplasma* spp.는 소에서 147두(76.5%), 돼지에서는 203두(80.9%)에서 각각 검출되었다. 소, 돼지 각각의 *Mycoplasma* spp.에 대한 세부 primer를 이용한 검사 결과에서는 소에서 *M. agalactiae*가 16두(8.3%)에서 검출되었으나, *M. dispar*, *M. bovis* 및 *M. bovirhinis*는 검출되지 않았다. 돼지에서는 *M. hyopneumoniae*가 74두(28.8%), *M. hyorhinis*가 13두(5.16%)에서 검출되었고, *M. hyosynoviae*는 검출되지 않았다(Table 3).

가축의 질병으로 인한 경제적 손실을 막기 위해서는 상재성 질병에 대한 검사를 실시하여 사양관리에 반영하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 도축장 내 소와 돼지의 폐에 대한 육안 병변 샘플의 *Mycoplasma* spp. 및 세부 species에 대한 PCR 검사를 결과를 통해, 우리나라 농장 내 폐렴이 상재하고 있음을 확인하였다.

해외에서도 소에서 *Mycoplasma*성 폐렴이 문제가 되고 있는데, 1990년에서 2000년사이 영국에서 혈청학적 screening 조사 결과 *M. bovis*에 대한 혈청학적 유병율은 22% 였다<sup>7)</sup>. 프랑스에서는 2003년에서 2008년 사이 기관지 폐렴에 걸린 1142개 송아지 샘플을 확인한 결과, *M. bovis*가 50% 이상 분리되었고<sup>2)</sup>, 덴마크에서는 폐렴 증상을 보인 소의 86%의 폐에서 *Mycoplasma*가 확인되었다. 주요 species는 *M. dispar* (48%), *M. bovis* (24%), *M. bovirhinis* (20%)이며, 단독 감염보다 *M. spp.*들의 복합 감염이 많았다<sup>8)</sup>. 벨기에에서는 송아지의 호흡기 질병에서 *M. bovis*가 35%, *M. dispar*가 45.5% 분리되었다<sup>9)</sup>.

하지만, 우리나라의 경우 육우 송아지의 폐 샘플에서 *M. bovis*의 양성율은 0-7%로 낮았는데<sup>4)</sup>, 본 실험에서도 *M. agalactiae*만 9.38%(16두)에서 검출되었고, 해외에서 발생한다고 알려져 있는 *M. dispar*, *M. bovis*, *M. bovirhinis*는 검출되지 않았다. 국내에서는 한우, 육우, 송아지에 대한 *Mycoplasma* species의 질병 발생 및 폐사에 대한 연구가 부족하데, 세부 Species를 확인하고 폐사에 미치는 영향을 파악하는 것이 필요하다.

돼지의 경우 소와 비교하여 사육기간이 짧고 밀집 사육으로 인한 *Mycoplasma*성 폐렴에 의한 경제적 손실이 크다. *M. hyopneumoniae*, *M. hyorhinis* 및 *M. hyosynoviae*이 각각 돼지 기관지에 서식하며, 특히 *M. hyopneumoniae*는 돼지 호흡기 복합 질환의 주요 원인체로 알려져 있다<sup>10)</sup>.

국내 돼지에 대한 폐 병변 발생률은 매우 다양하게 나타나는데 전체적으로 61~84% 수준을 나타내었다. 김혜련 연구팀은 우리나라 85%의 양돈장에서 *M. hyopneumoniae*가 검출되어 *Mycoplasma* 폐렴이 상재하고 있음을 확인하였는데<sup>6)</sup>, 이번 연구에서도 208두(80.9%)에서 *Mycoplasma* spp.가 검출되었고, 세부 species에서 *M. hyopneumoniae*가 74두(28.8%)로 우세하여, 선행연구와 유사한 양상을 확인하였다. 태국의 경우 도축 돼지 폐의 40%에서 *M. hyopneumoniae*가, 20%에서 *M. hyorhinis*를 확인하였고 *M. hyosynoviae*는 검출되지 않았다<sup>11)</sup>. 노르웨이에서는 도축돈의 폐렴병변부 중 83%에서 *M. hyopneumoniae*가, 37%에서 *M. hyorhinis*가 검출되어 세계적으로 유사한 경향을 보였다<sup>12)</sup>.

본 연구는 국내에서 최초로 소와 돼지에서 다양한 *Mycoplasma* species를 확인한 실험이며, 이를 통하여 경기 지역 도축우 및 도축돈에서 *Mycoplasma*성 폐렴이 상재하고 있음을 확인하였다. 하지만 대부분의 경우 세부 species는 밝히지 못했는데, 추가 연구를 통한 국내 *Mycoplasma*성 폐렴의 원인체 파악이 필요하다. 또한, 가축 사육 농장의 다두화 및 집단화의 영향으로 각종 호흡기 질병은 계속 발생할 것으로 여겨지며 이를 방지하기 위해 축사 환경의 개선 및 호흡기 질병에 대한 지속적인 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

## Acknowledgement

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원의 첨단생산기술개발 사업(315005-3) 및 2017년도 서울대학교 학부생 연구지원사업의 지원을 받아 수행되었다.

## 국문요약

본 연구는 경기지역 도축돈 및 도축우의 폐렴병변에서 *Mycoplasma* spp.의 발생 분포를 조사하고자 수행하였다.

부친 소재 도축장에 출하된 소와 돼지의 폐에 대하여 육안적 검사를 하고, 이 중 병변을 보인 소 192두와 돼지 257두의 폐에 대한 PCR 검사 결과, *Mycoplasma* spp.는 소에서 147두(76.5%), 돼지에서는 203두(80.9%)에서 각각 검출되었다. 소, 돼지 각각의 *Mycoplasma* spp.에 대한 세부 primer를 이용한 검사 결과에서는 소에서 *M. agalactiae*가 16두(8.3%)에서 검출되었으나, *M. dispar*, *M. bovis* 및 *M. bovirhinis*는 검출되지 않았다. 돼지에서는 *M. hyopneumoniae*가 74두(28.8%), *M. hyorhinis*가 13두(5.1%) 검출되었다. *M. hyosynoviae*는 검출되지 않았다. 본 연구를 통해 경기지역 도축우 및 도축돈에서 *Mycoplasma*성 폐렴이 상재하고 있음을 확인하였다.

## References

- Nicholas, R.: The veterinary significance of mycoplasmas. *Methods Mol Biol* **104**, 17-23 (1998).
- Chazel, M., Tardy, F., Le Grand, D., Calavas, D., Poumarat, F.: Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet Res* **6**(32), 1-8 (2010).
- Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F.: Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Vet Microbiol* **126**(4), 297-309 (2008).
- Kim, C.K.: Isolation and identification of *Mycoplasma* by Polymerase Chain Reaction from feedlot calves. In Department of Veterinary Medicine: Seoul National University, 1997.
- Lee, C.H., Hwang, W.M., Lee, J.G., Lee, S.M., Kim, S.J., Kim, N.H., Yang, D.S., Han, J.H.: Study on gross finding of lung lesions and causative pathogens of porcine respiratory disease complex from slaughtered pigs in Incheon. *Korean J Vet Serv* **34**(4), 313-320 (2011).
- Kim, H., Kim, T., Lim, J., Lee, Y., Park, B.: Seroprevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in Korean swine herds. *Korean J Vet Res* **45**(1), 55-61 (2005).
- Ayling, R.D., Bashiruddin, S.E., Nicholas, R.A.: *Mycoplasma* species and related organisms isolated from ruminants in Britain between 1990 and 2000. *Vet Rec* **155**(14), 413-416 (2004).
- Kusiluka, L.J., Ojeniyi, B., Friis, N.F.: Increasing prevalence of *Mycoplasma bovis* in Danish cattle. *Acta Vet Scand* **41**(2), 139-146 (2000).
- Thomas, A., Ball, H., Dizier, I., Trolin, A., Bell, C., Mainil J., Linden, A.: Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium. *Vet Rec* **151**(16), 472-476 (2002).
- Kobisch, M., Friis, N.F.: Swine mycoplasmoses. *Rev Sci Tech* **15**(4), 1569-1605 (1996).
- Makhanon, M., Tummaruk, P., Thongkamkoon, P., Thanawongnuwech, R., Prapasarakul, N.: Comparison of detection procedures of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae*, and *Mycoplasma hyorhinis* in lungs, tonsils, and synovial fluid of slaughtered pigs and their distributions in Thailand. *Trop Anim Health Prod* **44**(2), 313-318 (2012).
- Falk, K., Hoie, S., Lium, B.M.: An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. II. Enzootic pneumonia of pigs: microbiological findings and their relationship to pathomorphology. *Acta Vet Scand* **32**(1), 67-77 (1991).
- Wong-Lee, J.G., Lovett, M.: *Diagnostic molecular microbiology Principles and Applications*. Washing D. C.: American Society for Microbiology, 1993.
- Miles, K., McAuliffe, L., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.: Rapid detection of *Mycoplasma dispar* and *M. bovirhinis* using allele specific polymerase chain reaction protocols. *FEMS Microbiol Lett* **241**(1), 103-107 (2004).
- Bashiruddin, J.B., Frey, J., Konigsson, M.H., Johansson, K.E., Hotzel, H., Diller, R., de Santis, P., Botelho, A., Ayling, R.D., Nicholas, R. A., Thiaucoutr, F., Sachse, K.: Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: a collaborative trial. *Vet J* **169**(2), 268-275 (2005).
- Subramaniam, S., Bergonier, D., Poumarat, F., Capaul, S., Schlatter, Y., Nicolet, J., Frey, J.: Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. *Mol Cell Probes* **12**(3), 161-169 (1998).
- Caron, J., Ouardani, M., Dea, S.: Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *J Clin Microbiol* **38**(4), 1390-1396 (2000).