

설치류 미생물 품질관리 매뉴얼



정령한 식약처
국민안심의 시작

【공직자 부조리 및 공익신고안내】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패·공익신고 > 청렴포털”
- ▶ 상담전화 : 국법없이 110 또는 1398

발 간 등 록 번 호

11-1471057-000631-01

설치류 미생물 품질관리 매뉴얼



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

이 안내서는 설치류 미생물 품질관리 매뉴얼에 대하여 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식(‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 참고로만 활용하시기 바랍니다. 또한, 본 안내서는 2023년 8월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ “민원인 안내서”란 민원인들의 이해를 돕기 위하여 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 설명하거나 특정 민원업무에 대한 행정기관의 대외적인 입장을 기술하는 것 (식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 실험동물자원과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호 043-719-5510

팩스번호 043-719-5500

차 례

머리말	7
마우스·랫드 미생물 모니터링 검사 대상 미생물	8
검체 채취 방법 순서도 (Flow chart)	11
감염 시 대응 방안	12
미생물 검사	

I

바이러스 검사

DNA virus

1. Ectromelia virus (Mousepox)	17
2. H-1 virus	19
3. K virus (Mouse pneumonitis virus)	21
4. Kilham rat virus (KRV)	23
5. Minute virus of mice (MVM)	25
6. Mouse adenovirus (MAV)	27
7. Mouse cytomegalovirus (MCMV)	29
8. Mouse parvovirus (MPV)	32
9. Mouse thymic virus (MTV)	33
10. Polyoma virus	35
11. Rat minute virus (RMV)	36
12. Rat parvovirus (RPV)	38

RNA virus

13. Hantavirus	39
14. Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	42
15. Mouse hepatitis virus (MHV)	45
16. Sendai virus (HVJ)	47
17. Lactic dehydrogenase-elevating virus (LDV)	50
18. Mouse rotavirus (Epizootic diarrhea of infant mice, EDIM)	51
19. Murine norovirus (MNV)	53
20. Pneumonia virus of mice (PVM)	55
21. Rat coronavirus (Sialodacryoadenitis virus, SDAV)	57
22. Rat theilovirus (RTV)	58
23. Reovirus 3	60
24. Theiler's encephalomyelitis virus (TMEV)	61



II

세균 검사

Gram 양성

1. <i>Corynebacterium bovis</i>	67
2. <i>Corynebacterium kutscheri</i>	68
3. <i>Staphylococcus aureus</i>	70
4. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	72
5. β -hemolytic Streptococci	75

Gram 음성

6. <i>Salmonella</i> spp.	78
7. <i>Streptobacillus moniliformis</i>	80
8. <i>Mycoplasma pulmonis</i>	82
9. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	84
10. <i>Citrobacter rodentium</i>	85
11. <i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's disease)	88
12. <i>Filobacterium rodentium</i> (Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus)	90
13. <i>Helicobacter bilis</i>	92
14. <i>Helicobacter hepaticus</i>	93
15. <i>Helicobacter typhlonius</i>	94
16. <i>Rodentibacter heylii</i>	95
17. <i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	96
18. <i>Klebsiella oxytoca</i>	98
19. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	100
20. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	102

III

진균 검사

1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	107
2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Dermatophytes)	108
3. <i>Pneumocystis carinii</i>	109
4. <i>Pneumocystis murina</i>	110

IV

기생충 검사

내부 기생충 - 요충 (Pinworm)

1. <i>Aspicularis tetraptera</i>	115
2. <i>Syphacia muris</i>	117
3. <i>Syphacia obvelata</i>	119

내부 기생충 - 원충

4. <i>Giardia muris</i>	121
5. <i>Spiroucleus muris</i>	122
6. <i>Entamoeba muris</i>	123
7. <i>Tritrichomonas muris</i>	124

외부 기생충

8. <i>Myobia musculi</i>	125
9. <i>Myocoptes musculinus</i>	126
10. <i>Polyplax serrata</i>	128
11. <i>Psorergates simplex</i>	129
12. <i>Radfordia ensifera</i>	130

별첨 자료

1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법	133
2. IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법	134
3. 조직을 이용한 유제액 제조 방법(샘플 전처리)	135
4. RNA 추출법	136
5. DNA 추출법	137
6. API 검사법	138

미생물 모니터링 검사 주기

143



설치류 미생물 품질관리 매뉴얼은 국내 설치류 실험동물을 사용하는 시설에서 미생물학적 품질관리에 필요한 시험법과 모니터링 방법을 제시하여 바이오 연구의 신뢰성을 확보하고자 발간하였다. 본 매뉴얼은 2006년 발간한 실험동물의 품질관리(설치류편)을 최근 실정에 맞게 병원체를 추가하고 검체 채취 방법 신설, 검사법을 현행화하는 등 대폭 개정하여 발간하게 되었다. 미국 Jackson 연구소에서는 설치류의 미생물학적 품질관리 항목으로 바이러스, 세균, 진균, 기생충을 설정하여 항목에 따라 시기별로 모니터링을 실시하고 있다. 일본 실험동물중앙연구소에 국제실험동물협회(International Council for Laboratory Animal Sciences) 모니터링 센터(ICLAS Monitoring Center)를 두어 전 세계 실험동물의 표준화를 꾀하고 있다. ICLAS Monitoring Center에서는 마우스와 랫드의 미생물학적 품질관리 항목으로 바이러스, 세균, 진균, 기생충 등을 설정하고 항목에 따라 3개월, 6개월 또는 12개월마다 미생물학적 모니터링을 실시하고 있다. 유럽에서도 유럽실험동물협회(Federation of European Laboratory Animal Science Associations)에서 설치류에 대한 미생물학적 품질관리 항목으로 바이러스, 세균, 진균, 기생충을 설정하고 항목에 따라 3개월, 6개월 또는 12개월마다 미생물학적 모니터링을 실시하고 있다.

국내에서는 미국, 일본, 유럽의 설치류 미생물 품질관리 기준을 바탕으로 식약처에서 실험동물 미생물 품질관리 안내서를 2021년에 발간하였고 2023년에 개정하였다. 국내에서도 설치류에 대한 미생물학적 품질관리 항목으로 바이러스, 세균, 진균, 기생충을 설정하고 항목에 따라 3개월, 6개월 또는 12개월마다 미생물학적 모니터링을 실시하고 있다.

본 매뉴얼은 미생물 품질관리 안내서에 나온 미생물 검사법과 검체 채취방법을 서술하였다. 본 매뉴얼을 통해 국내 설치류 연구와 바이오 연구의 신뢰성을 증진하고 국내 바이오산업 발전에 기여할 것으로 기대한다.

마우스·랫드 미생물 모니터링 검사 대상 미생물

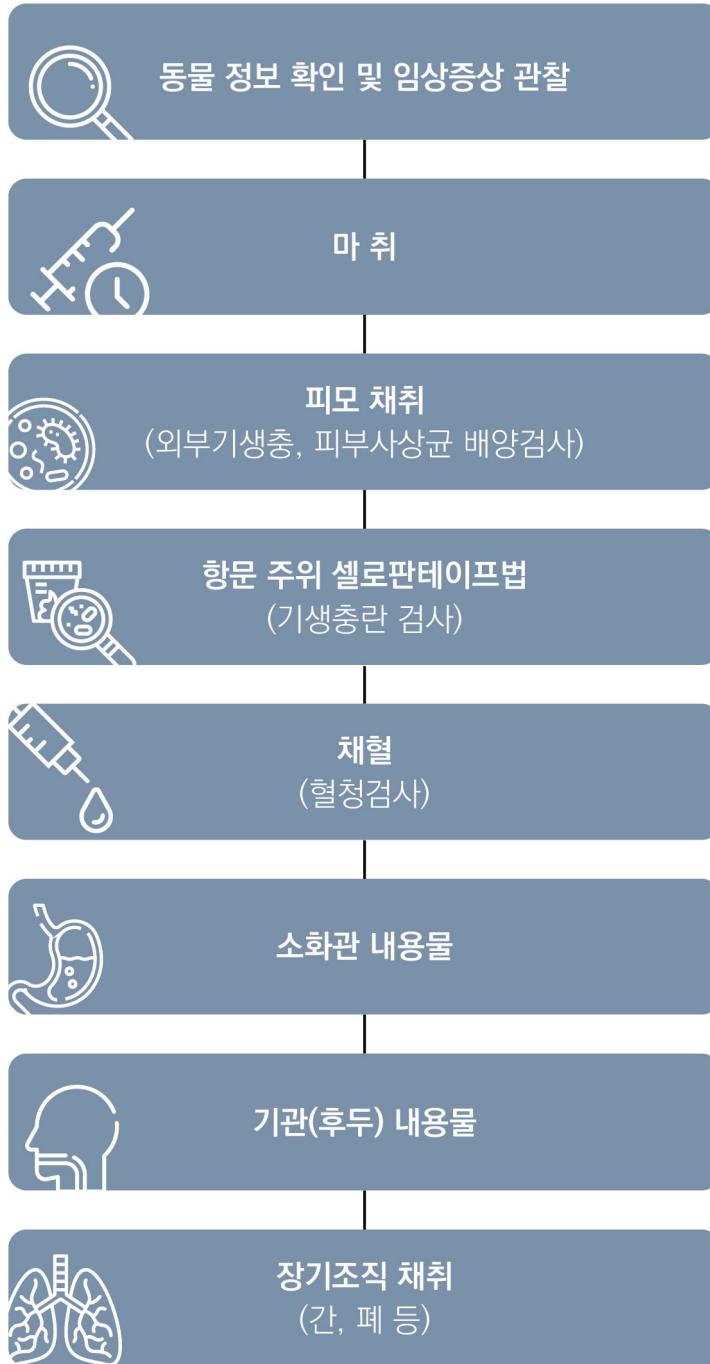
Pathogen		검사주기 (개월)	대상동물 (마우스/랫드)	Category	검사방법	
V i r u s e s	DNA	Ectromelia virus (Mousepox)	6	마	B	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		H-1 virus	6	랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		K virus (Mouse pneumonitis virus)	12	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Kilham rat virus (KRV)	6	랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Minute virus of mice (MVM)	6	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Mouse adenovirus (MAV)	6	마, 랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Mouse cytomegalovirus (MCMV)	12	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Mouse parvovirus (MPV)	12	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Mouse thymic virus (MTV)	12	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Polyoma virus	12	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Rat minute virus (RMV)	6	랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		Rat parvovirus (RPV)	6	랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
	RNA	Hantavirus	3	마, 랫	A	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)		3	마, 랫	A	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
Mouse hepatitis virus (MHV)		3	마	B	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
Sendai virus (HVJ)		3	마, 랫	B	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV)		12	마	C	혈청분석법(enzyme 분석), PCR법	
Mouse rotavirus [Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM)]		6	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
Murine norovirus (MNV)		3	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	



Pathogen		검사주기 (개월)	대상동물 (마우스/랫드)	Category	검사방법	
	Pneumonia virus of mice (PVM)	6	마, 랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
	Rat coronavirus (Sialodacryoadenitis virus, SDAV)	3	랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
	Rat theilovirus (RTV)	6	랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
	Reovirus 3	6	마, 랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
	Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)	3	마	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법	
B a c t e r i a	Gram+	<i>Corynebacterium bovis</i>	3	마	C	배양법, PCR법
		<i>Corynebacterium kutscheri</i>	3	마, 랫	C	배양법, PCR법
		<i>Staphylococcus aureus</i>	3	마, 랫	D	배양법, PCR법
		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	마, 랫	D	배양법, PCR법
		β -hemolytic Streptococci	3	마, 랫	D	배양법, PCR법
	Gram-	<i>Salmonella</i> spp. (<i>S. Typhimurium</i> 포함)	3	마, 랫	A	배양법, PCR법
		<i>Streptobacillus moniliformis</i>	12	마, 랫	A	배양법, PCR법
		<i>Mycoplasma pulmonis</i>	3	마, 랫	B	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3	마, 랫	C	배양법, PCR법
		<i>Citrobacter rodentium</i>	3	마	C	배양법, PCR법
		<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's disease)	6	마, 랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		<i>Filobacterium rodentium</i> (Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus)	6	마, 랫	C	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		<i>Helicobacter bilis</i>	3	마, 랫	C	배양법, PCR법
		<i>Helicobacter hepaticus</i>	3	마	C	배양법, PCR법
		<i>Helicobacter typhlonius</i>	3	마	C	배양법, PCR법
		<i>Rodentibacter heylII</i>	3	마, 랫	C	배양법, PCR법
		<i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	3	마, 랫	C	배양법, PCR법
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	마, 랫	D	배양법, PCR법
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	마, 랫	D	배양법, PCR법
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	마, 랫	D	배양법, PCR법		

		Pathogen	검사주기 (개월)	대상동물 (마우스/랫드)	Category	검사방법
Fungi		<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	12	마, 랫	A	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Dermatophytes)	6	마, 랫	A	배양법, PCR법
		<i>Pneumocystis carinii</i>	3	랫	D	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
		<i>Pneumocystis murina</i>	3	마	D	혈청분석법(ELISA, IFA), PCR법
E n d o p a r a s i t e s	Pin worm	<i>Aspiculuris tetraptera</i>	3	마, 랫	E	현미경검사법, PCR법
		<i>Syphacia muris</i>	3	마, 랫	E	현미경검사법, PCR법
		<i>Syphacia obvelata</i>	3	마, 랫	E	현미경검사법, PCR법
	Proto zoa	<i>Giardia muris</i>	3	마, 랫	C	현미경검사법, PCR법
		<i>Spironucleus muris</i>	3	마, 랫	C	현미경검사법, PCR법
		<i>Entamoeba muris</i>	3	마, 랫	E	현미경검사법, PCR법
		<i>Tritrichomonas muris</i>	3	마, 랫	E	현미경검사법, PCR법
	Ectoparasites		<i>Myobia musculi</i>	3	마, 랫	C
		<i>Myocoptes musculinus</i>	3	마, 랫	C	현미경검사법, PCR법
		<i>Polyplax serrata</i>	3	마, 랫	C	현미경검사법, PCR법
		<i>Psorergates simplex</i>	3	마, 랫	C	현미경검사법, PCR법
		<i>Radfordia ensifera</i>	3	마, 랫	C	현미경검사법, PCR법

검체 채취 방법 순서도 (Flow chart)



감염 시 대응 방안

1. 일반적인 감염 시 대응 고려사항

① 감염 정보 수집

감염원에 대한 위험도, 유병률, 시설 정보 등을 신속히 수집한다.

② 감염원에 따른 대응

a) 감염원의 종류에 따른 대응은 동물실험시설을 충분히 고려하여 적절히 대응한다.

b) 감염원 처리: 감염된 개별 개체에 대해 대응하는 것이 아니라 감염된 공간에 대한 대응을 하도록 한다.

2. 감염 대응 방법

① 감염원 차단은 아래 분류에 따라 처리한다.

Category ¹⁾	처리 방법
A	<ul style="list-style-type: none">• 해당하는 병원체에 의한 감염 사고 발생 시 현재 진행되고 있는 실험을 즉시 중단하고 실험을 종료해야 한다.• 사육 중인 사육 공간에서 즉시 동물을 이동하고 병원체에 따라 다르지만, 기본적으로 사육자 및 연구자의 안전을 위해 모든 동물을 살처분하는 것을 원칙으로 한다.
B	<ul style="list-style-type: none">• 해당하는 병원체에 의한 감염 사고 발생 시 현재 진행되고 있는 실험을 즉시 중단하고 실험을 종료해야 한다.• 사육 중인 사육 공간에서 즉시 동물을 이동하고 필요에 따라 도입이 불가능한 동물의 경우 격리된 별도의 공간에서 청정화를 고려할 수 있다.• 도입이 가능한 동물은 신규로 도입한다.
C, D, E	<ul style="list-style-type: none">• 해당하는 병원체에 의한 감염 사고 발생 시 현재 진행되고 있는 실험에 영향이 있는지를 판단하여 계속 진행 또는 중단을 판단한다.• 실험의 계속, 중단의 판단은 실험의 종류, 동물의 종류, 감염 병원체의 종류, 동물실험 시설에서의 사육관리 형태 및 동물실험시설의 구조 등을 충분히 고려한다.

* 실험동물 공급 생산 시설은 감염 사고가 발생할 경우, 즉시 생산 공급을 중단하고 Category A, B에 해당하는 병원체 감염의 경우 관련 조치와 함께 그 결과를 감염 사고 발생 2주 이내에 식품의약품안전처장에게 보고하여야 하며, 모든 감염 사고 발생 시 실험동물이 공급된 연구시설과 연구자에게 감염 사고를 공지해야 한다.

1) A: 인수공통 전염병을 일으키는 병원체, B: 실험동물에 치명적인 병원체, C: 실험동물에 질병 및 생리학적 변화를 일으키는 병원체, D: 기회 감염되는 병원체, E: 실험동물의 미생물학적 상태를 알 수 있는 표시자 역할을 하는 병원체



② 감염 확산 방지

a) 감염 사실 공지

동물실험시설 이용자에게 신속히 감염 사실을 공지하고 관련자에게 관리상의 주의점을 인지시킨다. 외부로 분양되는 경우 해당 동물실험시설에 신속히 감염 사실을 공지한다.

b) 동물 번식, 분양 및 이동금지

재감염 및 감염확산 방지를 위해 동물 번식, 분양 및 이동을 금지한다.

c) 출입 인원 통제 및 동선 조정

감염 확산 방지를 위해 출입 인원은 최소한으로 유지하도록 한다, 필수적인 인원 외에 동물실험시설 출입을 통제하고, 동선 및 출입 시간 등을 조정하여 사람을 통한 병원체의 전파 및 확산을 방지한다.

d) 추가 감염 여부 확인

감염이 확인된 후 시설 내 모든 동물 사육실에 대해 추가 검사를 실시하여 감염 여부를 확인하고 조치를 취해야 한다. 감염원의 종류에 따라 추가 감염 여부의 확인 및 검사의 범위 등이 조정될 수 있다. 해당 동물실험시설의 정보를 신속히 수집하고 동물 분양 및 동물 이동 상황을 추적하여 추가 감염 확률이 높은 동물실험시설의 경우 우선적으로 검사를 실시한다.

e) 기타 구역 관리

기타 추가적으로 감염이 우려되는 장소(예: 준비실 등)에 대해 필요 시 인원 통제 및 소독을 실시한다.

f) 소독과 멸균

해당 사육실과 사육실 내 모든 기구는 멸균을 실시하여야 한다. 공간 멸균은 과산화수소, 오존, 과초산 훈증 방법을 사용하며 해당 동물실험시설 내 복도, 실험 구역 등을 소독한다.

g) 재입실 평가

재입실 전 감염된 동물실 또는 실험 구역에 대해 소독, 멸균의 효과에 대한 평가(예: BI (Biological Indicator) test)와 공간에 대한 환경의 평가(낙하균 검사)를 실시해 재입실 여부를 결정한다.

③ 재발 방지

a) 감염 추적 평가

감염 전 3개월 동안의 동물도입, 동물 이동 및 출입 인원의 동선 등을 고려하여 원인 및 감염 발생 경로를 추정한다.

b) 감염 차단 대책 수립

원인에 대한 분석에 따라 동물도입, 관리 동선, SOP 변경 등 필요한 조치를 실시하여 감염의 추가 발생을 억제한다. 이후 지속적인 모니터링을 통해 감염 여부를 확인한다.

DNA virus

1. Ectromelia virus (Mousepox)	17
2. H-1 virus	19
3. K virus (Mouse pneumonitis virus)	21
4. Kilham rat virus (KRV)	23
5. Minute virus of mice (MVM)	25
6. Mouse adenovirus (MAV)	27
7. Mouse cytomegalovirus (MCMV)	29
8. Mouse parvovirus (MPV)	32
9. Mouse thymic virus (MTV)	33
10. Polyoma virus	35
11. Rat minute virus (RMV)	36
12. Rat parvovirus (RPV)	38

RNA virus

13. Hantavirus	39
14. Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)	42
15. Mouse hepatitis virus (MHV)	45
16. Sendai virus (HVJ)	47
17. Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV)	50
18. Mouse rotavirus (Epizootic diarrhea of infant mice, EDIM)	51
19. Murine norovirus (MNV)	53
20. Pneumonia virus of mice (PVM)	55
21. Rat coronavirus (Sialodacryoadenitis virus, SDAV)	57
22. Rat theilovirus (RTV)	58
23. Reovirus 3	60
24. Theiler's encephalomyelitis virus (TMEV)	61



바이러스 검사

DNA virus

1 Ectromelia virus (Mousepox)

가) 원인체 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목으로 Poxviridae과의 *Orthopoxvirus* 속에 속한다.

- a. 형태: 크고, 난원형 내지 벽돌 모양의 DNA 바이러스로 크기가 200~300 nm이다. 항원성 및 생리 화학적으로 variola virus (smallpox)보다는 vaccinia virus (cowpox)와 비슷하다.
- b. strain: 다수 있지만 Hampstead, Moscow, NIH-79를 연구용으로 사용하고 있다.
- c. 배양: embryonated chicken egg의 chorioallantoic membrane, HELA cells, mouse fibroblasts (L cells), chick embryo fibroblasts, BS-C-1 cell line에서 배양된다.
- d. 안전성: 실온에서 안정하며 특히 건조 상태에서 안정적이다.
- e. 최근까지 국내에서 발생한 사례가 없다.

(2) 임상증상: 3가지 감염 형태가 있다.

- a. 급성 폐사: 폐사하기 몇 시간 전에 털이 헝클어지거나 탈진 증상이 관찰되며 전신 장기에 다발성 괴사로 폐사된다.
- b. 만성 감염으로 낮은 정도 폐사: 급성 감염에서 살아남은 개체에서 관찰되며 피부에 국소적으로 또는 광범위하게 발진(rash)이 나타나는데 이는 수주내에 없어지거나 탈모 부위에 반흔이 있다.
- c. 결막염, 꼬리와 다리에 괴사 및 절단 등도 나타난다.

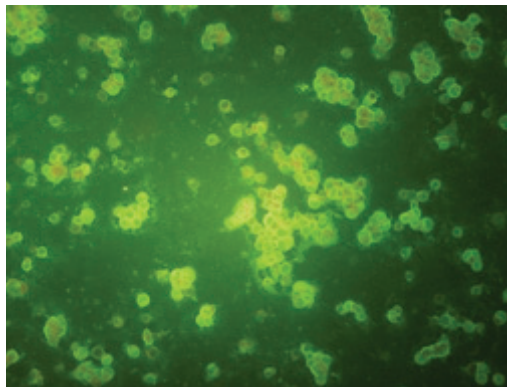
(3) 전파

- a. 자주 발생하지 않는 질병으로 피부 상처를 통한 직접 접촉을 통해 감염된다.
- b. 케이지 간 감염 가능성은 낮다.
- c. 자궁 내 감염과 태아 사망이 보고된다.

- d. 감수성 및 임상증상이 심한 마우스는 A, BC, BALB/c, CBA, C3H/He, DBA/1, DBA/2이며, 중정도 마우스는 AKR, SJL이고, 불현성 감염을 나타내는 마우스는 C57BL/6이다.
- e. 피부병변이 생길 정도의 저항성이 있는 마우스는 보통 3주 정도 바이러스를 배출한다.
- f. 16주까지 딱지나 분변에서 바이러스가 검출되는 경우도 있다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: Ectromelia virus의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. Ectromerilia virus 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
 - d. IFA 검사 방법에 의한 Ectromelia virus의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 피부²⁾
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.

2) https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/EctromeliaVirusMousepoxTechnicalSheet.pdf

c. PCR³⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: ATA CAA AGT CCA TGA TAA T

(b) Reverse: ACT CTA GAA GTT TAC ACA

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94°C	10 min
30 cycles	94°C	1 min
	50°C	1 min
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	3 min

(b) PCR 결과: 양성은 116 bp

2 H-1 virus

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 랫드의 검사항목으로 Parvoviridae과의 *Parvovirus*속에 속한다.

a. 형태: 작고 envelope이 없는 DNA 바이러스로 직경이 18~22 nm이다.

b. 배양: SV40-transformed human new-born kidney (324K) cells, newborn rat kidney (NRK) cells, baby hamster kidney (BHK-21) cells에서 배양된다.

(2) 임상증상

a. 무증상 감염된다.

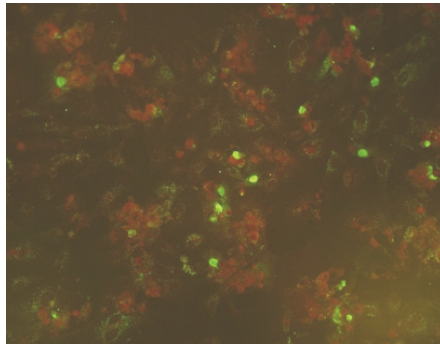
(3) 전파

a. 뇨와 유즙을 통해 바이러스를 배출하고, 직접 접촉, fomites 및 aerosol을 통해 전파된다.

3) Neubauer, H., Pfeffer, M., Meyer, H. (1997). Specific detection of mousepox virus by polymerase chain reaction. *Laboratory Animals*, 31(3), 201-205.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: H-1 virus의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. H-1 virus 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
 - d. IFA 검사 방법에 의한 H-1 virus의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 장간막 림프절⁴⁾
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁵⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: CTA GCA ACT CTG CTG AAG GAA CTC
 - (b) Reverse: TAG TGA TGC TGT TGC TGT ATC TGA TG

4) <https://dora.missouri.edu/rats/parvoviruses-rv-h-1-rmv-and-rpv-1a/>

5) Besselsen, D. J., Besch-Williford, C. L., Pintel, D. J., Franklin C. L., Hook, R. R., Jr., Riley, L. K. (1995). Detection of H-1 parvovirus and Kilham rat virus by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1699-1703.

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	30 sec
30 cycles	94℃	2 sec
	55℃	2 sec
	72℃	30 sec
1 cycle	72℃	3 min

(b) PCR 결과: 양성은 254 bp

3 K virus (Mouse pneumonitis virus)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목이며 Papovaviridae과의 *Polyomavirus*속에 속한다.

- 형태: 작고, envelope이 없는 DNA 바이러스로서, 지름이 45 nm이다.
- 배양: mouse embryo cell에서 배양된다.
- 과거에 발생하였으나 최근 국내에서 발생한 사례가 없다.

(2) 임상증상

- 일반 마우스에서는 임상증상이 관찰되지 않는다.
- 어린 마우스나 누드 마우스에서는 호흡곤란이 관찰된다.

(3) 전파

- 마우스만 자연 감염되며 감염된 마우스의 분변을 섭취함으로써 감염된다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: K virus의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. K virus 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 ‘ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법’을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 ‘IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법’을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 폐⁶⁾
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁷⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: CCA CTC CAT CAT AAA TCC
 - (b) Reverse: ACT AAC ACT ACT ACC ACA ATC C
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
40 cycles	94℃	2 sec
	53℃	3 sec
	72℃	45 sec
1 cycle	72℃	3 min

- (b) PCR 결과: 양성은 282 bp

6) https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/PolyomaVirusesTechnicalSheet.pdf

7) Carty, A. J., Franklin C. L., Riley, L. K., Besch-Williford, C. (2001). Diagnostic polymerase chain reaction assays for identification of murine polyomaviruses in biological samples. *Comparative Medicine*, 51(2), 145-149.

4 Kilham rat virus (KRV)

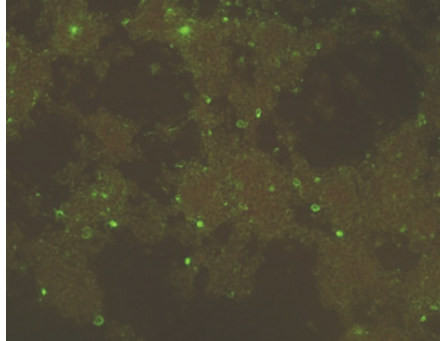
가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 랫드의 검사항목으로 Parvoviridae과 *Parvovirus* 속에 속한다.
 - a. 형태: 작고 envelope이 없는 DNA 바이러스로 직경이 18~22 nm이다.
 - b. 배양: SV40-transformed human new-born kidney (324K) cells, newborn rat kidney (NRK) cells, baby hamster kidney (BHK-21) cells에서 배양된다.
- (2) 임상증상
 - a. 출생 전 또는 출생 후 초기에 폐사가 관찰되며, 산자 수 감소와 저체중이 관찰된다.
 - b. 이유 후 랫드에서는 무증상 감염이 특징이지만, 발병 시에는 뇌, 고환, 부고환의 출혈 및 괴사가 관찰된다.
- (3) 전파
 - a. 노와 유즙을 통해 바이러스를 배출하고, 직접 접촉, fomites 및 aerosol을 통해 전파된다.
 - b. 신생 랫드에 실험 감염시키면 바이러스가 14주 이상 조직 내에 존재하며, 10주 이상 다른 랫드를 감염시킬 수 있다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: KRV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. KRV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 KRV의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 간, 신장, 췌장⁸⁾
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁹⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GCA CAG ACA ACC AAA CAG GAA CTC TCC
 - (b) Reverse: GCA CAG ACA ACC AAA CAG GAA CTC TCC
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	94℃	30 sec
35 cycles	94℃	2 sec
	55℃	2 sec
	72℃	30 sec
1 cycle	72℃	3 min

(b) PCR 결과: 양성은 281 bp

8) Taylor, K., & Copley, C. G. (1994). Diagnosis of Kilham rat virus using PCR. *Laboratory Animals*, 28(1), 26-30.

9) Besselsen, D. J., Besch-Williford, C. L., Pintel, D. J., Franklin C. L., Hook, R. R., Jr., Riley, L. K. (1995). Detection of H-1 parvovirus and Kilham rat virus by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(7), 1699-1703.

5 Minute virus of mice (MVM)

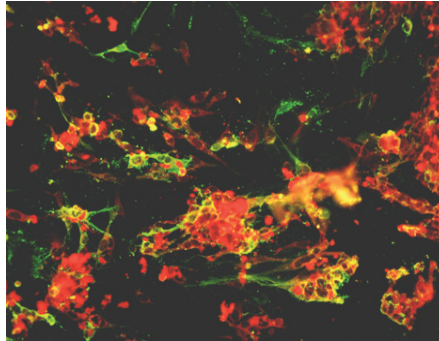
가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목이며 Parvoviridae과의 *Parvovirus* 속에 속한다.
 - a. 형태: 작고, envelope이 없는 DNA 바이러스로서 지름이 20~25 nm이다.
 - b. strains: Prototype strain인 MVMP, immunosuppressive strain인 MVMI, 그리고 MVMC, MVMM이 있다.
 - c. 배양: mouse fibroblasts (A9 cells), C6 rat glial cell, SV40-transformed human new-born kidney (324K) cells, T cell lymphomas (EL4)에서 배양된다.
- (2) 임상증상
 - a. 자연 감염되면 임상증상이 관찰되지 않는다.
 - b. MVMI를 감수성 있는 마우스에 실험 감염시키면 신장의 출혈과 장 출혈로 폐사한다.
 - c. 실험 감염시킨 SCID 마우스와 자연 감염된 B cell 결손 마우스는 폐사된다.
- (3) 전파
 - a. 마우스에만 자연 감염되며 중정도 감염력이 있다.
 - b. 장관에 감염되며 분변과 뇨를 통해 바이러스를 배출하고, 전염은 구강과 비강을 통해 또는 이식된 종양을 통해 이루어진다.
 - c. 성숙한 정상 마우스에서의 감염은 3주 이내 지속되었다가 없어지며, 구강 또는 비강으로 감염시킨 신생 마우스에서도 1달 이내만 감염이 지속된다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: MVM의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. MVM 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 MVM의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 뇨¹⁰⁾
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR¹¹⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GGG GTT GGT GTT TCT ACT GG
 - (b) Reverse: TCC ATG TCT GCT CCC TTG AG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
35 cycles	94℃	1 min
	52℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	3 min

10) <https://zoologix.com/rodent/Datasheets/MouseMinute&Parvovirus.htm>

11) 건국대 제공

(b) PCR 결과: 양성은 834 bp¹¹⁾



6 Mouse adenovirus (MAV)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스와 랫드의 검사항목이며 Adenoviridae과의 *Mastadenovirus* 속에 속한다.

- a. 형태: envelope이 없는 DNA 바이러스로서 지름이 67~74 nm이다.
- b. strain: mouse adenovirus-1 (strain FL)과 mouse adenovirus-2 (strain K87)가 있다.
- c. 배양: mouse kidney cell과 CMT-93 mouse rectal carcinoma cell에서 배양된다.

(2) 임상증상

- a. Mouse adenovirus-1 (strain FL): 신생 마우스에 실험 감염시키면 무기력, 성장 정체로 종종 10일 이내에 폐사한다. 누드 마우스에 감염되면 소모성 질환이 나타난다.
- b. Mouse adenovirus-2 (strain K87): 장 친화성이며, 대부분의 자연 감염은 K87에 의한다. 자연 감염시 정상 마우스는 임상증상이 관찰되지 않지만, 신생 마우스는 일시적으로 성장이 정체된다.

(3) 전파

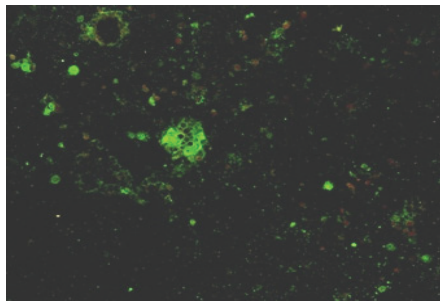
- a. 마우스에서 감염률은 낮으며 구강으로 전염되며, 랫드에서는 항체가 확인되나 감염 예는 거의 없다.

- b. Mouse adenovirus-1 (strain FL)을 성숙 마우스에 실험 감염시키면 지속 감염되며 장기간 뇨를 통해 바이러스가 배출된다.
- c. Mouse adenovirus-2 (strain K87)을 성숙 마우스에 실험 감염시키면 적어도 3주 동안 분변을 통해 바이러스가 배출되고 회복된다. 누드 마우스에 감염시키면 적어도 6주, 최대 6개월 동안 바이러스를 배출한다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: MAV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. MAV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- d. IFA 검사 방법에 의한 MAV의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR¹²⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TGA CGG TGT AGA GGA CGA CA
 - (b) Reverse: GCC CAT TTC CTA ATA TCT GGG ACC G

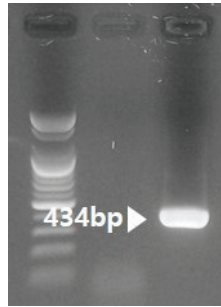
12) 건국대 제공

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
35 cycles	94℃	1 min
	59℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 434 bp¹²⁾



7 Mouse cytomegalovirus (MCMV)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목이며 Herpesviridae과의 *Betaherpesvirus* 속에 속한다.

- 형태: 크고, envelope이 있는 DNA 바이러스로서 지름이 175~200 nm이다.
- 배양: 마우스(fibroblast, 3T3 cell), 햄스터, 토끼, 양, 영장류에서 기원한 세포에서 배양된다.
- 야생 마우스가 보균자이다.

(2) 임상증상

- 성숙한 정상 마우스는 임상증상이 관찰되지 않는다.
- 신생 마우스에 실험 감염시키면 전신 장기의 괴사와 염증으로 폐사한다.

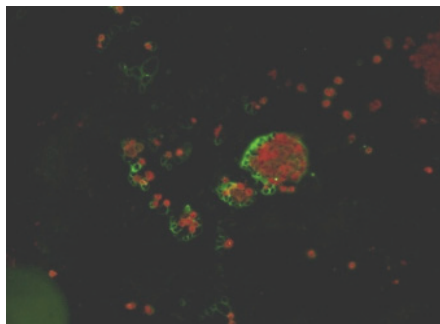
(3) 전파

- a. 실험 마우스에는 감염이 흔하지 않으며 접촉을 통해 전염된다.
- b. 연령이 증가함에 따라 바이러스의 병원성은 감소한다. 신생 마우스에서는 감수성이 증가하여 폐사하기도 하지만, 이유 후 질병에 대한 저항성이 증가한다.
- c. 면역 결핍 마우스는 성숙 마우스에서도 감수성이 강하다.
- d. 지속 감염되며 타액, 뇨, 눈물을 통해 바이러스를 몇 달 동안 배출한다.
- e. 전립선, 고환, 췌장에도 감염된다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: MCMV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. MCMV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- d. IFA 검사 방법에 의한 MCMV의 형광 현미경 사진



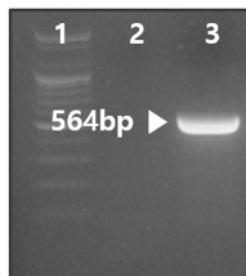
(2) PCR법

- a. Target Tissue : 침샘
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. Nested PCR¹³⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) 1st Forward: CTA GCC AAT GAT ATC TTC GAG CG
 - (b) 1st Reverse: ACA CCC TTA GAA AAG GGG ATT
 - (c) 2nd Forward: AAA GAC AAC GCA AGA TGA TAT ACG
 - (d) 2nd Reverse: TCA GAT CAG CTA AGG TAG CCA AG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 nested PCR을 실시한다.
 - (a) 1st PCR 조건

1 cycle	95°C	5 min
25 cycles	95°C	1 min
	54.9°C	1 min
	70°C	1 min
1 cycle	70°C	1 min

(b) 2nd PCR 조건

1 cycle	95°C	5 min
35 cycles	95°C	1 min
	56°C	1 min
	70°C	1 min
1 cycle	70°C	1 min

(c) PCR 결과: 양성은 564 bp¹³⁾

13) 건국대 제공

8 Mouse parvovirus (MPV)

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목이며, Parvoviridae과의 *Parvovirus* 속에 속한다.
 - a. 형태: 작으며, envelope이 없는 DNA 바이러스이다.
 - b. 배양: 배양이 어려우며, immortalized T cell (L3 cells), lymphoma (EL4)에서 배양된다.
- (2) 임상증상
 - a. 신생 마우스, 성숙한 정상 마우스, 성숙한 면역 결핍 마우스에서 임상증상이 관찰되지 않는다.
- (3) 전파
 - a. 마우스에만 자연 감염되며 MVM의 감염보다 흔하다.
 - b. 감염되고 분변을 통해 바이러스를 배출하며 구강과 비강을 통해 전염된다.
 - c. 어린 마우스와 성숙한 마우스에서 지속적으로 감염된다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: MPV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. MPV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- (2) PCR법
 - a. Target Tissue : 분변, 췌장, 소장¹⁴⁾
 - b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.

14) <https://www.criver.com/products-services/research-models-services/research-animal-diagnostics/infectious-agent-pria-testing/mouse-parvoviruses?region=3701>

c. PCR¹⁵⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: GCA GCA ATG ATG TAA CTG AAG CT

(b) Reverse: CCA TCT GCC TGA ATC ATA GCT AA

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95°C	4 min
40 cycles	94°C	10 sec
	55°C	10 sec
	72°C	30 sec
1 cycle	72°C	7 min

(b) PCR 결과: 양성은 260 bp

9 Mouse thymic virus (MTV)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목이며 Herpesviridae과에 속한다.

a. 형태: 크고, envelope이 있는 DNA 바이러스로서, 지름이 125~165 nm이다.

b. 배양: 유용한 *in vitro* method가 없다.

(2) 임상증상

a. 자연 감염 시 임상증상이 관찰되지 않는다.

(3) 전파

a. 마우스에만 자연 감염되며, 구강을 통해 전염된다.

15) Bauer, B. A., & Riley, L. K. (2006). Antemortem detection of mouse parvovirus and mice minute virus by polymerase chain reaction (PCR) of faecal samples. *Laboratory Animals*, 40(2), 144-152.

- b. 모든 연령에 감염되며, 분만 후 1주 이내에 감염될 때만 병변을 나타내고, 다른 연령에서는 침샘에서 지속 감염된다.
- c. 타액을 통해 바이러스 배출하여 전염되며 항체가 형성된 후에도 바이러스를 배출한다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: MTV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. MTV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 ‘ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법’을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 ‘IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법’을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 침샘, 가슴샘¹⁶⁾
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR¹⁷⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: CTT TGT AGT AGT CAG AGG AGC C
 - (b) Reverse: CAC GAC TTC CTA TAC TGG TG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	3 min
35 cycles	95℃	30 sec
	53℃	30 sec
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 215 bp

16) https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/MouseThymicVirusTechnicalSheet.pdf

17) 건국대 제공

10 Polyoma virus

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목이며 Papovaviridae과의 *Polyomavirus* 속에 속한다.

- 형태: 소형의 envelope이 없는 DNA 바이러스이며 지름이 45 nm이다.
- 배양: mouse 3T3과 3T6 fibroblast cell에서 배양된다.

(2) 임상증상

- 정상 마우스에서는 임상증상이 관찰되지 않는다.
- 면역 결핍 마우스에서는 종양 형성, 신경 질환, 체중 감소 등이 관찰된다.

(3) 전파

- 마우스에만 자연 감염되고 비강을 통해 전염되며 전염성이 강하다.
- 출생 후에 감염되면 바이러스는 뇨, 분변, 타액을 통해 배출되고, aerosol을 통해 비강 내로 전염된다. 자궁 내 감염과 신장에 지속적으로 감염되어 신생 마우스가 감염되며, 감염된 신생 마우스는 전신의 바이러스 혈증으로 높은 폐사율을 나타낸다. 생존한 신생 마우스는 지속적인 감염에 의해 장기간 폐장, 신장에서 바이러스가 증식 후 배출된다.
- 성숙한 일반 마우스에 감염되면 일반적으로 항체가 형성되어 빠르게 바이러스 제거된다.
- 감염된 tumor cell line을 통해서도 쉽게 전염된다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: Polyoma Virus의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- Polyoma virus 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 자궁, 폐장, 신장, 분변
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR¹⁸⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TGA TGC CAG GTG CCT AGT AC
 - (b) Reverse: CAT CGT GTA GTG GAC TGT GG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
40 cycles	94℃	2 sec
	57℃	3 sec
	72℃	45 sec
1 cycle	72℃	3 min

(b) PCR 결과: 양성은 272 bp

11 Rat minute virus (RMV)

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 랫드의 검사항목으로 Parvoviridae과 *Parvovirus* 속에 속한다.
 - a. 형태: 작고 envelope이 없는 DNA 바이러스로 직경이 18~22 nm이다.
 - b. 배양: SV40-transformed human new-born kidney (324K) cell, newborn rat kidney (NRK) cell, baby hamster kidney (BHK-21) cell에서 배양된다.
- (2) 임상증상
 - a. 무증상 감염된다.

18) Carty, A. J., Franklin C. L., Riley, L. K., Besch-Williford, C. (2001). Diagnostic polymerase chain reaction assays for identification of murine polyomaviruses in biological samples. *Comparative Medicine*, 51(2), 145-149.

(3) 전파

- a. 노와 유즙을 통해 바이러스를 배출하고, 직접 접촉, fomites 및 aerosol을 통해 전파된다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: RMV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. RMV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변
 b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
 c. PCR¹⁹⁾
 a) PCR primer 작성
 (a) Forward: ACT GAG AAC TGG AGA CGA ATT C
 (b) Reverse: GGT CTC AGT TTG GCT TTA AGT G
 b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 (a) PCR 조건

1 cycle	95°C	1 min
40 cycles	94°C	3 sec
	55°C	3 sec
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	3 min

- (b) PCR 결과: 양성은 843 bp

19) Wan, C., Bauer, B. A., Pintel, D. J., Riley, L. K. (2006). Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction. *Laboratory Animals*, 40(1), 63-69.

12 Rat parvovirus (RPV)

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 랫드의 검사항목으로 Parvoviridae과 *Parvovirus* 속에 속한다.
 - a. 형태: 작고 envelope이 없는 DNA 바이러스로 직경이 18~22 nm이다.
 - b. 배양: SV40-transformed human new-born kidney (324K cells), newborn rat kidney (NRK) cell, baby hamster kidney (BHK-21) cell에서 배양된다.
- (2) 임상증상
 - a. 무증상 감염된다.
- (3) 전파
 - a. 노와 유즙을 통해 바이러스를 배출하고, 직접 접촉, fomites 및 aerosol을 통해 전파된다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: RPV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. RPV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- (2) PCR법
 - a. Target Tissue : 분변²⁰⁾
 - b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.

20) https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/RatParvovirusTechnicalSheet.pdf

c. PCR²¹⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: CGC ACA TGT AGA ATT TTT GCT G

(b) Reverse: CAA AGT CAC CAG GCA ATG TGT T

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94°C	1 min
35 cycles	94°C	3 sec
	60°C	3 sec
	72°C	30 sec
1 cycle	72°C	3 min

(b) PCR 결과: 양성은 487 bp

13 Hantavirus

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스와 랫드의 검사항목이며, Bunyaviridae과의 *Hantavirus* 속에 속한다.

a. 형태: 구형 내지 난원형으로 envelope이 있는 RNA 바이러스이며, 평균 지름이 120~160 nm이다.

b. Strains

- ① Hantaan virus: 한국의 *Apodemus agrarius* (등줄쥐)로부터 분리되었으며, 한국, 일본, 중국에서 hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS)의 severe form의 원인체이다.
- ② Seoul virus: 서울의 Norway rat (*Rattus norvegicus*)에서 분리되었으며 한국, 일본, 중국에서 HFRS의 mild form의 원인체이며 대부분 실험용 랫드에서 분리된다.

21) Wan, C., Bauer, B. A., Pintel, D. J., Riley, L. K. (2006). Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction. *Laboratory Animals*, 40(1), 63-69.

- ③ Dobrava-Belgrade virus: *Apodemus flavicollis* (노란목들쥐)에서 분리되었으며, 유럽의 발칸반도에서 HFRS의 severe form의 원인체이다.
- ④ Puumala virus: Scandinavia의 *Clethrionomys glareolus* (대륙밭쥐)에서 분리되었으며, 유럽에서 HFRS의 mild form의 원인체로 nephropathia epidemica를 유발한다.
- ⑤ Sin Nombre virus: 미국의 deer mouse (*Peromyscus maniculatus*)에서 분리되었으며, 미국과 캐나다에서 고병원성으로 HPS (Hantavirus pulmonary syndrome)를 유발한다.
- ⑥ Black Creek Canal virus: 미국의 cotton rat (*Sigmodon hispidus*, 목화쥐)에서 분리되었으며, 미국에서 고병원성으로 HPS를 유발한다.

(2) 임상증상

- a. 지속 감염되어 실험용 설치류에서는 불현성 감염을 나타낸다.

(3) 전파

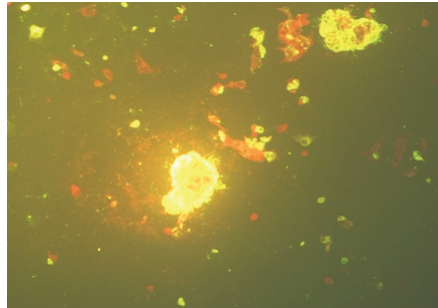
- a. 설치류에서 사람으로 전파는 직접 접촉 또는 감염된 설치류의 노나 분변에 접촉함으로써 이루어진다.
- b. 감염된 랫드의 뇨, 분변, 타액을 통해 일생동안 지속적으로 바이러스를 배출한다.
- c. 야생 마우스를 포함한 야생 설치류로부터 바이러스를 분리한 보고도 있다.
- d. 임상적으로 불현성 감염을 나타내기 때문에 실험용 설치류의 이환률과 폐사율은 0%이며, 감염률은 80% 이상이다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: Hantavirus의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. Hantavirus 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 Hantavirus의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

a. Target Tissue : 분변, 뇨, 타액²²⁾

b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.

c. Nested PCR²³⁾

a) PCR primer 작성

(a) 1st Forward: TAG TAGTAGACT CCC TAA AGA GCT ACT A

(b) 1st Reverse: TGT CCT GTA GGT TCA TCA ATG TCA AG

(c) 2nd Forward: AGC ACA ATC ACT GCC ATG TA

(d) 2nd Reverse: TAG TAGTAGGCT CCC TAA AAA GAC AA

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 nested PCR을 실시한다.

(a) 1st PCR 조건

1 cycle	94°C	2 min
35 cycles	94°C	30 sec
	50°C	30 sec
	68°C	2 min
1 cycle	68°C	10 min

22) Madai, M., Horváth, G., Herczeg, R., Somogyi, B., Zana, B., Földes, F., Kemenesi, G., Kurucz, K., Papp, H., Zeghib, S., Jakab, F. (2021). Effectiveness regarding hantavirus detection in rodent tissue samples and urine. *Viruses*, 13(4), 570.

23) Perwitasari, D., Ibrahim, I. N., Yasmon, A. (2014). Gene S characterization of hantavirus species Seoul virus isolated from *Rattus norvegicus* on an Indonesian island. *Health science Journal of Indonesia*, 5(1), 1-6.

(b) 2nd PCR 조건

1 cycle	94℃	2 min
35 cycles	94℃	30 sec
	50℃	30 sec
	68℃	2 min
1 cycle	68℃	10 min

(c) PCR 결과: 양성은 250 bp

14 Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, Arenaviridae과의 *Arenavirus* 속에 속한다.

- 형태: 구형 내지 다형태의 envelope이 있는 RNA 바이러스로서 지름이 60~300 nm이다.
- 배양: 다양한 mammalian cell line, avian cell line, insect cell line, Vero, L-929, BHK-21 cells에서 배양된다.
- 전 세계 야생 마우스가 자연 보균자이다.
- 마우스와 햄스터는 교차 감염되고 햄스터로부터 사람으로 전파된다.
- 면역 결핍된 마우스에서 지속 감염 시 사람으로 전파 가능하다.

(2) 임상증상: 4가지 형태가 있다.

- 실험 감염시키면 cerebral form, visceral form, runting and death, late-onset disease의 4가지 형태가 관찰된다.
 - Cerebral form: 일반마우스에서 대뇌 접종 5~6일 후에 털이 곤두서고, 등을 활처럼 구부리고, 운동실조, 두부나 사지의 진전을 동반하는 간헐적 경련, 후지의 강직성 진전 후 죽거나 회복된다.
 - Visceral form: Viscerotropic strain을 peripheral route로 접종한 성숙 마우스에서 무증상이거나 털이 곤두서고, 결막염, 복수, 비몽사몽 등의 임상증상이 나타나다가 죽거나 회복된다.

- ③ Runting and death: 임신 중에 감염된 이유 전 마우스에서 관찰되며, 일시적으로 비특이적인 임상증상을 나타내거나 폐사된다. 회복이 느리고 체중이 증가하지 않는다.
 - ④ Late-onset disease: 임상증상이 없는 보균 마우스에서 관찰되며, immune complex glomerulonephritis가 유발된다. 출생 전 또는 신생 마우스 시기에 감염되어 9~12개월까지 감염이 지속되며, 털이 곤두서거나, 구부리는 자세, 체중 감소, 단백뇨, 복수 등의 임상증상이 관찰된다.
- b. 자연 감염되면 일반 마우스는 무증상 감염된다.
 - c. 자궁을 통해 수직 감염되면 낮은 비율로 태아 사망이 관찰된다.

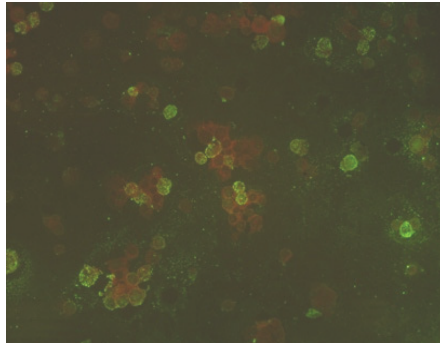
(3) 전파

- a. 마우스, 햄스터가 주요 감염 동물이지만, 자연 감염은 기니피그, 원숭이, 사람에서, 실험 감염은 랫드, 개, 돼지, 토끼, 말, 닭에서 보고되었다. 그러나 마우스, 햄스터만이 타 동물 종에의 감염원이 될 수 있다.
- b. 출생 전 또는 출생 후의 감염에 의해 나타나는 임상증상이 없는 보균 마우스는 타액, 콧물, 뇨 등을 통해 바이러스를 배출한다.
- c. 성숙 마우스는 급성 감염된다.
- d. 인수 공통 전염병으로 마우스와 햄스터 간의 상호 감염, 햄스터와 사람 간의 상호 감염이 관찰된다. 마우스에서 햄스터로 감염이 이루어지고 햄스터에서 사람으로 감염이 이루어진다.
- e. 생물학적 매개체를 통한 감염이 흔하다.
- f. 성숙 마우스가 감염되면 면역에 의해 바이러스 배출이 억제된다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: LCMV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. LCMV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 LCMV의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 신장, 뇌²⁴⁾
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 ‘RNA 추출법’을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR²⁵⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TTA CCA CAC CACTTG CAC CCT
 - (b) Reverse: GTC TTG AGA AAC CAT TGA GCA ACA
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 nested PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	94℃	2 min
35 cycles	94℃	15 sec
	53℃	30 sec
	68℃	1 min
1 cycle	68℃	3 min

(b) PCR 결과: 양성은 1,077 bp

24) <https://mus.brc.riken.jp/en/protocol/microbiological/lcmv-rt-pcr2006>

25) Wen, Y., Xu, H., Wan, W., Shang, W., Jin, R., Zhou, F., Mei, H., Wang, J., Xiao, G., Chen, H., Wu, X., Zhang, L. (2022). Visualizing lymphocytic choriomeningitis virus infection in cells and living mice. *iScience*, 25(10), 105030.

15 Mouse hepatitis virus (MHV)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목으로 Coronaviridae과의 *Coronavirus* 속에 속한다.

- a. 형태: 크고, 다형성이며, envelope를 가지고 있는 RNA 바이러스로서 직경이 80~160 nm이다.
- b. strain: MHV-1, MHV-3, MHV-4 (JHM), MHV-S, MHV-A59 등 5개의 prototype strain이 있다. Enterotropic strain은 최초 장관에 감염되며, polytropic strain은 최초 호흡기에 감염된 후 전신 감염되며, 장관과 호흡기에 감염은 both biotype이 있다.
- c. 배양: NCTC 1469 mouse liver cell은 polytropic strains의 배양에 사용되고, CMT-93 cell은 enterotropic strains의 배양에 사용된다. 배양 시 합포체 (syncytium)가 형성되는데 이는 MHV 감염의 상징적 소견이다.

(2) 임상증상

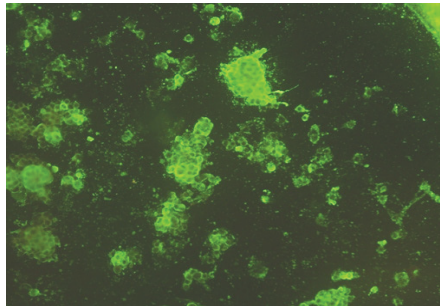
- a. 마우스의 연령과 strain, 면역상태, 바이러스의 strain에 따라 다르게 나타난다.
- b. 장 친화성 strain에 감염된 2주 이하의 신생 마우스는 식욕부진, 설사, 탈수가 있고 드물게 폐사한다(번식 집단의 신생 마우스는 100% 폐사하기도 함).
- c. 장 친화성 strain에 감염된 2~3주령 마우스는 피모가 거칠고, 성장 정체가 관찰된다.
- d. 신경 친화성 strain에 감염되면 후지의 이완성 마비, 결막염, 경련, circling이 나타난다.
- e. 병원성이 약한 strain에 감염된 누드 마우스는 진행성 마비를 동반하는 progressive wasting syndrome이 나타난다.

(3) 전파

- a. 전염성이 매우 높으며 호흡기와 구강을 통해 자연 감염된다.
- b. 분변, 비인두 삼출이 감염의 원인이다.
- c. 수직 감염은 관찰되지 않으며 생물학적 매개체가 주요 감염원이다.
- d. 모성면역이 동종의 MHV 감염은 예방할 수 있으나 항원적으로 다른 strain은 예방할 수 없다.
- e. 마우스 strain에 따라 감수성의 차이가 있으나 이는 바이러스 strain에 따라 다르다. 즉 어떤 바이러스 strain에 감수성이 있는 마우스 strain이 다른 바이러스 strain에는 저항성을 나타낼 수 있다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: MHV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. MHV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
 - d. IFA 검사 방법에 의한 MHV의 형광 현미경 사진



- (2) PCR법: 항체가 형성되기 전인 감염 초기 및 면역 부전 동물에서 MHV의 검사법으로 사용된다.
 - a. Target Tissue : 간장, 폐장, 뇌, 대장²⁶⁾
 - b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.
 - c. PCR²⁷⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GAA GTA GAT AAT GTA AGC GT
 - (b) Reverse: TTA CAC ATT AGA GTC ATC TTC

26) 실험동물의 품질관리(설치류편-미생물학)

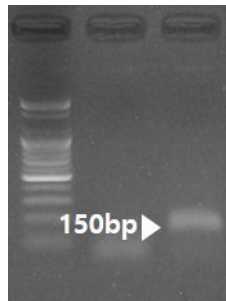
27) 건국대 제공

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	15 sec
35 cycles	94℃	3 sec
	50℃	10 sec
	72℃	20 sec
1 cycle	72℃	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 150 bp²⁷⁾



16 Sendai virus (HVJ)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스와 랫드의 검사항목이며 Paramyxoviridae과의 *Respirovirus*속에 속한다. 항원성은 human parainfluenza virus 1과 비슷하다.

- 형태: 구형 또는 다형태이며, envelope이 있는 RNA 바이러스로서 지름이 150~200 nm이다.
- 배양: embryonated hens' egg, monkey kidney cell, baby hamster kidney (BHK-21) cell, mouse fibroblast cell에서 배양된다.

(2) 임상증상

- 감수성 있는 성숙 마우스는 털이 곤두서거나, 등을 구부리는 자세, 빠른 체중 감소, 호흡 곤란, chattering sound 등이 관찰되며 신생 마우스는 일반적으로 폐사한다.

- b. 면역 결핍 또는 억제 마우스는 wasting syndrome으로 발전한다.
- c. 랫드에서는 임상증상이 관찰되지 않고, 산자 수 감소, 체중 정체 등이 관찰되지만 호흡기 병변은 거의 없다.
- d. 다른 호흡기 질병을 나타내는 병원체와 중복 감염에 의해 임상증상 및 병변이 심해진다.

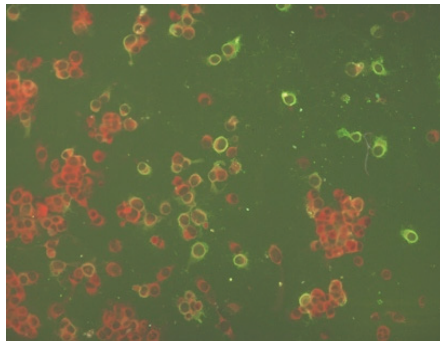
(3) 전파

- a. 전염성이 매우 높으며, aerosol 및 직접 접촉에 의해 호흡기를 통해 전염된다.
- b. 발병률은 100%이나 폐사율은 감수성에 따라 0~100%이다. 감수성이 높은 마우스는 DBA/2이고, 감수성 낮은 마우스는 C57BL/6이다.
- c. 정상 마우스에는 지속 감염되지 않지만 면역 결핍 마우스에는 지속 감염된다.
- d. 신생 마우스와 최근에 이유한 마우스가 가장 감염에 민감하고 폐사율이 높다.
- e. 이유 후 5~7주령 된 동물에서 바이러스가 전파되고, 감염 후 7~14일 내에 항체가 형성되어 바이러스가 없어진다.
- f. 마우스, 랫드, 햄스터, 기니피그에 감염된다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: HVJ의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. HVJ 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- d. IFA 검사 방법에 의한 HVJ의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 기관, 폐²⁸⁾
 b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.
 c. PCR²⁹⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: GCA CAG TCT CAG TGT TCG TAC TAG G

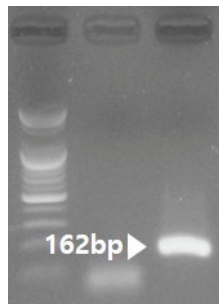
(b) Reverse: CTG GAC TAC TGT AAG CCA TG

- b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95°C	3 min
39 cycles	95°C	10 sec
	56°C	10 sec

- (b) PCR 결과: 양성은 162 bp²⁹⁾



28) https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/SendaiVirusTechnicalSheet.pdf

29) 건국대 제공

17 Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목으로 Arteriviridae과에 속한다.

- a. 형태: RNA 바이러스로서 직경이 50~55 nm이다.
- b. 야생 마우스에서 감염이 관찰되고 실험 마우스에서 감염은 거의 없다.

(2) 임상증상

- a. 일반 마우스에서는 임상증상이 관찰되지 않지만 혈중 LDH (lactate dehydrogenase)가 증가한다.
- b. 면역 억제된 C58, AKR 마우스에 실험 감염하면 poliomyelitis가 유발된다.

(3) 전파

- a. 마우스에만 자연 감염되며, 교상이나 상처를 통해 전파된다.
- b. 케이지 내에서 전파는 어려우며, 감염되면 분변, 뇨, 유즙, 타액 등으로 바이러스를 배출한다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: LDV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. 혈청 분리
- b. 혈청 중의 LDH (lactate dehydrogenase)를 생화학분석기를 이용하여 측정한다.
- c. LDV에 감염되면 SJL/J mouse에서는 정상보다 LDH가 15~20배 증가한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 뇨³⁰⁾
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.

30) Luchins, K. R., Mailhiot, D., Theriault, B. R., Langan, G. P. (2020). Detection of lactate dehydrogenase elevating virus in a mouse vivarium using an exhaust air dust health monitoring program. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 59(3), 328-333.

c. PCR³¹⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: TGT GAC CGG TCA ACC CCG GC

(b) Reverse: GGT TTG TCA TCAGGA GAT CC

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94°C	90 sec
40 cycles	52~58°C	1 min
	72°C	150 sec
	95°C	75 sec
1 cycle	52-58°C	1 min
1 cycle	72°C	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 507 bp

18

Mouse rotavirus (Epizootic diarrhea of infant mice, EDIM)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목이며 Reoviridae과의 *Rotavirus* 속에 속한다.

a. 형태: envelope이 없는 RNA 바이러스로서 지름이 70~75 nm이다.

b. 배양: embryonic monkey kidney cell에서 배양된다.

(2) 임상증상

a. 2주 이하의 신생 마우스에 나타나며 복부 팽만과 회음부(심한 경우 전신)에 분변이 동반된 설사, 일시적인 체중 감소가 관찰된다. 발병률은 높으나, 폐사율은 낮다. 감염 후 2주 후에 회복되고, 체중도 회복된다.

b. 정상 마우스는 임상증상이 관찰되지 않는다.

31) Chen, Z., & Plagemann, P. G. (1997). Detection of lactate dehydrogenase-elevating virus in transplantable mouse tumors by biological assay and RT-PCR assays and its removal from the tumor cell. *Journal of Virological Methods*, 65(2), 227-236.

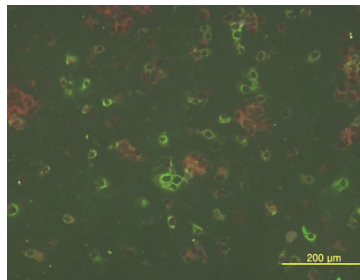
(3) 전파

- a. 마우스에만 자연 감염되며 신생 마우스 사이에는 전염성이 높다.
- b. 구강을 통해 전염되며 감염된 성숙 마우스는 최소 17일 동안 분변으로 바이러스를 배출한다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: EDIM의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. EDIM 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- d. IFA 검사 방법에 의한 EDIM의 형광 현미경 사진



(2) PCR법³²⁾

- a. Target Tissue : 분변, 소장
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TTC CAC CAG GAA TGA ATT GGA C
 - (b) Reverse: GGT CCT CAC TTT ACC AGC ATG

32) Kordasti, S., Istrate, C., Banasaz, M., Rottenberg, M., Sjövall, H., Lundgren, O., Svensson, L.. (2006). Rotavirus infection is not associated with small intestinal fluid secretion in the adult mouse. *Journal of Virology*, 80(22), 11355-11361.

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95°C	5 min
35 cycles	94°C	15 sec
	54°C	30 sec
	72°C	30 sec
1 cycle	72°C	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 118 bp

19 Murine norovirus (MNV)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목이며 Calciviridae과의 *Norovirus*속에 속한다.

- 형태: envelope이 없는 RNA 바이러스로서 지름이 28~35 nm이다.
- 배양: RAW264.7 cell, microglial cell line에서 배양된다.

(2) 임상증상

- 면역이 정상인 마우스는 무증상 감염된다.
- C3H 마우스에 실험 감염시키면 약한 설사가 관찰된다.
- IFN γ , R receptor 또는 STAT1이 결손된 마우스에 감염되면 전신성 질환으로 높은 폐사율이 나타난다.
- 체중 감소, 거친 털, 등을 구부리는 자세가 관찰된다.

(3) 전파

- 분변을 통해 배출된 바이러스를 구강으로 섭취하여 감염된다.
- MNV는 환경에 저항성이 있어 soiled bedding을 사용하는 sentinel mouse에 쉽게 전염된다.
- 지속 감염되며 적어도 35~60일 동안 분변을 통해 바이러스를 배출한다.
- Macrophage, dendritic cell에 친화성이 있고 장, 장 림프 조직, 간, 비장에서 바이러스가 관찰된다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: MNV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

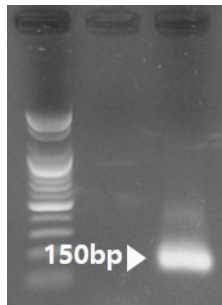
- a. MNV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 장
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR³³⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GAC TCG GCT GAG TTG AGG AAG T
 - (b) Reverse: GCT GTA GAA GGG CAG ATC TC
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	15 min
40 cycles	94℃	30 sec
	51.5℃	15 sec
	72℃	30 sec
1 cycle	72℃	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 150 bp³³⁾



33) 건국대 제공

20 Pneumonia virus of mice (PVM)

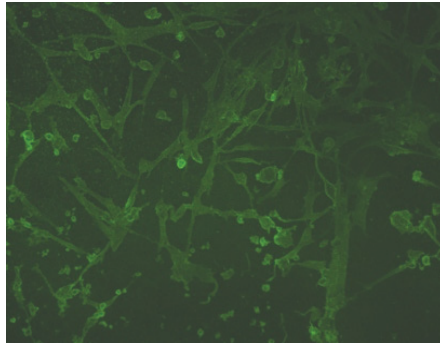
가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스와 랫드의 검사항목이며 Paramyxoviridae과의 *Pneumovirus* 속에 속한다.
 - a. 형태: 다형태이며 envelope이 있는 RNA 바이러스로서 지름이 80~200 nm이다.
 - b. 배양: baby hamster kidney (BHK-21)에서 배양된다.
- (2) 임상증상
 - a. 자연 감염 시 일반 마우스는 무증상이며, 면역 결핍 마우스는 호흡 곤란, 무관심, 체중 감소 등이 나타난다.
- (3) 전파
 - a. 호흡기를 통한 자연 감염은 마우스, 랫드, 햄스터에서 관찰되며 저빌, 기니피그, 토끼에서는 바이러스 분리 없이 항체 양성을 나타낸다.
 - b. 다른 호흡기 질병을 나타내는 병원체와 중복 감염에 의해 임상증상 및 병변이 심해진다.
 - c. 바이러스가 환경에서 빠르게 불활화되므로 자연 감염은 직접 접촉을 통해 이루어진다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: PVM의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. PVM 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 PVM의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 폐³⁴⁾
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 ‘RNA 추출법’을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR³⁵⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GGA CTT GAT GCT GTG GAA AGA AGG G
 - (b) Reverse: AAC TTG TCC TGC CCC GTA TG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	30 sec
	55℃	30 sec
	72℃	15 sec
1 cycle	72℃	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 237 bp

34) <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/murine-pneumonia-virus>

35) 건국대 제공

21

Rat coronavirus (Sialodacryoadenitis virus, SDAV)

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 랫드의 검사항목이며 Coronaviridae과의 *Coronavirus*에 속한다. Rat coronavirus (RCV)와 sialodacryoadenitis virus (SDAV)의 두 종류 prototype이 있다.
 - a. 형태: 크고, 다형태의 envelope이 있는 RNA 바이러스로서 지름이 60~200 nm이다.
 - b. 배양: rat mammary adenocarcinoma (LBC) line, mouse fibroblast (L2) line, rat bladder (RBL-02) line에서 배양된다.
- (2) 임상증상: 2가지 형태가 있다.
 - a. 이전에 감염이 있었던 번식 집단에서 모체는 산발적으로 임상증상이 발생하는데 이유 전 랫드는 결막염이 동반된 안구 질환이 발생한 후 1주 이내 사라진다.
 - b. 이유 후의 랫드는 submandibular salivary gland의 염증과 부종으로 인한 경부의 종창, 포피린 색소가 침착된 콧물과 눈물, photophobia, 결막 혼탁과 궤양이 나타났다가 2주 이내에 사라진다.
- (3) 전파
 - a. 전염성이 매우 높으며, 감염된 랫드의 직접 접촉, fomites 및 aerosol을 통해 전염된다.
 - b. 발병률은 높지만, 폐사율은 매우 낮다.
 - c. 감염 후 1주에 침샘, 눈물샘, Harderian gland, 호흡기 상피에 바이러스가 출현하고, 항체가 상승되며 항체는 6개월간 지속되었다가 감소해 재감염된다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: SDAV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. SDAV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 침샘, 눈물샘³⁶⁾
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 ‘RNA 추출법’을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR³⁷⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: AGA AAA CGC CGG TAG CAG AA
 - (b) Reverse: CCT TCC CGA GCC TTC AAC AT
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
40 cycles	95℃	10 sec
	59.1℃	20 sec
	72℃	36 sec
1 cycle	72℃	5 min

- (b) PCR 결과: 양성은 568 bp

22 Rat theilovirus (RTV)

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 랫드의 검사항목이며 Picornaviridae과의 *Cardiovirus* 속에 속한다.
 - a. 형태: envelope이 없는 RNA 바이러스로서 지름이 28~30 nm이다.
- (2) 임상증상
 - a. 자연 및 실험 감염 시 임상증상이 없다.

36) <https://www.criver.com/products-services/research-models-services/animal-health-surveillance/infectious-agent-information/sialodacryoadenitis-virus-sdav?region=3701>

37) Zeiss, C. J., Asher, J. L., Wyk, B. V., Allore, H. G., Compton, S. R. (2021). Modeling SARS-CoV-2 propagation using rat coronavirus-associated shedding and transmission. *PLoS One*. 16(11), e0260038.

(3) 전파

- a. 정상 랫드에 실험 감염시키면 장 상피에서 증식하고 4~8주 후에 바이러스를 분변으로 배출한다.
- b. 면역 부전 랫드에 감염시키면 분변을 통해 바이러스를 지속적으로 배출한다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: RTV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. RTV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변³⁸⁾
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR³⁹⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TGT AGC GAC CTC ACA GTA G
 - (b) Reverse: GGT CAA GAA GTA AAG GAG CC
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95°C	15 min
40 cycles	94°C	1 min
	49°C	1 min
	72°C	2 min
	72°C	10 min

- (b) 결과: 양성은 765 bp

38) Drake, M. T., Besch-Williford, C., Myles, M. H., Davis, J. W., Livingston, R. S. (2011). In vivo tropisms and kinetics of rat theilovirus infection in immunocompetent and immunodeficient rats. *Virus Research*. 160(1-2), 374-380.

39) Drake, M. T., Riley, L. K., Livingston, R. S. (2008). Differential susceptibility of SD and CD rats to a novel rat theilovirus. *Comparative Medicine*, 58(5), 458-464.

23 Reovirus 3

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스와 랫드의 검사항목이며 Reoviridae과의 *Orthoreovirus* 속에 속한다.

- a. 형태: envelope이 없는 RNA 바이러스로서 지름이 75 nm이다.
- b. strains: Reovirus 1, 2, 3이 있으며 자연 감염은 Reovirus 3에 의해 발생한다.
- c. 배양: baby hamster kidney (BHK-21) cell에서 배양된다.

(2) 임상증상

- a. 정상 마우스에서는 임상증상이 관찰되지 않는다.
- b. 이유 전 마우스는 수척, 복부 팽창, 지방성 설사로 인한 기름진 털, 황달이 관찰되고 높은 폐사율을 나타낸다. 폐사 직전에는 경련과 마비가 관찰되고, 회복기에는 바이러스 배출은 없으나 탈모, 체중 감소, 황달이 수 주 동안 지속된다.

(3) 전파

- a. 실험 마우스는 감염 보고가 거의 없고 신생 마우스 사이에는 전염성이 높지만, 성숙 마우스 사이에는 낮다.
- b. 랫드, 햄스터에서 항체가 확인되나 감염 예는 거의 없다.
- c. 분변을 통해 배설된 바이러스가 구강 및 aerosol을 통해 전염되고 이식된 종양 및 모기에 의한 전염도 보고되었다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: Reovirus 3의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. Reovirus 3 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변⁴⁰⁾
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR⁴¹⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TGA TTT CCA TTA CTT CTG CTGCTT
 - (b) Reverse: TCC TGT TCA CGA TTC CAT CAG AT
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
45 cycles	95℃	15 sec
	60℃	1 min
1 cycle	72℃	5 min

- (b) PCR 결과: 양성은 139 bp

24 Theiler's encephalomyelitis virus (TMEV)

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스와 랫드의 검사항목이며 Picornaviridae과의 *Cardiovirus*속에 속한다.
 - a. 형태: 작고, envelope이 없는 RNA 바이러스로서 지름이 28~30 nm이다.
 - b. strain: Max Theiler가 처음 발견하였으며, TO (Theiler's original), FA, DA, GDVII (George Martine이 이름 붙임)이 있다.
 - c. 배양: baby hamster kidney (BHK-21)에서 배양된다.

40) https://www.criver.com/sites/default/files/resources/doc_a/ReovirusTechnicalSheet.pdf

41) Uchiyama, A., & Besselsen, D. G. (2003). Detection of reovirus type 3 by use of fluorogenic nuclease reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Laboratory Animals*, 37(4), 352-359.

(2) 임상증상

- a. 바이러스 strain, 마우스 strain, 감염 경로 등에 따라 다르지만, 임상증상을 나타내는 경우는 매우 낮으며 감염된 마우스의 0.1~0.01%가 임상증상을 나타낸다.
- b. 이완성 후지 마비, 전지 또는 후지의 위약이 관찰된다.
- c. 일부는 사료 및 음수 섭취를 못해 폐사하고 일부는 회복하지만, 만성 demyelinating phage를 거쳐 자세가 이상해진다.

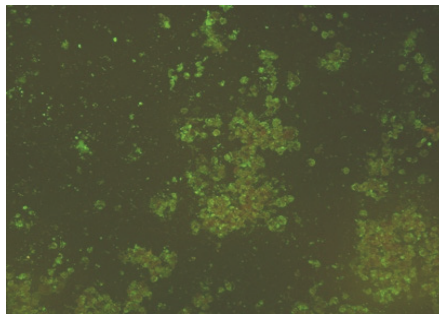
(3) 전파

- a. 자연 감염은 마우스에서 나타나며, 랫드에는 실험 감염된다.
- b. 구강을 통해 감염 후 바이러스는 최초로 장 점막에서 증식하며 면역이 생긴 후에도 장 내 감염이 지속되어 분변을 통해 바이러스를 배출한다. 뇌와 척수에는 적어도 1년 동안 감염이 지속된다.
- c. MHV와 다르게 한 종류의 strain에 감염되면 다른 strain의 감염을 예방할 수 있다.

나) 검사법

(1) 혈청분석법: TMEV의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. TMEV 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
- b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
- c. ELISA를 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- d. IFA 검사 방법에 의한 TMEV의 형광 현미경 사진

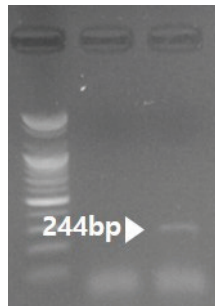


(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 소장⁴²⁾
- b. RNA 추출: 별첨 자료 4 'RNA 추출법'을 이용하여 RNA를 추출한다.
- c. PCR⁴³⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TGT GGA AGG GTA TGT GTT GCC
 - (b) Reverse: GTT GCA CCG CAC ACA AAG G
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95°C	5 min
35 cycles	95°C	30 sec
	57°C	30 sec
	72°C	15 sec
1 cycle	72°C	5 min

- (b) PCR 결과: 양성은 244 bp⁴³⁾



42) <https://dora.missouri.edu/mouse/mouse-encephalomyelitis-virus-also-called-theilovirus/>

43) 건국대 제공

설치류 미생물 품질관리 매뉴얼

Gram 양성	1. <i>Corynebacterium bovis</i>	67
	2. <i>Corynebacterium kutscheri</i>	68
	3. <i>Staphylococcus aureus</i>	70
	4. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	72
	5. β -hemolytic Streptococci	75
Gram 음성	6. <i>Salmonella</i> spp.	78
	7. <i>Streptobacillus moniliformis</i>	80
	8. <i>Mycoplasma pulmonis</i>	82
	9. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	84
	10. <i>Citrobacter rodentium</i>	85
	11. <i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's disease)	88
	12. <i>Filobacterium rodentium</i> (Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus)	90
	13. <i>Helicobacter bilis</i>	92
	14. <i>Helicobacter hepaticus</i>	93
	15. <i>Helicobacter typhlonius</i>	94
	16. <i>Rodentibacter heylii</i>	95
	17. <i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	96
	18. <i>Klebsiella oxytoca</i>	98
	19. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	100
	20. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	102



II

세균 검사

1 *Corynebacterium bovis*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목이며 그람 양성 간균이다.
- (2) 임상증상
 - a. 일반 마우스는 임상증상이 관찰되지 않는다.
 - b. 면역 결핍 마우스에서 피부의 과각화증과 탈모가 관찰된다.
- (3) 전파: 직접 접촉, 분변을 구강으로 섭취, aerosol로 전염된다.

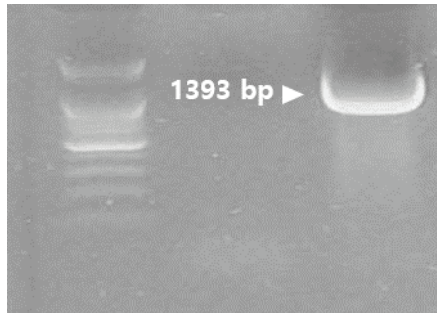
나) 검사법

- (1) PCR법
 - a. Target Tissue : 피부, 구강 스왑
 - b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
 - c. PCR⁴⁴⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GAT CCT GGC TCA GGA CGA AC
 - (b) Reverse: GTG TTA CCA ACT TTC ATG ACG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	93℃	1 min
35 cycles	95℃	15 sec
	55℃	30 sec
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

44) 건국대 제공

(b) PCR 결과: 양성은 1,393 bp⁴⁴⁾



2 *Corynebacterium kutscheri*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며 그람 양성의 간균이며 가성 결핵의 원인이다.
- (2) 임상증상: 임상증상이 관찰되지 않으며, 면역 억제 상태에서 급성으로 경과한 경우 높은 폐사율을 나타내고, 만성으로 경과한 경우 낮은 폐사율을 나타낸다. 이때는 식욕 부진, 무관심, 쇠약, 털이 거칠고, 등을 구부린 자세, 과호흡, 콧물, 눈물 등의 비특이적인 임상증상이 관찰된다.
- (3) 전파: 직접 접촉, 구강으로 섭취한 분변, aerosol의 경로로 전염된다.

나) 검사법

- (1) 배양법: *Corynebacterium kutscheri*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 검사 부위: 기도
 - b. 분리용 배지: Blood agar
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
 - d. colony 특성: colony는 구형으로 완전한 형태의 반구형을 나타내고, 색은 회색에서 노란색을 가진 흰색이며 비용혈성이다.



e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:

- ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
- ② 별첨 자료 6 ‘API 검사법’ 중 다. CORYNE V. 2.0.을 이용하여 검사를 실시하여 *Corynebacterium kutscheri* 유무를 검사한다.

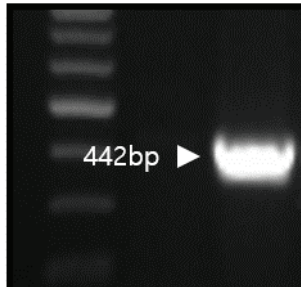
(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 기도
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁴⁵⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: ATG AAG GCC TTC GGG TTG TA
 - (b) Reverse: GCG TTA GCT ACG GCA CGA AC
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

45) 건국대 제공

(b) PCR 결과: 양성은 442bp⁴⁵⁾



3 *Staphylococcus aureus*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며 비운동성의 그람 양성균이다.
- (2) 임상증상
 - a. 면역 부전 마우스에서 화농성 결막염, 안구 주위 농양, 화농성 피부염, 포피샘 농양, 화농성 귀두포피염 등이 나타난다.
 - b. 질병의 경과를 보면 얼굴, 귀, 목, 어깨, 앞발 등에 습진성 피부염이 발생하며 이후 궤양성 피부염, 농양, 봉와직염으로 진행되어 화농성 피부염으로 발전된다.
- (3) 전파: 접촉감염(피부 상처 등) 또는 aerosol을 통해 구강으로 전염된다.

나) 검사법

- (1) 배양법: *Staphylococcus aureus*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 검사 부위: 멍장, 화농
 - b. 분리용 배지: Vogel-Johnson 배지
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.

d. colony 특성: colony는 검정색이고, 주변 배지는 노란색으로 변한다.



e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:

- ① 후보 colony를 선별하여 순수 배양을 실시한다.
- ② *Coagulase plasma* 검사를 실시한다.
 - a) coagulase plasma 0.5 ml을 1.5 ml tube에 넣은 후 멸균된 pipette를 이용해 2~4 colony의 세균을 첨가한다.
 - b) 잘 섞은 후 37°C 배양기(또는 water bath)에서 4시간 정도 배양한다.
 - c) 응고된 정도를 4시간 배양 후 관찰하고 응고가 없을 경우 24시간 배양 후 다시 관찰하고 응고 정도를 기록한다.
- ③ 별첨 자료 6 ‘API 검사법’ 중 라. Staph을 이용하여 검사를 실시하여 *Staphylococcus aureus* 유무를 검사한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 맹장, 분변, 화농
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁴⁶⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: CCC ATT TGC TTG GTC TGT AGT A
 - (b) Reverse: GTC CAG CCC ATT TCT GGA TTA

46) de Almeida. C. C., Pizauro, L. J. L., Soltes, G. A., Slavic, D., de Ávila, F. A., Pizauro, J. M., MacInnes, J. I. (2018). Some coagulase negative *Staphylococcus* spp. isolated from buffalo can be misidentified as *Staphylococcus aureus* by phenotypic and Sa442 PCR methods. *BMC Research Notes*, 11(1), 346.

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95℃	10 min
40 cycles	95℃	10 sec
	55℃	20 sec
	72℃	12 sec
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 432 bp⁴⁷⁾



4 *Streptococcus pneumoniae*

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며 운동성이 없는 그람 양성 구균이다(α -hemolytic).

(2) 임상증상

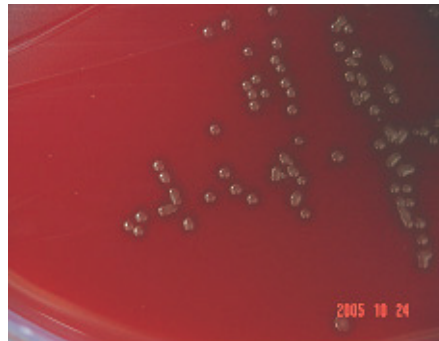
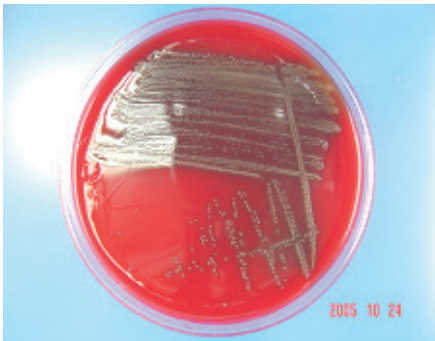
- a. 마우스에서 상부 호흡기 감염 시는 임상증상이 관찰되지 않지만, 피부 상처 부위에 감염 시는 궤양성 피부염을 일으킨다. SCID 마우스에서 전신 감염이 나타난다.
- b. 랫드는 대부분 무증상 감염되지만, 임상증상을 나타내는 경우 상부 호흡기에 화농성 염증이 나타난다.

(3) 전파: 기회 감염균으로 aerosol과 직접 접촉으로 전염된다.

47) 건국대 제공

나) 검사법

- (1) 배양법: *Streptococcus pneumoniae*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
- 검사 부위: 기관, 화농
 - 분리용 배지: blood agar
 - 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
 - colony 특성: colony는 갈색에서 갈색으로 평평한 형태의 colony를 형성하며 37°C 48시간 배양 후 주변에 강한 α -용혈대를 형성한다.



- 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:
 - 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
 - Optochin disk에 의한 동정법: Optochin은 ethylhydrocupreine hydrochloride 성분의 quinine 계열 항균제로서 *Streptococcus pneumoniae*의 치료제로는 쓰이지 않으나 *Streptococcus pneumoniae*의 선별 동정시험으로 사용된다.
 - Streptococcus pneumoniae*의 동정시험 중 optochin disk 시험은 검사 비용이 적게 들고 α -용혈성 연쇄구균과의 감별력이 높기 때문에 가장 흔히 사용하며, Optochin 디스크 시험법은 배지 성분과 배양 조건에 따라 억제대의 형성에 차이가 발생한다. 따라서 항상 동일한 방식으로 검사를 실시해야 한다.
 - 상업적으로 판매되는 optochin disk에 따라 접종 방법 및 배양 조건에 차이가 발생한다.
 - 시험방법
 - colony를 blood agar에 골고루 접종한 후 optochin disk를 멸균된 포셉으로 배지 표면에 붙인다.
 - 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 억제대의 지름을 측정한다.

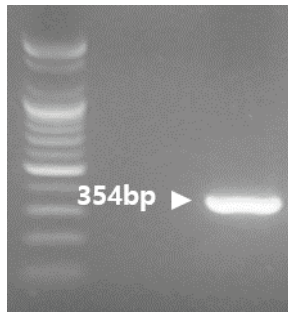
- (c) Optochin 억제대 지름이 뚜렷하게 14 mm 이상이면 *Streptococcus pneumoniae*로 동정한다.
- (d) Optochin 억제대 지름이 6~14 mm 사이일 때는 bile 용해성 시험을 한 후 양성일 경우에만 *Streptococcus pneumoniae*로 동정한다.
- ③ 별첨 자료 6 ‘API 검사법’ 중 마. 20 Strep을 이용하여 검사를 실시하여 *Streptococcus pneumoniae* 유무를 검사한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 기관, 폐, 화농
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁴⁸⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GTG ATA TTT CTG TAA CAG CTA CC
 - (b) Reverse: GAG AAT TCC CTG TCT TTT CAA AG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

- (b) PCR 결과: 양성은 354 bp⁴⁹⁾



48) Dagan, R., Shriker, O., Hazan, I., Leibovitz, E., Greenberg, D., Schlaeffer, F., Levy, R. (1998). Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 669-673.

49) 건국대 제공

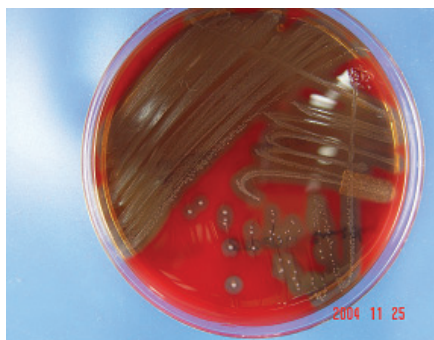
5 β -hemolytic Streptococci

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며 운동성이 없는 그람 양성 구균이다. *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus zooepidemicus* 등이 있다.
- (2) 임상증상
 - a. 마우스에서는 상부 호흡기 감염 시 임상증상이 관찰되지 않지만, 피부 상처 부위에 감염 시 궤양성 피부염을 일으킨다.
 - b. 랫드에서 분리는 되지만 질병을 거의 일으키지 않는다.
 - c. 전신 감염되면 비특이적 임상증상인 결막염, 피모 거침, 과호흡, 쇠약, 비몽사몽 등이 관찰된다.
- (3) 전파: 기회 감염균으로 aerosol과 직접 접촉으로 전염된다.

나) 검사법

- (1) 배양법: β -hemolytic Streptococci의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 검사 부위: 기도, 상처 부위
 - b. 분리용 배지: blood agar
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
 - d. colony 특성: colony는 회색 및 갈색이며 가운데 부분을 중심으로 β -용혈대가 크게 형성된다.



e. 생화학 검사용 kit 및 검사방법:

- ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
- ② 별첨 자료 6 ‘API 검사법’ 중 마. 20 Strep을 이용하여 검사를 실시하여 β -hemolytic Streptococci 유무를 검사한다.

(2) PCR법 : *Streptococcus agalactiae*

- a. Target Tissue: 기도, 상처 부위
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁵⁰⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: TGA GGT AAC CTT TTA GGA GC

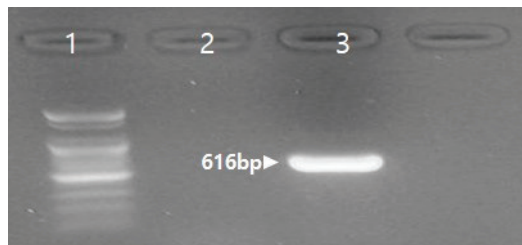
(b) Reverse: AAT CGC TTT TGC TTT CTC

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
30 cycles	94℃	30 sec
	60℃	30 sec
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 616 bp⁵¹⁾



(3) PCR법: *Streptococcus pyogenes*

- a. Target Tissue: 기도, 상처 부위
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.

50) Cui, M., Zhang, H., Li, J., Liu, R., Wu, M., Xu, D., Zhang, Q. (2019). Differential PCR detection of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by a single primer pair. *Journal of Fish Disease*, 42(8), 1211-1216.

51) 건국대 제공

c. PCR⁵²⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: AAA GAC CGC CTT AAC CAC CT

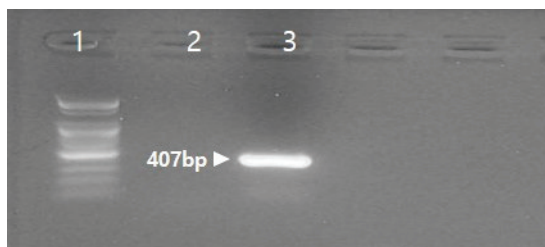
(b) Reverse: TGG CAA GGT AAA CTT CTA AAG CA

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94°C	2 min
30 cycles	94°C	20 sec
	55°C	20 sec
	72°C	45 sec
1 cycle	72°C	2 min

(b) PCR 결과: 양성은 407 bp⁵³⁾



(4) PCR법: *Streptococcus zooepidemicus*

a. Target Tissue: 기도, 상처 부위

b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.

c. PCR⁵⁴⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: CAG CAT TCC TGC TGA CAT TCG TCA GG

(b) Reverse: CTG ACC AGC CTT ATT CAC AAC CAG CC

52) Liu, D., Hollingshead, S., Swiatlo, E., Lawrence, M. L., Austin, F. W. (2005). Rapid identification of *Streptococcus pyogenes* with PCR primers from a putative transcriptional regulator gene. *Research in Microbiology*, 156(4), 564-567.

53) 건국대 제공

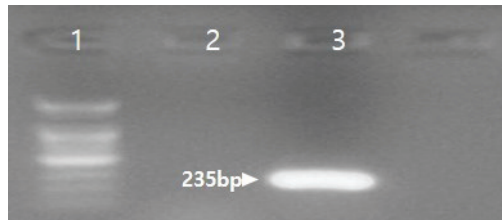
54) Koh, B., Park, S., Kim, J., Park, J. (2007). *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection in barbary sheep (*Ammotragus lervia*). *Korean Journal of Veterinary Research*, 47(4), 409-415.

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	3 min
30 cycles	94℃	30 sec
	59℃	30 sec
	72℃	40 sec
1 cycle	72℃	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 235 bp⁵⁵⁾



6 *Salmonella* spp.

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 그람 음성의 간균이다. 길이는 2~5 μm 이고, 폭은 0.7~1.5 μm 이다.

(2) 임상증상

- 급성 감염에 의해 어린 마우스는 심한 병변(위장관염, 식욕부진, 체중 감소, 무기력, 등을 구부린 자세, 결막염 등)이 관찰된다.
- 아급성으로 감염되면 간장 종대와 비장 종대로 인해 복부가 팽대되고, 만성 감염되면 식욕 부진, 체중 감소, 설사, 피모 거침, 산자 수 감소 등이 관찰된다.
- 랫드는 임상증상은 잘 나타나지 않으며, 구부린 자세, 헝클어진 털, 무기력, 결막염이 관찰되고 때때로 설사 또는 연변이 관찰된다.

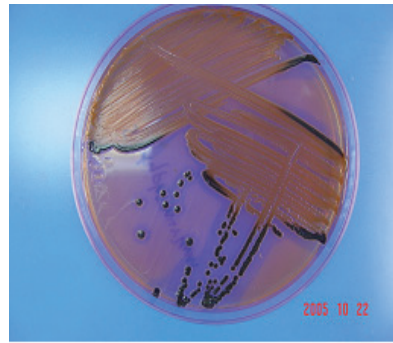
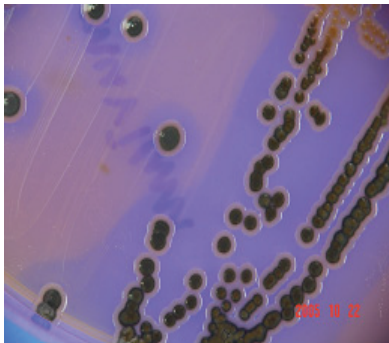
(3) 전파: 물, 음식에 오염되어 있으며, 분변을 구강으로 섭취하여 전염된다.

55) 건국대 제공

나) 검사법

(1) 배양법: *Salmonella* spp.의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. 검사 부위: 맹장
- b. 분리용 배지: SS배지
- c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
- d. colony 특성: colony의 중심부는 검정색이고 주변은 투명하다. 참고로 *Salmonella* spp.와 *Proteus* spp.는 DHL, SS agar 및 MacConkey agar에서 colony의 중심부는 검정색이고 주변은 투명하기 때문에 감별이 필요하다.



e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:

- ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
- ② 별첨 자료 6 'API 검사법' 중 가. 20 NE를 이용하여 검사를 실시하여 *Salmonella* spp. 유무를 검사한다.

(2) PCR법: *Salmonella* Typhimurium

- a. Target Tissue : 맹장, 분변
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁵⁶⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: ATT AAT TAT GGA AGC GCT CGC ATT
 - (b) Reverse: GTA ATG AGA TCC ATC AAA TTA GCG

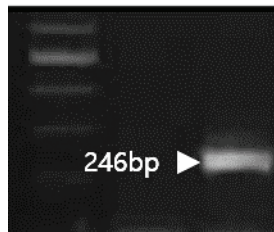
56) Sung, H., Kim, S., Sang, W., Yeon, H., Lee, B. (2005). Rapid serological identification for monophasic *Salmonella* serovars with a hin gene-specific polymerase chain reaction. *Journal of Bacteriology and Virology*, 35, 291-297.

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 246 bp⁵⁷⁾



7 *Streptobacillus moniliformis*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며 운동성이 없는 그람 음성 간균이다. Rat bite fever (Haverhill fever)의 원인체로 과거에는 중요한 질병이었으며, 사람에도 병원성이 있다.
- (2) 임상증상
 - a. 랫드에서 지속 감염되며 임상증상이 관찰되지 않는다.
 - b. 마우스에서 급성으로 오면 높은 폐사율을 나타내고, 피모는 거칠며, 결막염, 빈혈, 설사, 혈색소뇨증, 청색증 등이 관찰된다. 아급성 또는 만성으로 오면 지속 감염되고, 피부 궤양, 관절염, gangrenous amputation, 후지 마비, 사산 또는 유산 등이 관찰된다.
- (3) 전파: 야생 랫드의 코인두, 중이, 호흡기계에 존재하다가, 물린 상처, aerosol, fomites을 통해 사람과 마우스에 전염된다.

57) 건국대 제공

나) 검사법

(1) 배양법: *Streptobacillus moniliformis*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. 검사 부위: 기관, 폐
- b. 분리용 배지: blood agar
- c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
- d. colony 특성: colony는 갈색으로 pinpoint이다.
- e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:
 - ① 후보 colony를 선별하여 순수 배양을 실시한다.
 - ② oxidase와 catalase 시험을 실시해 음성임을 확인한다.
 - ③ 질산염환원 및 인돌 형성 시험을 실시해 음성임을 확인한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 기관, 폐
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁵⁸⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GCT TAA CAC ATG CAA ATC TAT
 - (b) Reverse: AGT AAG GGC CGT ATC TCA
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95°C	3 min
35 cycles	95°C	20 sec
	57°C	1 min
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	7 min

(b) PCR 결과: 양성은 296 bp

58) Boot, R., Oosterhuis, A., Thuis, H. C. (2002). PCR for the detection of *Streptobacillus moniliformis*. *Laboratory Animals*, 36(2), 200-208.

8 *Mycoplasma pulmonis*

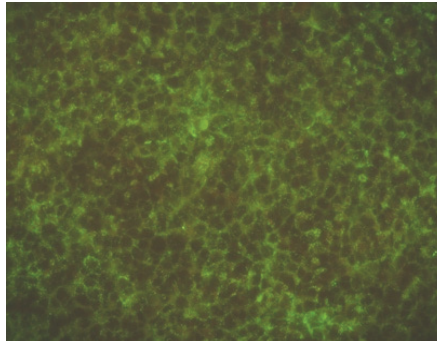
가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 세포벽이 없는 그람 음성 세균이다. 다형태이고 구형 또는 난원형(200~300 nm)으로부터 긴 실 모양(2-5 μm)으로 다형태이다. 과거에 많이 발생했지만, 배리어 시설이 보급되면서 거의 발생하지 않는다.
- (2) 임상증상
 - a. Murine respiratory mycoplasmosis (MRM)의 원인체로 마우스, 랫드에서 만성 호흡기질환을 일으킨다.
 - b. 마우스는 무증상 감염이 일반적이지만, 화농성 비염, 중이염, 만성 폐렴으로 발전 되었을 때 임상증상이 나타난다. Chattering sound와 호흡 곤란은 가장 특징적인 임상증상으로 비염과 화농성 삼출물이 원인이다. 활동 저하, 털이 곤두서고 체중 감소 등도 관찰되며 중이염이 있으면 머리를 한쪽으로 숙이며, 드물지만 뇌와 척수에 화농성 염증이 수반되면 이완성 마비가 관찰된다.
 - c. 어린 랫드는 임상증상이 관찰되지 않지만 나이 든 랫드는 폐의 수포음, 호흡곤란, snuffling, chattering sound, 콧물, 눈물, 눈물 닦기, 머리를 한쪽으로 숙이는 등의 임상증상이 관찰되고, 중이에 심한 병변이 있을 때 꼬리를 잡으면 계속해서 돈다.
- (3) 전파: 전염성이 매우 높으며 직접 접촉과 aerosol를 통해 전염된다. 랫드에서 수직 감염도 보고된다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: *Mycoplasma pulmonis*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. *Mycoplasma pulmonis* 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 *Mycoplasma pulmonis*의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 기관, 폐
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁵⁹⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: TAC TAG AGA AAA AAT GTC TTC TA

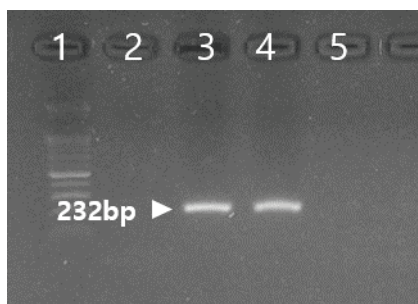
(b) Reverse: ATG AAC GTC ACG AAC TTC AAA T

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 232 bp⁵⁹⁾



59) 건국대 제공

9 *Bordetella bronchiseptica*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, 운동성이 있는 그람 음성의 간균 또는 단간균이다.
- (2) 임상증상: 마우스와 랫드에서 단독 감염 시 임상증상이 관찰되지 않는다.
- (3) 전파: 상부 호흡기에 존재하며 aerosol 또는 fomites에 의해 전염된다.

나) 검사법

(1) 배양법: *Bordetella bronchiseptica*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. 검사 부위: 폐, 기관
- b. 분리용 배지: Blood agar
- c. 배양조건: 37℃ 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
- d. colony 특성: 백색으로 중심부가 볼록한 colony를 형성한다.



- e. 생화학 검사용 kit 및 검사방법:
 - ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
 - ② 별첨 자료 6 'API 검사법' 중 가. 20 NE를 이용하여 검사를 실시하여 *Bordetella bronchiseptica* 유무를 검사한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 폐, 기관
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.

c. PCR⁶⁰⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: GCG CCG CAC GGA CGC CTG

(b) Reverse: AGG CTC CCA AGA GAG AAA GGC TT

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95°C	5 min
35 cycles	94°C	15 sec
	65°C	30 sec
	72°C	45 sec
1 cycle	72°C	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 215 bp⁶⁰⁾



10 *Citrobacter rodentium*

가) 원인체의 특성

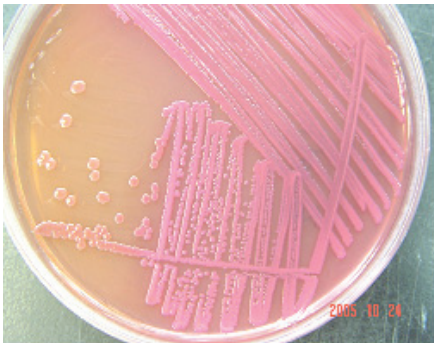
- (1) 역학: 마우스의 검사항목으로 비운동성의 그람 음성 간균이다. Transmissible murine colonic hyperplasia (전염성 마우스 결장 증식증)의 원인체이다.

60) 건국대 제공

- (2) 임상증상: 최근에 이유한 마우스 또는 늦게 까지 포유한 마우스는 체중 정체, 털이 곤두서거나 연변 또는 설사, 직장탈 등이 관찰된다. 감수성 있는 마우스는 C3H/HeJ이고, 저항성이 있는 마우스는 DBA, NIH Swiss, C57BL 등이다. 감염된 마우스의 일부는 폐사된다.
- (3) 전파: 직접 접촉과 분변을 구강으로 섭취하여 전염되며 마우스에만 감염된다.

나) 검사법

- (1) 배양법: *Citrobacter rodentium*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
- a. 검사 부위: 맹장
 - b. 분리용 배지: DHL
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한다.
 - d. colony 특성: 보통의 *E. coli*에 비해 투명하며 중심부가 붉은색을 띠는 colony로 주변에 붉은색의 pigment가 침착되지 않는다.



- e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:
 - ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
 - ② 별첨 자료 6 'API 검사법' 중 가. 20 NE를 이용하여 검사를 실시하여 *Citrobacter rodentium* 유무를 검사한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 맹장
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.

c. PCR⁶¹⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: GCT TCT GCG AAG TCT GTC AA

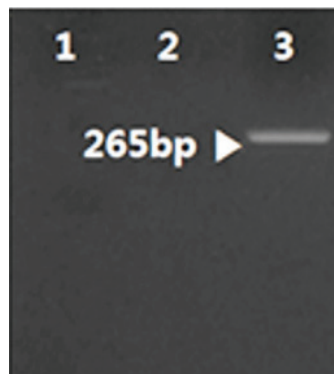
(b) Reverse: CAG TAA AGC GAC TTA ACA GAT T

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95°C	5 min
35 cycles	95°C	45 sec
	57°C	1 min
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 265 bp⁶²⁾



61) Lu, Y., Zhang, X., Bouladoux, N., Kaul, S. N., Jin, K., Sant'Angelo, D., Belkaid, Y., Kovalovsky, D. (2017). Zbtb1 controls NKp46+ ROR-gamma-T+ innate lymphoid cell (ILC3) development. *Oncotarget*, 8(34), 55877-55888.

62) 건국대 제공

11 *Clostridium piliforme* (Tyzzer's disease)

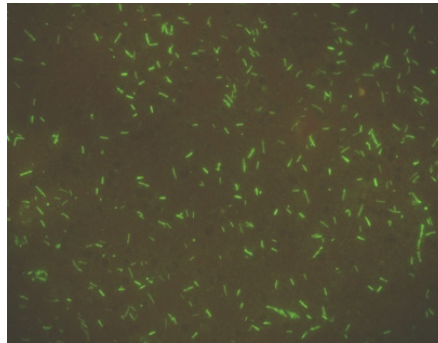
가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 그람 음성의 spore를 형성하는 세균이다. 길이는 8~20 μm 이고, 두께는 0.3~0.5 μm 이다.
- (2) 임상증상
 - a. 마우스는 설사, 활동 저하, 높은 폐사율을 나타내고, 때로는 무증상 감염 후 항체를 형성한다. 밀집 사육, 고온, 다습, 면역 억제 등의 스트레스에 의해 감수성이 증가한다. DBA/2가 C57BL/6보다 감수성이 높다.
 - b. 성숙한 랫드는 임상증상이 관찰되지 않으며 최근에 이유한 랫드는 식욕부진, 무기력, 쇠약, 털이 곤두서거나, 급성 폐사, 설사 등이 관찰되며 가끔 복부 팽만도 관찰된다.
- (3) 전파: 분변을 섭취함으로써 spore에 감염되며 spore는 실온에서 1년 동안 감염성 유지하지만, vegetative form은 불안정하다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: *Clostridium piliforme*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. *Clostridium piliforme* 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 여부를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 *Clostridium piliforme*의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 간, 분변
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁶³⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GTG CTA GGT GTT GGG AAG
 - (b) Reverse: TAC TTT ACG TAG CCT GTC AA
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	92℃	5 min
25 cycles	92℃	2 min
	50℃	2 min
	70℃	2 min
1 cycle	70℃	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 196 bp

63) Furukawa, T., Furumoto, K., Fujieda, M., Okada, E. (2002). Detection by PCR of the Tyzzer's disease organism (*Clostridium piliforme*) in feces. *Experimental Animals*, 51(5), 513-516.

12

Filobacterium rodentium
(Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus)

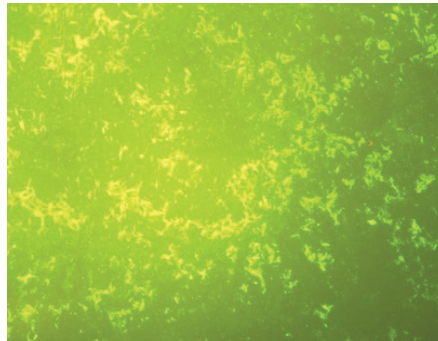
가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며 가느다란 간균으로 그람음성이다. 길이는 4~12 μm 이고, 폭은 0.12~0.21 μm 이다.
- (2) 임상증상
 - a. 마우스는 자연 감염 시 임상증상이 거의 없으며, 실험 감염 시 만성 호흡기 질병을 유발한다.
 - b. 랫드는 임상증상이 관찰되지 않으며 가끔 체중 감소, 호흡곤란 등의 비특이적인 임상 증상이 관찰된다.
- (3) 전파: 감염 동물의 직접 접촉에 의해 전염되고, aerosol을 통해서도 전염되지 않는다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: *Filobacterium rodentium*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. *Filobacterium rodentium* 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 여부를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.

d. IFA 검사 방법에 의한 *Filobacterium rodentium*의 형광 현미경 사진



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 폐, 기관
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁶⁴⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: GTA ATT AAA GCT CCG GCG CTC

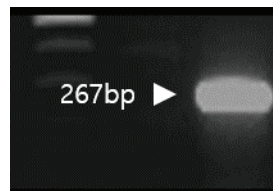
(b) Reverse: ACA CCC TTA GAA AAG GGG ATT

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 267 bp⁶⁴⁾



64) 건국대 제공

13 *Helicobacter bilis*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, 나선형의 그람 음성의 간균이다.
- (2) 임상증상: 일반 마우스에서는 임상증상이 관찰되지 않지만, 면역 억제 마우스에서 inflammatory bowel disease (IBD)와 결장암이 관찰된다. 마우스에서 만성 진행성 간염과 간암이 관찰된다.
- (3) 전파: 분변을 구강으로 섭취하여 전염된다.

나) 검사법

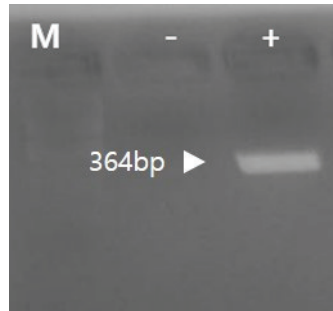
- (1) PCR법: *Helicobacter bilis*의 검사법으로 일반적으로 사용된다. 배양법은 분리 동정이 어렵고, 고비용, 장시간 등으로 인해 검사법으로 사용하기 어렵다.
 - a. Target Tissue : 분변⁶⁵⁾
 - b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
 - c. PCR법⁶⁶⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: CTA TGA CGG GTA TCC GGC
 - (b) Reverse: TCT CCC ATA CTC TAG AAA AGT
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
35 cycles	94℃	1 min
	53℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

65) 실험동물의 품질관리(설치류편-미생물학)

66) Hodzic, E., McKisic, M., Feng, S., Barthold, S. W. (2001). Evaluation of diagnostic methods for *Helicobacter bilis* infection in laboratory mice. *Comparative Medicine*, 51(5), 406-412.

(b) PCR 결과 : 양성은 364 bp⁶⁷⁾



14 *Helicobacter hepaticus*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, 나선형의 그람 음성 간균이다.
- (2) 임상증상: 일반 마우스에서는 임상증상이 관찰되지 않지만, 면역 억제된 마우스에서는 inflammatory bowel disease (IBD)를 일으키고, 직장탈, 설사 등이 관찰된다. A/J 마우스에서 만성 진행성 간염과 간암이 관찰된다.
- (3) 전파: 분변을 구강으로 섭취하여 전염된다.

나) 검사법

(1) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 간⁶⁸⁾
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁶⁹⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: ATG GGT AAG AAA ATA GCA AAA AGA TTG CAA

67) 건국대 제공

68) 실험동물의 품질관리(설치류편-미생물학)

69) Feng, S., Ku, K., Hodzic, E., Lorenzana, E., Freet, K., Barthold, S. W. (2005). Differential detection of five mouse-infecting *Helicobacter* species by multiplex PCR. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(4), 531-536.

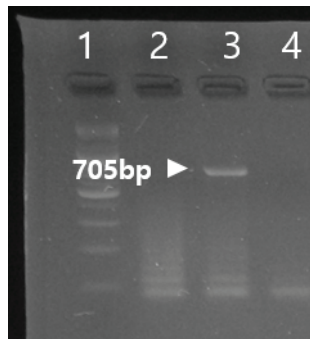
(b) Reverse: CTA TTT CAT ATC CAT AAG CTC TTG AGA ATC

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
30 cycles	94℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 705 bp⁷⁰⁾



15 *Helicobacter typhlonius*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목이며 나선형의 그람 음성의 간균이다.
- (2) 임상증상
 - a. 일반 마우스는 임상증상이 관찰되지 않는다.
 - b. 면역 억제 마우스에서 inflammatory bowel disease (IBD)가 관찰된다.
- (3) 전파: 분변을 구강으로 섭취하여 전염된다.

70) 건국대 제공

나) 검사법

(1) PCR법

- a. Target Tissue : 분변
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁷¹⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: AGG GAC TCT TAA ATA TGC TCC TAG AGT
 - (b) Reverse: ATT CAT CGT GTT TGA ATG CGT CAA
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	94°C	5 min
30 cycles	94°C	1 min
	55°C	1 min
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	10 min

- (b) PCR 결과: 양성은 123 bp

16 *Rodentibacter heylii*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, 비운동성의 그람 음성의 단간균이다. 길이는 1.0~2.0 μm 이다.
- (2) 임상증상: 단독 감염 시는 임상증상이 거의 관찰되지 않는다. 복합 감염 시 화농성 병변을 일으킨다. 동물에서 눈, 결막, 피부, 유선 등의 화농성 병변 또는 삼출성 병변을 일으킨다.
- (3) 전파: 직접 접촉에 의해 전염이 잘 되며 aerosol을 통해서도 가능하다.

71) Feng, S., Ku, K., Hodzic, E., Lorenzana, E., Freet, K., Barthold, S. W. (2005). Differential detection of five mouse-infecting *Helicobacter* species by multiplex PCR. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(4), 531-536.

17 *Rodentibacter pneumotropicus*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, 비운동성의 그람 음성의 단간균이다. 길이는 1.0~2.0 μm 이다. 과거 명칭은 *Pasteurella pneumotropica*이다.
- (2) 임상증상: 단독 감염 시는 임상증상이 거의 관찰되지 않는다. 복합 감염 시 화농성 병변을 일으킨다. 동물에서 눈, 결막, 피부, 유선 등의 화농성 병변 또는 삼출성 병변을 일으킨다.
- (3) 전파: 직접 접촉에 의해 전염이 잘되며 aerosol을 통해서도 가능하다.

나) 검사법

- (1) 배양법: *Rodentibacter pneumotropicus*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 검사 부위: 기관, 폐
 - b. 분리용 배지: Blood agar
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
 - d. colony 특성: colony는 회색에서 노란색의 특징을 가지며 유두상의 모양을 가지고 있다. 혈액 배지에서 용혈을 일으키지 않으며 오래된 화장실 냄새가 난다.



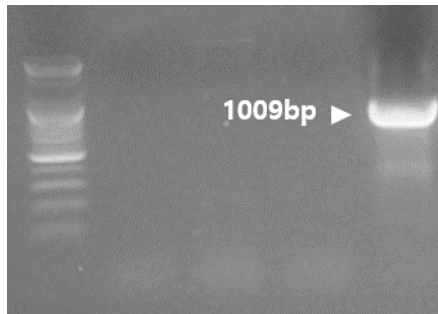
- e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:
 - ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
 - ② 별첨 자료 6 'API 검사법' 중 가. 20 NE를 이용하여 검사를 실시하여 *Rodentibacter pneumotropicus* 유무를 검사한다.

(2) PCR법⁷²⁾

- a. Target Tissue : 기관, 폐
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁷³⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: AGG TCA TGT TCA TGA ACA GT
 - (b) Reverse: CCA ATG CAG TAA TCA ACG TC
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 1009 bp⁷³⁾



72) 실험동물의 품질관리(설치류편-미생물학)

73) 건국대 제공

18 *Klebsiella oxytoca*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, 비운동성의 그람 음성 간균이다.
- (2) 임상증상: 임상증상이 관찰되지 않으며 화농성 자궁내막염, 난관염, 난소염을 일으킨다는 보고가 있다.
 - a. 일반 마우스와 랫드는 임상증상이 관찰되지 않는다.
 - b. 화농성 중이염, 비뇨생식기 감염, 폐렴이 있는 C3H/HeJ와 nude 마우스에서 분리된다.
 - c. 신장염과 비뇨기계 감염이 있는 NSG 마우스에서 분리된다.
- (3) 전파: 직접 접촉과 분변을 구강으로 섭취함으로써 전염된다.

나) 검사법

- (1) 배양법: *Klebsiella oxytoca*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 검사 부위: 비뇨, 생식기, 장, 분변
 - b. 분리용 배지: Blood agar, DHL, MacConkey agar
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
 - d. colony 특성: 크림색의 colony가 형성되며 주변이 검은색으로 변한다.



e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:

- ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
- ② 별첨 자료 6 ‘API 검사법’ 중 가. 20 NE을 이용하여 검사를 실시하여 *Klebsiella oxytoca* 유무를 검사한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 분변, 비뇨, 생식기, 장
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁷⁴⁾

a) PCR primer 작성

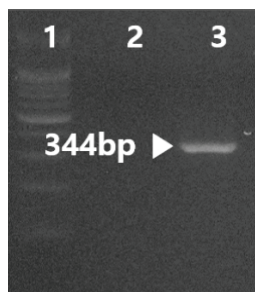
- (a) Forward: CGG ATA CGG AGT ATG CCT TTA CGG
- (b) Reverse: GCC TTT ATC AAG CGG ATA CTG GGC

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95°C	3 min
35 cycles	95°C	30 sec
	60°C	30 sec
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	5 min

(b) PCR 결과: 양성은 344 bp⁷⁴⁾



74) 건국대 제공

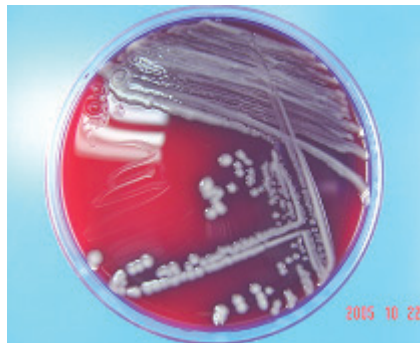
19 *Klebsiella pneumoniae*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목이며, 비운동성의 그람 음성 간균이다.
- (2) 임상증상: 마우스 소화기계의 자연 숙주이며, 자연 감염 시 임상증상이 관찰되지 않는다. 호흡기계와 비뇨기계에 실험 감염시키면 병원성이 있다.
- (3) 전파: 직접 접촉과 분변을 구강으로 섭취함으로써 전염된다.

나) 검사법

- (1) 배양법: *Klebsiella pneumoniae*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 검사 부위: 기관, 폐
 - b. 분리용 배지: Blood agar
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
 - d. colony 특성: colony 주변에 검은색의 변화와 함께 점액성이 강한 colony가 관찰되고, colony의 색은 크림색이며 냄새는 *Rodentibacter pneumotropicus*와 유사하다.
 - e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:



- ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
- ② 별첨 자료 6 'API 검사법' 중 가. 20 NE를 이용하여 검사를 실시하여 *Klebsiella pneumoniae* 유무를 검사한다.

(2) PCR법

a. Target Tissue : 기관, 폐

b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.

c. PCR⁷⁵⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: TGT TTA AGT TTA GTG GAT GGG TTA GCG GAA AAA
CCG AGC AC

(b) Reverse: CGC GGA TCC GCA GAA ACA CCA GAT AGG GC

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

(b) PCR 결과: 양성은 618 bp

75) 건국대 제공

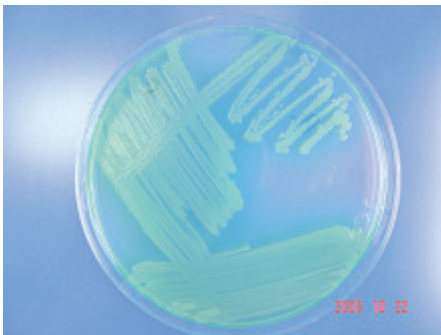
20 *Pseudomonas aeruginosa*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 운동성의 그람 음성 간균이다. 지름은 0.5~0.7 μm 이고 길이는 1.5~3.0 μm 이다.
- (2) 임상증상
 - a. 자연 감염 시 임상증상이 거의 없다.
 - b. Nude와 SCID 마우스는 폐사되기도 한다.
 - c. 감염되면 만성적으로 코인두, 입인두, 소화기계에 존재한다.
- (3) 전파: 오염된 환경이나 감염된 동물의 직접 접촉으로 전염된다.

나) 검사법

- (1) 배양법: *Pseudomonas* spp.의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 검사 부위: 땀장
 - b. 분리용 배지: NAC배지
 - c. 배양조건: 37°C 배양기에서 48시간 동안 배양한다.
 - d. colony 특성: colony는 녹색 또는 노란색의 형광을 나타내며 표면이 거칠고 부정형이다.



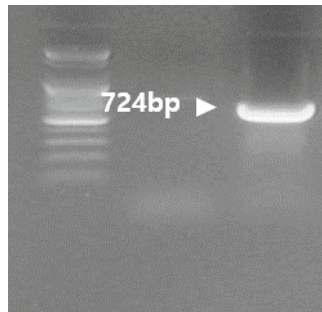
- e. 생화학 검사용 kit 및 검사 방법:
 - ① 후보 colony를 선발하여 순수 배양을 실시한다.
 - ② 별첨 자료 6 'API 검사법' 중 가. 20 NE를 이용하여 검사를 실시하여 *Pseudomonas* spp. 유무를 검사한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 땀장, 분변
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁷⁶⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: TAT TTC AAG GAT GGC TCC AC
 - (b) Reverse: GCG TTG GTT GTC CAA GTT TA
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) PCR 조건

1 cycle	95℃	5 min
35 cycles	95℃	1 min
	55℃	1 min
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	10 min

- (b) PCR 결과: 양성은 724 bp⁷⁶⁾



76) 건국대 제공

설치류 미생물 품질관리 매뉴얼

1. <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	107
2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Dermatophytes)	108
3. <i>Pneumocystis carinii</i>	109
4. <i>Pneumocystis murina</i>	110



진균 검사

1 *Encephalitozoon cuniculi*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 주요 원인체는 *Encephalitozoon cuniculi*로 마우스, 랫드의 검사항목이다. 실험 동물에서의 감염 보고는 흔하지 않은 세포 내 기생하는 병원성 microsporidian이다.
 - a. 영양형의 크기는 길이가 2~4 μm 이고 폭이 1.2~2.5 μm 이다.
- (2) 임상증상: 일반적으로 관찰되지 않는다.
- (3) 전파: spore를 통해 전파되며, 뇨로 배출되는 spore를 섭취함으로써 감염된다. 수직 전파된다는 보고가 있다.

나) 검사법

- (1) 혈청분석법: *Encephalitozoon cuniculi*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. *Encephalitozoon cuniculi* 항원이 부착된 ELISA plate를 구입한다.
 - b. 별첨 자료 1 'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사한다.
 - c. ELISA을 먼저 실시한 후 양성을 나타내는 표본은 별첨 자료 2 'IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법'을 이용하여 표본을 검사하여 양성 유무를 최종 판정한다. 최종 판정이 의양성이면 2주 후에 새로운 표본에 대해 혈청 분석을 실시한다.
- (2) PCR법
 - a. Target Tissue : 뇨, 분변
 - b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
 - c. Nested PCR⁷⁷⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) 1st Forward: CGG AGA GGA AGC CTT AGA GA
 - (b) 1st Reverse: GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG

77) Kotkova, M., Sak, B., Kvetonova, D., Kvac, M. (2013). Latent microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* in immunocompetent hosts: a murine model demonstrating the ineffectiveness of the immune system and treatment with albendazole. *PLoS One*, 8(4), e60941.

(c) 2nd Forward: ATA GTG ACG GGC GGT GTG T

(d) 2nd Reverse: ACA GGG ACM CAT TCA

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 nested PCR을 실시한다.

(a) 1st PCR 조건

1 cycle	94℃	3 min
35 cycles	94℃	45 sec
	58℃	45 sec
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	7 min

(b) 2nd PCR 조건

1 cycle	94℃	3 min
35 cycles	94℃	45 sec
	58℃	45 sec
	72℃	1 min
1 cycle	72℃	7 min

(c) PCR 결과: 양성은 176 bp

2 *Trichophyton mentagrophytes* (Dermatophytes)

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 주요 원인체는 *Trichophyton mentagrophytes*로 마우스, 랫드의 검사항목이다.

(2) 임상증상:

a. 마우스에서는 거의 관찰되지 않지만 때때로 누더기 모양의 탈모와 머리, 꼬리, 다리에 경계가 명확한 백색의 딱지(crust)가 관찰된다.

b. 실험에 사용되는 랫드에서는 감염 보고가 없으나 야생 랫드에서 보고가 있다.

(3) 전파: 직접 접촉, aerosol을 통해 감염된다.

나) 검사법

(1) 배양법: *Trichophyton mentagrophytes*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.

- a. 검사 부위: 피부
- b. 분리용 배지: Sabouraud's 2% glucose agar
- c. 배양조건: 22℃ 배양기에서 2주간 배양한다.
- d. colony 특성:



3 *Pneumocystis carinii*

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 랫드의 검사항목이다.

- a. 4개의 형태학적으로 분명한 stage가 있다: trophozoite (1.5~2 μm) → early cyst (2~4 μm) → cyst (5~7 μm) → sporozoite (1.0~1.7 μm)
- b. 초기에는 원충으로 분류했으나 지금은 곰팡이로 분류된다.

(2) 임상증상

- a. 일반 랫드에서 무증상 감염된다.
- b. 면역 결핍된 랫드에서 만성진행성 폐렴을 일으키며 호흡 곤란, 체중 감소, 피모 거침, 구부린 자세 등의 증상이 나타나고 심한 경우 폐사된다.

(3) 전파

- a. *Pneumocystis* spp.는 기회감염 병원체로 마우스, 랫드, 토끼, 사람에서 분리되지만, 서로 항원적으로 다르며, 인수공통전염병에 대한 보고는 없다.
- b. 직접 접촉, aerosol, fomites에 의해 전염된다.

나) 검사법

(1) PCR법

- a. Target Tissue : 랫드의 폐장
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁷⁸⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: GAT GGT TGT TTC CAA GCC CA

(b) Reverse: GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	2 min
40 cycles	94℃	20 sec
	50℃	20 sec
	72℃	40 sec
1 cycle	72℃	8 min

(b) PCR 결과: 양성은 345 bp

4 *Pneumocystis murina*

가) 원인체의 특성

(1) 역학: 마우스의 검사항목이다.

- a. 4개의 형태학적으로 분명한 stage가 있다: trophozoite (1.5~2 μm) → early cyst (2~4 μm) → cyst (5~7 μm) → sporozoite (1.0~1.7 μm)
- b. 초기에는 원충으로 분류했으나 지금은 곰팡이로 분류된다.

78) 실험동물의 품질관리(설치류편-미생물학)

(2) 임상증상

- a. 일반 마우스에서 무증상 감염된다.
- b. 면역 결핍된 마우스에서 만성진행성 폐렴을 일으키며 호흡 곤란, 체중 감소, 피모 거침, 구부린 자세 등의 증상이 나타나고 심한 경우 폐사된다.

(3) 전파

- a. *Pneumocystis* spp.는 기회감염 병원체로 마우스, 랫드, 토끼, 사람에서 분리되지만, 서로 항원적으로 다르며, 인수공통전염병에 대한 보고는 없다.
- b. 직접 접촉, aerosol, fomites에 의해 전염된다.

나) 검사법

(1) PCR법

- a. Target Tissue : 마우스의 폐장
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁷⁹⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: GCA ACT TAG TTA TGT CTT GGG G
 - (b) Reverse: GGA TCC AAC CCA AAA TTT TCA TA
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.
 - (a) 1st PCR 조건

1 cycle	95°C	3 min
40 cycles	95°C	10 sec
	45°C	30 sec
	72°C	30 sec
1 cycle	72°C	5 min

- (b) PCR 결과: 양성은 320 bp

79) Keely, S. P., Linke, M. J., Cushion, M. T., Stringer, J. R. (2007). *Pneumocystis murina* MSG gene family and the structure of the locus associated with its transcription. *Fungal Genetics and Biology*, 44(9), 905-919.

내부 기생충 - 요충 (Pinworm)	1. <i>Aspiculuris tetraptera</i>	115
	2. <i>Syphacia muris</i>	117
	3. <i>Syphacia obvelata</i>	119
내부 기생충 - 원충	4. <i>Giardia muris</i>	121
	5. <i>Spironucleus muris</i>	122
	6. <i>Entamoeba muris</i>	123
	7. <i>Tritrichomonas muris</i>	124
외부 기생충	8. <i>Myobia musculi</i>	125
	9. <i>Myocoptes musculinus</i>	126
	10. <i>Polyplax serrata</i>	128
	11. <i>Psorergates simplex</i>	129
	12. <i>Radfordia ensifera</i>	130



IV

기생충 검사

1 *Aspicularis tetraptera*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 마우스 pinworm 중의 하나이다. 대장에 주로 존재한다.
 - a. 성체의 크기는 암컷이 2.6~4.7 mm이고, 수컷은 2~4 mm이다.
 - b. 충란의 길이는 89~93 μm 이고 폭은 36~42 μm 이다. 핵은 shell에 가득 차 있지 않다.
- (2) 임상증상: 일반적으로 임상증상이 없으나 심한 감염의 경우 때때로, rectal prolapse, 장염, 장중첩증, 변비 등의 증상이 관찰된다.
- (3) 전파: 충란을 통해 전파되며, 분변 중의 충란을 섭취함으로써 감염된다.
- (4) 생활사
 - a. 총 23~25일로 길다
 - b. egg \rightarrow 소장에서 larvae \rightarrow middle colon \rightarrow 감염 후 3주에 proximal colon으로 이동하여 성숙한 후 egg를 낳는다.

나) 검사법

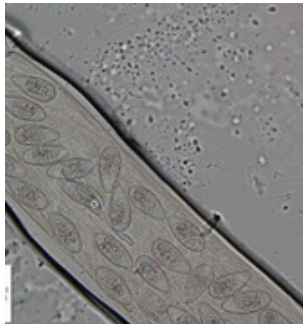
- (1) 현미경검사법: *Aspicularis tetraptera*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 충체 관찰: 멸균된 생리식염수를 10 ml 정도 넣은 페트리 디쉬에 대장 내용물을 넣은 후 페트리 디쉬를 천천히 흔들면서 충체를 관찰한다.
 - b. 충란 및 충체 관찰
 - a) 소독한 핀셋으로 소량의 대장 내용물을 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b) 멸균된 생리식염수를 한 방울 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰한다.
 - c) 충란 및 충체를 관찰하고 충란의 형태로 *Syphacia* spp.와 감별한다.

c. 충체 및 충란의 형태⁸⁰⁾



Male

Female



*Aspicularis tetraptera*의 충란

80) 건국대 제공

2 *Syphacia muris*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 랫드의 검사항목으로 랫드 pinworm이며 마우스, 저빌, 햄스터에도 감염된다.
 - a. 충체의 크기는 암컷이 2.8~4.0 mm이고, 수컷은 1.2~1.3 mm이다.
 - b. 충란의 크기는 길이가 72~82 μm 이고, 폭이 25~36 μm 이다. 한쪽 끝은 약간 평평하고 다른 쪽 끝은 뾰족하며, 핵은 shell 내에 가득 차 있다.
- (2) 임상증상: 일반적으로 임상증상이 없으나 심한 감염의 경우 때때로, rectal prolapse, 장염, 장중첩증, 변비 등의 증상이 관찰된다.
- (3) 전파: 충란을 통해 전파되며, 분변 중의 충란을 섭취함으로써 감염된다.
- (4) 생활사
 - a. 총 11~15일로 길다
 - b. egg → 소장에서 larvae → 24시간 이내에 맹장으로 이동하여 성숙 → 대장으로 이동 후 egg를 낳는다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Syphacia muris*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 충체 관찰: 멸균된 생리식염수를 10 ml 정도 넣은 페트리 디쉬에 대장 내용물을 넣은 후 페트리 디쉬를 천천히 흔들면서 충체를 관찰한다.
 - b. 대장 내용물을 이용한 충란 및 충체 관찰
 - a) 소독한 핀셋으로 소량의 대장 내용물을 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b) 멸균된 생리식염수를 한 방울 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰한다.
 - c) 충란 및 충체를 관찰하고 충란의 형태로 *Aspicularis tetraptera*와 감별한다.
 - c. Perianal region에서 충란 및 충체 관찰: 일명 셀로판테이프 시험법이라 한다.
 - a) 항문 주위를 셀로판테이프로 누른 후 셀로판테이프를 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b) 광학현미경으로 관찰한다.
 - c) 충란 및 충체를 관찰하고 충란의 형태로 *Aspicularis tetraptera*와 감별한다.

(2) PCR법

- a. Target Tissue : 기생충
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 ‘DNA 추출법’을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁸¹⁾

a) PCR primer 작성

(a) Forward: GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT

(b) Reverse: TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT

- b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
30 cycles	94℃	30 sec
	60℃	30 sec
	72℃	30 sec
1 cycle	72℃	5 min

c) RFLP

- (a) 전기영동 후 양성 대조군과 비교하여 양성으로 확인된 PCR product 10 μ l를 0.5 μ l (10 U/ μ l)의 AluI enzyme으로 16~18시간 반응시킨다.
- (b) PCR 결과: 양성은 561 and 252 bp (2개 band 모두 나와야 양성)

81) Parel, J. D., Galula, J. U., Ooi, H. K. (2008). Characterization of rDNA sequences from *Syphacia obvelata*, *Syphacia muris*, and *Aspiculuris tetraptera* and development of a PCR-based method for identification. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 379-383.

3 *Syphacia obvelata*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목으로 마우스 pinworm이며 랫드, 저빌, 햄스터에도 감염된다.
 - a. 충체의 크기는 암컷이 3.4~5.8 mm이고, 수컷은 1.1~1.5 mm이다.
 - b. 충란의 크기는 길이가 118~153 μm 이고, 폭이 33~55 μm 이다. 한쪽 끝은 완전히 평평하고 다른 쪽 끝은 뾰족하며, 핵은 shell 내에 가득 차 있다.
- (2) 임상증상: 일반적으로 임상증상이 없으나 심한 감염의 경우 때때로, rectal prolapse, 장염, 장중첩증, 변비 등의 증상이 관찰된다.
- (3) 전파: 충란을 통해 전파되며, 분변 중의 충란을 섭취함으로써 감염된다.
- (4) 생활사
 - a. 총 11~15일로 길다
 - b. egg \rightarrow 소장에서 larvae \rightarrow 24시간 이내에 맹장으로 이동하여 성숙 \rightarrow 대장으로 이동 후 egg를 낳는다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Syphacia obvelata*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 충체 관찰: 멸균된 생리식염수를 10 ml 정도 넣은 페트리 디쉬에 대장 내용물을 넣은 후 페트리 디쉬를 천천히 흔들면서 충체를 관찰한다.
 - b. 대장 내용물을 이용한 충란 및 충체 관찰
 - a) 소독한 핀셋으로 소량의 대장 내용물을 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b) 멸균된 생리식염수를 한 방울 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰한다.
 - c) 충란 및 충체를 관찰하고 충란의 형태로 *Aspicularis tetraptera*와 감별한다.
 - c. Perianal region에서 충란 및 충체 관찰: 일명 셀로판테이프 시험법이라 한다.
 - a) 항문 주위를 셀로판테이프로 누른 후 셀로판테이프를 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b) 광학현미경으로 관찰한다.
 - c) 충란 및 충체를 관찰하고 충란의 형태로 *Aspicularis tetraptera*와 감별한다.

d. 충란의 형태⁸²⁾



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 기생충
- b. DNA 추출: 별첨 자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. PCR⁸³⁾

a) PCR primer 작성

- (a) Forward: GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT
- (b) Reverse: TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT

b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 PCR을 실시한다.

(a) PCR 조건

1 cycle	94℃	5 min
30 cycles	94℃	30 sec
	60℃	30 sec
	72℃	30 sec
1 cycle	72℃	5 min

c) RFLP

- (a) 전기영동 후 양성 대조군과 비교하여 양성으로 확인된 PCR product 10 μ l를 0.5 μ l (10 U/ μ l)의 AluI enzyme으로 16~18시간 반응시킨다.
- (b) PCR 결과: 양성은 320, 244, and 179 bp (3개 band 모두 나와야 양성)

82) 건국대 제공

83) Parel, J. D., Galula, J. U., Ooi, H. K. (2008). Characterization of rDNA sequences from *Syphacia obvelata*, *Syphacia muris*, and *Aspicularis tetraptera* and development of a PCR-based method for identification. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 379-383.

4 *Giardia muris*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 십이지장에 주로 존재하며, 배모양(pear-shaped)의 flagella를 가진 병원성 원충이다.
 - a. 크기는 trophozoite가 7~13 μm 크기이며, 폭은 5~10 μm 이다.
 - b. cyst는 타원체로 15x17 μm 크기이다.
- (2) 임상증상: 일반 마우스와 랫드는 임상증상이 나타나지 않지만 면역 억제 마우스와 랫드는 심한 경우 폐사한다.
- (3) 전파: 분변을 통해 전파되며, 분변을 섭취함으로써 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Giardia muris*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 소독한 핀셋으로 소량의 십이지장 내용물을 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 멸균된 생리식염수를 한 방울 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰한다.
 - c. 배 모양이면서 rolling 운동과 tumbling 운동을 하는 trophozoite를 관찰한다.
 - d. trophozoite의 형태



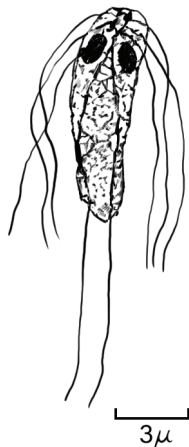
5 *Spironucleus muris*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 십이지장에 주로 존재하며, 긴 배 모양(elongated, pear-shaped)의 flagella를 가진 병원성 원충이다.
 - a. 크기는 trophozoite가 10~15 μm 크기이며, 폭은 3~4 μm 이다.
 - b. cyst는 타원체로 4x7 μm 크기이다.
- (2) 임상증상: 일반 동물에서는 임상증상이 나타나지 않는다.
- (3) 전파: 분변을 통해 전파되며, 분변을 섭취함으로써 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Spironucleus muris*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 소독한 핀셋으로 소량의 십이지장 내용물을 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 멸균된 생리식염수를 한 방울 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰한다.
 - c. 배 모양이면서 직선운동과 zigzag 운동을 하는 trophozoite를 관찰한다.
 - d. trophozoite의 형태



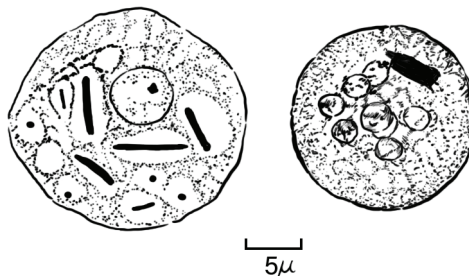
6 *Entamoeba muris*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 맹장과 결장에 주로 존재하는 비병원성 원충이다.
 - a. 크기는 trophozoite가 8~30 μ m이다.
 - b. cyst는 구경으로 지름이 9~20 μ m이고 성숙하면 8개의 핵을 가진다.
- (2) 임상증상: 일반 동물에서는 임상증상이 나타나지 않는다.
- (3) 전파: 분변을 통해 전파되며, 분변을 섭취함으로써 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Entamoeba muris*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 소독한 핀셋으로 소량의 맹장 또는 결장 내용물을 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 멸균된 생리식염수를 한 방울 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰한다.
 - c. trophozoite와 cyst를 관찰한다.
 - d. trophozoite 및 cyst의 형태



7 *Tritrichomonas muris*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 맹장, 결장에 주로 존재하며, 편모를 가진 비병원성 원충이다.
 - a. 크기는 trophozoite가 16~26 μm 크기이며, 폭은 10~14 μm 이다.
 - b. cyst 형태는 존재하지 않는다.
- (2) 임상증상: 일반 동물에서는 임상증상이 나타나지 않는다.
- (3) 전파: 분변을 통해 전파되며, 분변을 섭취함으로써 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Tritrichomonas muris*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 소독한 핀셋으로 소량의 맹장 또는 결장 내용물을 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 멸균된 생리식염수를 한 방울 떨어뜨린 후 커버글라스를 덮은 후 광학현미경으로 관찰한다.
 - c. 3개의 anterior flagella와 하나의 posterior flagellum을 가는 trophozoite를 관찰한다.
 - d. trophozoite의 형태



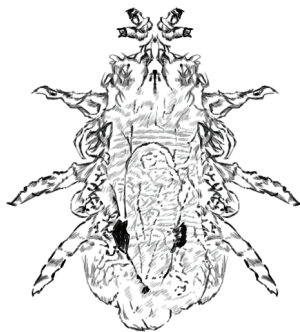
8 *Myobia musculi*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스, 랫드의 검사항목으로 진드기(mite)이다. 암컷은 길이가 400~500 μm , 수컷은 285~320 μm 이다.
- (2) 임상증상: 가렵고, 피부가 지저분하게 탈모가 생기고, 심한 경우 궤양과 농포가 관찰된다. 일반적으로 머리, 목의 등 쪽에 병변이 관찰되고, 심한 경우 전신에 나타난다.
- (3) 전파: 접촉 감염으로 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Myobia musculi*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 셀로판테이프로 감염된 피부를 한번 누른 후 셀로판테이프를 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 광학현미경으로 관찰하여 감별한다.
 - c. *Myobia musculi*의 암컷 형태



9 *Myocoptes musculus*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목으로 진드기(mite)이다. 암컷은 길이가 300 μm 폭이 130 μm 이고, 수컷은 190 μm , 폭은 135 μm 이다.
- (2) 임상증상: 가렵고, 피부가 지저분하게 탈모가 생기고, 심한 경우 궤양과 농포가 관찰된다. 일반적으로 머리, 목의 등 쪽에 병변이 관찰되고, 심한 경우 전신에 나타난다.
- (3) 전파: 접촉으로 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Myocoptes musculus*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 셀로판테이프로 감염된 피부를 한번 누른 후 셀로판테이프를 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 광학현미경으로 관찰하여 감별한다.
 - c. *Myocoptes musculus*의 수컷 형태



(2) PCR법

- a. Target Tissue : 털, 피부
- b. DNA 추출: 별첨자료 5 'DNA 추출법'을 이용하여 DNA를 추출한다.
- c. Nested PCR⁸⁴⁾
 - a) PCR primer 작성
 - (a) Forward: AGG TGA AAC CGC GAA TGG CTC A
 - (b) Reverse: GAG AGA TGG CTA CTA CGT CCA AGG
 - b) 상업용으로 판매되고 있는 PCR kit를 구입하여 nested PCR을 실시한다.
 - (a) 1st PCR 조건

1 cycle	94°C	3 min
35 cycles	94°C	45 sec
	58°C	45 sec
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	7 min

(b) 2nd PCR 조건

1 cycle	94°C	3 min
35 cycles	94°C	45 sec
	58°C	45 sec
	72°C	1 min
1 cycle	72°C	7 min

(c) PCR 결과: 양성은 178 bp

84) Lee, M. A., Shen, Z., Holcombe, H. R., Ge, Z., Franklin, E. G., Ricart Arbona, R. J., Lipman, N. S., Fox, J. G., Sheh, A. (2019). Detection of *Myocoptes musculinus* in fur swab and fecal samples by using PCR analysis. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 58(6), 796-801.

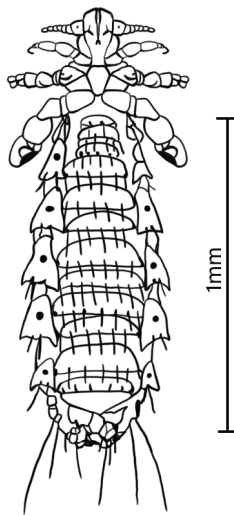
10 *Polyplax serrata*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목으로 마우스에 감염되는 이(louse)이다. 크기는 암컷이 평균 1.33 mm이고 수컷이 평균 0.96 mm이다.
- (2) 임상증상: 거의 관찰되지 않으며 심한 경우 가려움증이 관찰된다.
- (3) 전파: 접촉감염으로 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Polyplax serrata*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 셀로판테이프로 감염된 피부를 한번 누른 후 셀로판테이프를 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 광학현미경으로 관찰하여 감별한다.
 - c. *Polyplax serrata*의 암컷 형태



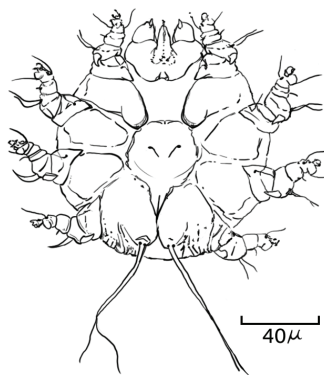
11 *Psorergates simplex*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 마우스의 검사항목으로 진드기(mite)이다. 길이가 90~150 μm 이다.
- (2) 임상증상: 가렵고, 피부가 지저분하게 탈모가 생기고, 심한 경우 궤양과 농포가 관찰된다. 일반적으로 머리, 목의 등 쪽에 병변이 관찰되고, 심한 경우 전신에 나타난다.
- (3) 전파: 접촉감염으로 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Psorergates simplex*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 셀로판테이프로 감염된 피부를 한번 누른 후 셀로판테이프를 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 광학현미경으로 관찰하여 감별한다.
 - c. *Psorergates simplex*의 암컷 형태



12 *Radfordia ensifera*

가) 원인체의 특성

- (1) 역학: 랫드의 검사항목으로 랫드에 감염되는 진드기(mite)이다.
- (2) 임상증상: 거의 관찰되지 않으며 심한 경우 가려움증이 관찰된다.
- (3) 전파: 접촉감염으로 감염된다.

나) 검사법

- (1) 현미경검사법: *Radfordia ensifera*의 검사법으로 일반적으로 사용된다.
 - a. 셀로판테이프로 감염된 피부를 한번 누른 후 셀로판테이프를 슬라이드글라스 위에 옮긴다.
 - b. 광학현미경으로 관찰하여 감별한다.



별첨 자료

설치류 미생물 품질관리 매뉴얼

1. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법	133
2. IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법	134
3. 조직을 이용한 유제액 제조 방법(샘플 전처리)	135
4. RNA 추출법	136
5. DNA 추출법	137
6. API (Analytical Profile Index) 검사법	138

1

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 검사 방법

- (1) 혈청 분리: 채혈을 통해 얻은 혈액을 튜브에 담아 실온에 응고시킨 후 원심분리해 상층액을 분리한다.
- (2) 혈청 희석: 혈청을 sample diluent buffer로 희석한다.*
- (3) 1차 반응: ELISA plate에 희석한 혈청, 양성 대조군, 음성 대조군(blank)을 분주한 후 ELISA plate를 37℃ 배양기에 방치한다.
- (4) 1차 세정: ELISA plate에 들어있는 용액은 버리고 세정액을 분주한 후 세정한다.*
- (5) 2차 반응: Conjugate diluent buffer 또는 희석한 enzyme-conjugated anti-mouse (mouse 혈청 검사용) 또는 enzyme-conjugated anti rat (rat 혈청 검사용)을 분주한 후 ELISA plate를 37℃ 배양기에 방치한다.
- (6) 2차 세정: ELISA plate에 들어있는 용액은 버리고 세정액을 분주한 후 세정한다.
- (7) 3차 반응: 3차 반응액을 분주한 후 ELISA plate를 37℃ 배양기에 방치한다. 암반응을 일으키기 위해 ELISA plate를 알루미늄 호일로 씌운다.
- (8) 반응정지: 반응 정지 용액을 분주한다.
- (9) 결과판독: ELISA plate reader기를 이용하여 적정 파장*에서 흡광도(OD)값을 측정한다. OD값 판독은 사용하는 kit의 제조사 기준에 따른다.

* 사용하고자 하는 키트 매뉴얼에 따른다.

2

IFA (Immunofluorescence Assay) 검사 방법

- (1) 혈청 분리: 채혈을 통해 얻은 혈액을 튜브에 담아 실온에 응고시킨 후 원심분리해 상층액을 분리한다.
- (2) IFA slide 준비: 적절한 IFA slide를 준비한다.
- (3) 혈청 희석: 혈청을 sample diluent buffer로 희석한다.*
- (4) 1차 반응: IFA slide에 희석한 혈청, 양성 대조군, 음성 대조군(blank)을 분주한 후 IFA slide를 37℃ 배양기에 방치한다. 이때 slide가 마르지 않도록 humidified chamber에서 반응시킨다.
- (5) 1차 세정: phosphate-buffered saline (PBS)로 슬라이드를 세정 후 슬라이드의 세정액을 제거한다.*
- (6) 2차 반응: 2차 반응용 형광 표지 항체를 적절한 배경 염색약으로 희석하여 분주한 후 IFA slide를 37℃ 배양기에 놓아둔다. 이때 slide가 마르지 않도록 humidified chamber에서 반응시킨다.*
- (7) 2차 세정: PBS로 슬라이드를 세정 후 슬라이드의 세정액을 제거한다.
- (8) 결과판독: cover glasses로 IFA slide로 덮은 후 형광 현미경으로 관찰한다. 관찰된 형광을 양성 대조군과 음성 대조군의 형광과 비교하면서 결과를 판독한다.

* 사용하고자 하는 키트 매뉴얼에 따른다.

3 조직을 이용한 유제액 제조 방법(샘플 전처리)⁸⁵⁾

- (1) 막자와 막자사발, 희석액, 해사(sea sand), 튜브를 멸균 처리해 준비한다.
- (2) 준비된 막자사발(또는 homogenizer)에 조직 일정량과 해사를 넣고 균질화한다. 필요시 소량의 희석액을 첨가하면 치밀한 조직을 갈 때 도움이 된다. 막자사발을 대신하여 균질기를 이용할 수 있으며, 이 경우 조직과 소량의 희석액만 넣고 균질화한다.
- (3) 멸균된 희석액을 넣어 적정 비율로 희석해 유제액을 제조한다.
- (4) 유제액은 일정 시간 정치하거나 단시간 원심분리해 덜 파쇄된 조직을 가라앉게 한 후 상층액을 취해 DNA 또는 RNA 추출에 이용한다.

85) <https://bento.bio/protocol/biotechnology-101/dna-extraction-from-tissue/>

4 RNA 추출법

가. Trizol 이용

- (1) 멸균된 tube에 조직, Trizol을 넣은 후 균질기로 조직을 잘 분쇄한다.
- (2) 실온에서 방치 후 chloroform을 넣고 inverting한 후 다시 실온 방치한다.
- (3) 4℃ 원심분리한다.
- (4) 상층액과 isopropanol을 넣고 잘 섞은 후 얼음에 방치한다.
- (5) 4℃ 원심분리한다.
- (6) 상층액을 버리고 ethanol을 넣어 vortex한 후 4℃ 원심분리한다.
- (7) 상층액을 버리고 pellet을 air dry한다.
- (8) Pellet이 완전히 마른 후 elution buffer를 넣어 pellet을 녹인다.
- (9) RNA를 정량해 실험에 사용한다.

나. 제조사 키트 이용

- (1) 상업적으로 판매되는 RNA extraction kit를 사용, 해당 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA를 추출한다.
- (2) RNA를 정량해 실험에 사용한다.

5 DNA 추출법

가. PCI 이용

- (1) 멸균된 tube에 조직, lysis buffer, proteinase K를 넣고 항온수조에 방치한다.
- (2) PCI를 넣고 잘 섞은 후 4℃ 원심분리한다.
- (3) 상층액과 3M sodium acetate, ethanol을 넣고 잘 섞은 후 4℃ 원심분리한다.
- (4) 상층액을 버리고 ethanol을 넣어 잘 섞은 후 4℃ 원심분리한다.
- (5) 상층액을 버리고 pellet을 air dry한다.
- (6) Pellet이 완전히 마른 후 elution buffer를 넣어 pellet을 녹인다.
- (7) 상층액을 버리고 pellet을 air dry한다.
- (8) Pellet이 완전히 마른 후 DEPC-treated water를 넣어 pellet을 녹인다.
- (9) DNA를 정량해 실험에 사용한다.

나. 제조사 키트 이용

- (1) 분변: 상업적으로 판매되는 DNA stool kit를 사용, 해당 제조사의 매뉴얼에 따라 DNA를 추출한다. 추출한 DNA는 정량해 실험에 사용한다.
- (2) 조직: 상업적으로 판매되는 tissue DNA extraction kit를 사용, 해당 제조사의 매뉴얼에 따라 DNA를 추출한다. 추출한 DNA는 정량해 실험에 사용한다.

6 API (Analytical Profile Index) 검사법

가. 20 NE

(1) oxidase 시험법

- a. colony를 선택하고 filter paper에 세균 일부를 도말한다.
- b. 세균 도말 부위에 한 방울의 oxidase 시약을 떨어뜨린다.
- c. 진한 보라색이면 양성, 색 변화가 없으면 음성으로 판정한다.

(2) API 20NE 사용법

- a. incubator box를 준비하고 약 5 ml의 멸균 증류수를 tray에 넣어 수분을 유지하도록 한다.
- b. strip의 포장을 제거한 후 strip을 배양 트레이에 위치시킨다.
- c. 배양 box의 옆면에 개체번호를 혹은 sample 번호를 쓴다.
- d. 0.85% NaCl 용액(saline) 2 ml에 순수 배양된 세균의 colony를 McFarland scale 0.5 정도로 맞추어 NO₃부터 PNPg까지 기포가 생기지 않게 tube 부분까지 채운다.
- e. AUX medium에 200 μl의 남아있는 세균 부유액을 넣는다.
- f. 잘 섞은 후 GLU에서 PAC까지 큐플까지 채운다.
- g. 광유를 GLU, ADH, URE의 큐플 부분에 넣는다.
- h. 24시간 동안 29 ± 2°C 호기적인 상태에서 배양기에서 배양한다.

(3) 결과판독

- a. 결과판정 표에 따라 양성과 음성을 판독한다.
- b. NO₃ 판정: NIT 1시약 한 방울과 NIT 2시약 한 방울을 NO₃ 큐플에 떨어뜨린다. 5분 이내에 적색으로 변색되면 양성 노란색은 음성으로 판정한다. 음성 반응은 nitrogen으로 환원 때문일 수 있다. 음성일 경우에는 Zn을 2~3 mg 넣고 5분 후에 무색으로 남아있으면 양성이 된다. 큐플이 pink-red가 되면 반응은 음성이고 이는 nitrate가 tube에 존재하고 zinc에 의해 nitrate가 환원된 것이다.
- c. TRP 판정: 한 방울의 JAMES 시약을 넣는다. 분홍색으로 변화가 있으면 양성, 색 변화가 없으면 음성으로 판정한다.
- d. 모든 결과를 판독한 후 ApiLab plus V3.2.2를 이용하거나 혹은 인터넷⁸⁶⁾에 등록 후 결과를 컴퓨터를 이용해 직접 입력한 후 결과를 판독한다.

86) <https://apiweb.biomerieux.com>

- e. API 20NE는 모든 미생물을 동정할 수 있는 것이 아님을 명심하고 실험동물에서 미생물 검색 시 병원성 세균 중 *Bordetella*속, *Pateurella*속, *Pseudomonas*속의 미생물만을 동정할 수 있다.

나. 20 E

(1) 사용법

- incubator box를 준비하고 약 5 ml의 멸균 증류수를 tray에 넣어 수분을 유지하도록 한다.
- strip의 포장을 제거한 후 strip을 배양 트레이에 위치시킨다.
- 배양 box의 옆면에 개체번호를 혹은 sample 번호를 쓴다.
- suspension medium 5 ml 앰플을 열고 colony를 부유시킨다(*Vibrio* sp.는 호염성이므로 NaCl 0.85% 용액에 부유시킨다).
- CIT, VP, GEL은 큐플까지 균액을 가득 채우고, 나머지는 큐플을 제외하고 튜브까지 채운다.
- ADH, LDC, ODC H₂S URE는 혐기적 조건을 만들기 위해 광유로 큐플을 덮는다.
- 호기적 상태에서 36 ± 2°C 배양기에서 18~24시간 동안 배양한다.
- 24시간 후에 판독할 수 없으면 배양기에서 꺼내 냉장고에 보관하면서 반응을 관찰한다.

(2) 결과판독

- 만약 glucose가 음성이고 양성 반응이 3개 이하이면 보조 시약을 첨가한다.
 - TDA test: TDA 시약을 한 방울 떨어뜨려 질은 갈색으로 변하면 양성으로 기록한다.
 - IND test: JAMES 시약을 한 방울 첨가하고 바로 결과를 판독하며, 큐플 전체가 분홍색이면 양성이다.
 - VP test: VP1과 VP2를 한 방울씩 떨어뜨려 10분 후 결과를 판독하며, 분홍색 및 붉은색이면 양성이다. 10분 후에 나타나는 옅은 분홍색은 음성으로 간주한다.
 - NO₂ test: GLU 튜브에 NIT1과 NIT 시약을 한 방울씩 첨가하여 2~5분 후에 결과를 판독하며, 붉은색이면 양성이다. 노란색은 음성으로 판정한다. 음성 반응은 nitrogen으로 환원 때문일 수 있다. 음성일 경우에는 Zn을 2~3 mg 넣고 5분 후에 무색으로 남아있으면 양성이다. 큐플이 pink-red가 되면 반응은 음성이고 이는 nitrate가 tube에 존재하고 zinc에 의해 nitrate가 환원된 것이다.
 - nitrate 환원반응과 indole 생성 반응은 가장 마지막에 이루어져야 한다.

- b. 모든 결과를 판독한 후 ApiLab plus V3.2.2를 이용하거나 혹은 인터넷⁸⁷⁾에 등록 후 결과를 컴퓨터를 이용해 직접 입력한 후 결과를 판독한다.

다. CORYNE V. 2.0.

(1) 사용법

- a. incubator box를 준비하고 약 5 ml의 멸균 증류수를 tray에 넣어 수분을 유지하도록 한다.
- b. strip의 포장을 제거한 후 strip을 배양 트레이에 위치시킨다.
- c. 배양 box의 옆면에 개체번호를 혹은 sample 번호를 쓴다.
- d. suspension medium 3ml에 순수 배양된 세균의 colony를 McFarland scale 6 이상으로 맞추고 NIT에서 ESC는 각 큐플 당 100 μ l~150 μ l를 분주하고, URE는 튜브까지 GEL은 튜브와 큐플을 모두 채운다.
- e. API GP medium에 나머지 부유액 0.5 ml을 잘 섞은 후 남은 9개에 tube까지만 분주한다.
- f. URE에서 0 그리고 GLYG까지 광유를 첨가한 후 호기적 상태에서 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 배양기에서 24시간 배양한다.

(2) 결과판독

- a. 보조 시약을 첨가한다.
 - a) NIT test: NIT1, NIT 1방울
 - b) PYZ test: PYZ 시약 한 방울
 - c) PyrA, PAL, β GUR, β GAL, α GLU, β NAG test: ZYMA, ZYMB 시약을 한 방울
- b. 10분 후 판독표에 의거 결과를 판정한다. 만약 필요하다면 strip을 강한 빛(1000W)에 10초간 노출시켜 10분 뒤 판독한다.
- c. 21번째 CATalase test는 ESC나 GEL에 3% hydrogen peroxide 한 방울을 넣고 1분 뒤 기포가 생기면 양성이다.
- d. 모든 결과를 판독한 후 ApiLab plus V3.2.2를 이용하거나 혹은 인터넷⁸⁸⁾에 등록 후 결과를 컴퓨터를 이용해 직접 입력한 후 결과를 판독한다.

87) <https://apiweb.biomerieux.com>

88) <https://apiweb.biomerieux.com>

라. Staph

(1) 사용법

- incubator box를 준비하고 약 5 ml의 멸균 증류수를 tray에 넣어 수분을 유지하도록 한다.
- strip의 포장을 제거한 후 strip을 배양 트레이에 위치시킨다.
- 배양 box의 옆면에 개체번호를 혹은 sample 번호를 쓴다.
- API Staph medium의 앰플에 순수 배양된 세균의 colony를 McFarland scale 0.5 정도로 맞춘 후 멸균된 피펫으로 microtube의 tube 부분까지 채운다(거품이 생기지 않도록 주의한다).
- 혐기성 배양을 위해 ADH와 URE는 mineral oil을 채운다.
- 배양 box를 닫고 $36 \pm 2^\circ\text{C}$ 호기적인 상태에서 배양기에서 18~24시간 배양한다.

(2) 결과판독

- 다음 시약을 한 방울씩 넣은 후 결과를 판독한다.
 - VP test: VP1과 VP2를 넣은 후 10분 정도 배양하여 pale 핑크 및 옅은 핑크색 이면 음성으로 판단한다.
 - NIT test: NIT1과 NIT2 시약을 넣은 후 10분 정도 배양하여 붉은색은 양성을 나타낸다.
 - PAL test: ZYM A과 ZYM B 시약을 넣은 후 10분 정도 배양하여 보라색으로 변색되면 양성으로 판단한다.
- 모든 결과를 판독한 후 ApiLab plus V3.2.2를 이용하거나 혹은 인터넷⁸⁹⁾에 등록 후 결과를 컴퓨터를 이용해 직접 입력한 후 결과를 판독한다.

마. 20 Strep

(1) 사용법

- incubator box를 준비하고 약 5 ml의 멸균 증류수를 tray에 넣어 수분을 유지하도록 한다.
- strip의 포장을 제거한 후 strip을 배양 트레이에 위치시킨다.
- 배양 box의 옆면에 개체번호를 혹은 sample 번호를 쓴다.
- suspension medium 2 ml에 순수 배양된 세균의 colony를 McFarland scale 4 이상으로 맞춘다.
- VP에서 LAP는 큐플의 크기가 절반으로 구성되어 있으며 각각 100 μl 씩 분주한다.

89) <https://apiweb.biomerieux.com>

- f. ADH는 튜브 부분만 채운다.
- g. GP medium에 나머지 세균 부유액을 넣어 잘 섞은 후 RIB에서 GLYG까지의 tube에만 분주한다.
- h. ADH와 GLYG는 큐플에 광유를 첨가한다.
- i. $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 배양기에서 4시간 배양 후 판독하고 두 번째 판독은 24시간 후에 진행한다.

(2) 결과판독

- a. 4시간 배양 후에 다음 시약을 첨가한다.
 - a) VP test: VP1과 VP2를 1방울 넣는다.
 - b) HIP test: NIN을 2방울 넣는다.
 - c) PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL, LAP test: ZYM A와 ZYM B를 1방울씩 넣는다.
 - d) 10분 후 판독표에 의해 결과를 확인한다. 필요한 경우 PYRA에서 LAP의 튜브까지 초과된 시약을 탈색하기 위해 스트립을 강한 빛(1000, Lamp에서 10초 동안)에 노출시킨다.
- b. Identification not valid before 24 hours of incubation과 같은 경우, 24시간 후 ESC, ADH, RIB에서 GLYG 반응까지 재확인하고 효소적인 반응은 판독하지 않는다. VP 반응도 판독하지 않는다.
- c. 모든 결과를 판독한 후 ApiLab plus V3.2.2를 이용하거나 혹은 인터넷⁹⁰⁾에 등록 후 결과를 컴퓨터를 이용해 직접 입력한 후 결과를 판독한다.

90) <https://apiweb.biomerieux.com>

미생물 모니터링 검사 주기

최소검사주기	바 이 러 스
3개월	Hantavirus
	Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV)
	Mouse hepatitis virus (MHV)
	Murine norovirus (MNV)
	Rat coronavirus (Sialodacryoadenitis virus, SDAV)
	Sendai virus (HVJ)
	Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)
6개월	Ectromelia virus (Mousepox)
	H-1 virus
	Kilham rat virus (KRV)
	Minute virus of mice (MVM)
	Mouse adenovirus (MAV)
	Mouse rotavirus [Epizootic diarrhea of infant mice (EDIM)]
	Pneumonia virus of mice (PVM)
	Rat minute virus (RMV)
	Rat parvovirus (RPV)
	Rat theilovirus (RTV)
Reovirus 3	
12개월	K virus (Mouse pneumonitis virus)
	Lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV)
	Mouse cytomegalovirus (MCMV)
	Mouse parvovirus (MPV)
	Mouse thymic virus (MTV)
	Polyoma virus

최 소 검 사 주 기	세 균
3개월	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
	<i>Citrobacter rodentium</i>
	<i>Corynebacterium bovis</i>
	<i>Corynebacterium kutscheri</i>
	<i>Helicobacter bilis</i>
	<i>Helicobacter hepaticus</i>
	<i>Helicobacter typhlonius</i>
	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Rodentibacter heylii</i>
	<i>Rodentibacter pneumotropicus</i>
	<i>Salmonella</i> spp. (<i>S. Typhimurium</i> 포함)
	<i>Staphylococcus aureus</i>
6개월	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	β -hemolytic Streptococci
	<i>Clostridium piliforme</i> (Tyzzer's disease)
12개월	<i>Filobacterium rodentium</i>
	<i>Streptobacillus moniliformis</i>

최 소 검 사 주 기	진 균
3개월	<i>Pneumocystis carinii</i>
	<i>Pneumocystis murina</i>
6개월	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (Dermatophytes)
12개월	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>

최 소 검 사 주 기	기 생 충
3개월	<i>Aspiculuris tetraptera</i>
	<i>Entamoeba muris</i>
	<i>Giardia muris</i>
	<i>Myobia musculi</i>
	<i>Myocoptes musculinus</i>
	<i>Polyplax serrata</i>
	<i>Psorergates simplex</i>
	<i>Radfordia ensifera</i>
	<i>Spiroucleus muris</i>
	<i>Syphacia muris</i>
<i>Syphacia obvelata</i>	

설치류 미생물 품질관리 매뉴얼

편집위원장 독성평가연구부장 오재호

편집위원 이종권, 윤소영, 강명희, 이재원, 최형화, 김희배,
나혜지, 서민경, 박지수, 강병철(서울대), 최양규(건국대),
김나원(건국대), 남기택(연세대), 강상철(옵티팜)

발행일 2023년 9월 25일

발행인 식품의약품안전평가원장 박윤주

발행처 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 실험동물자원과
충청북도 청주시 오송생명2로 187(오송읍)

발간등록번호 11-1471057-000631-01