

Validation of NAT method for the detection of Mycoplasma

- 세포치료제, 백신 등 바이오의약품 생산에 필수적인 Mycoplasma 부정시험용
- Real-Time PCR을 이용한 신속한 오염 검출
- 한국 MFDS, EP, JP, USP 등 현존하는 가이드라인 모두 만족
- Dual probe system: Positive control에 의한 Cross contamination 확인
- UDG를 이용한 Carry-over contamination 방지



■ 서론

마이코플라스마는 세포배양 시 주된 오염원으로 세포가 생산하는 제품의 양과 품질을 저하시킵니다. 또한 제조공정의 일관성을 해치며 일부는 병원성을 갖고 있어 폐렴, 비뇨생식기 감염을 일으키기도 합니다. 기존 마이코플라스마 부정시험법으로는 직접배양법과 지시세포 배양법이 사용되어 왔습니다. 하지만, 긴 시간(28일)이 소요되고, 마이코플라스마 균주를 배양해야 하는 어려움이나 환경오염의 걱정 등으로 세포치료제를 포함한 첨단바이오의약품 생산에 적용하기에는 여러 문제점이 있었습니다. 국내에서는 2012년 핵산증폭기술(NAT)을 도입한 마이코플라스마 신속시험법 적용이 가능하게 되면서 기존 시험법의 문제점들을 극복할 수 있게 되었습니다. 유럽약전 2.6.7(EP 2.6.7)과 국내 식품의약품안전처(MFDS)등 지침에 따르면 신속시험법으로 기존 배양 방식을 대체하기 위해서는 마이코플라스마를 10 CFU/mL까지 검출할 수 있는 높은 민감도와 특이도가 필요합니다.

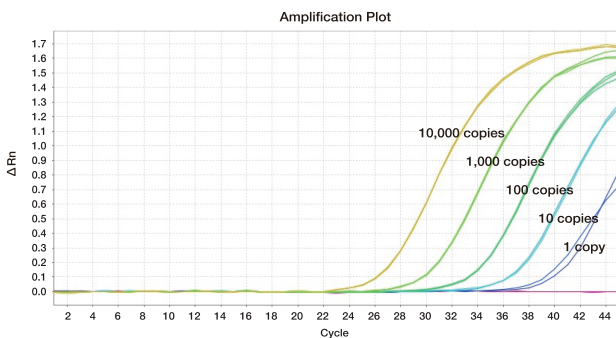
■ 높은 민감도와 특이도를 바탕으로 현존하는 가이드라인

모두 만족하는 마이코플라스마 검출 키트

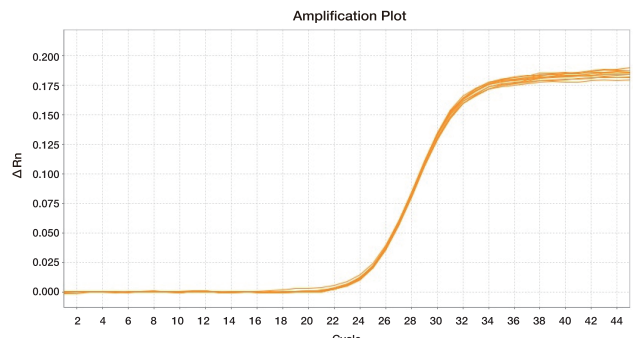
MycoQSearch™ Mycoplasma qPCR Detection Kit는 hydrolysis probe를 이용한 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time PCR 또는 qPCR)을 이용하여 마이코플라스마 오염을 검출할 수 있는 제품입니다. Primer는 마이코플라스마 genome의 highly conserved 16S rRNA coding 부분에 특이적이므로, 세포 배양의 주 오염원인 *M. orale*, *M. hyorhinitis*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *Acholeplasma laidlawii*, *M. hominis*를 검출할 수 있으며, *M. pneumoniae*, *M. salivarium*, *M. synoviae*, *Spiroplasma citri* 그리고 *Ureaplasma* 종을 포함한 대부분의 mycoplasma를 검출할 수 있습니다. 그러나 진핵 세포 및 *E.coli* 등의 박테리아 DNA는 증폭되지 않습니다. *MycoQSearch™* Mycoplasma qPCR Detection Kit는 세포 배양의 마이코플라스마 오염을 3시간 이내에 검출할 수 있습니다. 또한 현존하는 가이드라인에서 요구하는 민감도(10 CFU/mL)을 만족합니다.



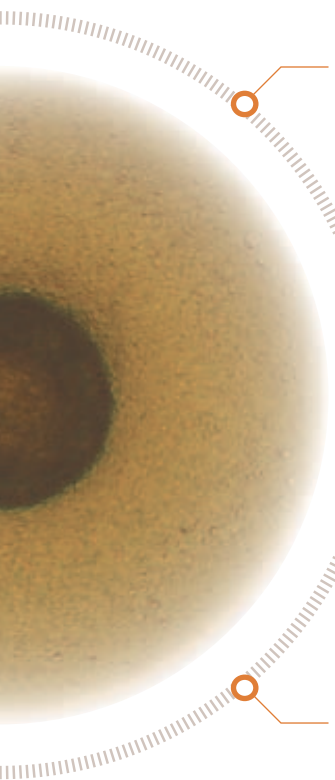
Product name	Cat. No
<i>MycoQSearch™</i> Mycoplasma qPCR Detection Kit (EP)	QDEP-100
<i>MycoQSearch™</i> Plus Mycoplasma qPCR Detection Kit (EP)	QDPEP-100



FAM Channel, Mycoplasma detection



HEX Channel, Internal Amplification Control (IAC)



민감도

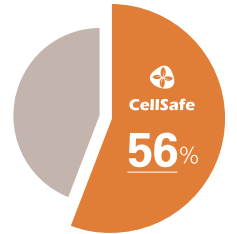
특이도

완건성

비교동등성

■ 성공적인 밸리데이션

국내 최대 세포치료제 회사를 포함한 수많은 고객들이 셀세이프의 MycoQSearch™ Mycoplasma qPCR Detection Kit를 사용하여 바이오 의약품에 대한 규정을 준수하고 있습니다. MycoQSearch™ Mycoplasma qPCR Detection Kit의 높은 민감도와 마이코플라스마에 대한 특이도는 기존 배양법을 대체할 수 있도록 검증되었습니다. 국내 첨단바이오 의약품 회사 약 56%가 셀세이프의 고객입니다. (국내 첨단바이오의약품 업종 46개사 중 26개사. 출처: 식약처 의약품안전나라 업체정보)



셀세이프 시장 점유율

■ 신속법 밸리데이션을 위한 마이코플라스마 참조 패널생산

셀세이프는 정확하게 정량된 마이코플라스마 참조 패널을 제조합니다. 10 CFU 또는 100 CFU 표준품은 마이코플라스마 사균으로 구성된 제품으로 실험 환경 오염 걱정 없이 안전하게 사용할 수 있습니다. 마이코플라스마 10 CFU 또는 100 CFU 참조 패널 균주는 배양법과의 비교동등성 시험뿐만 아니라, 핵산증폭기술(NAT)을 도입한 마이코플라스마 검출법의 민감도 검증 및 완전성 검증 등에 사용됩니다. 또한, digital PCR을 이용해 보다 정확하게 정량한 마이코플라스마 Genomic DNA(100,000 copies)는 검출 한계 검증에 용이합니다. COA서류(Certificate of Analysis)는 각 lot에 대한 GC/CFU 비율 정보를 제공합니다.



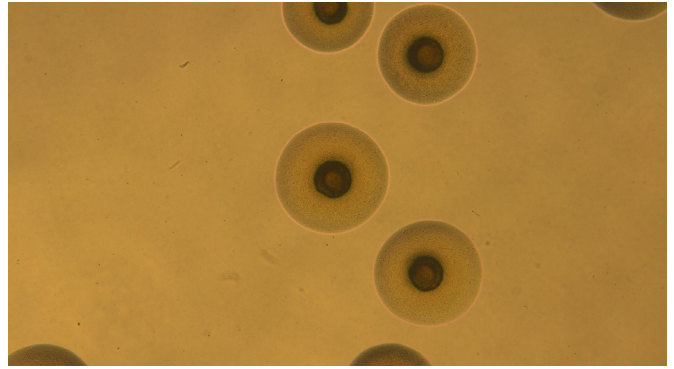
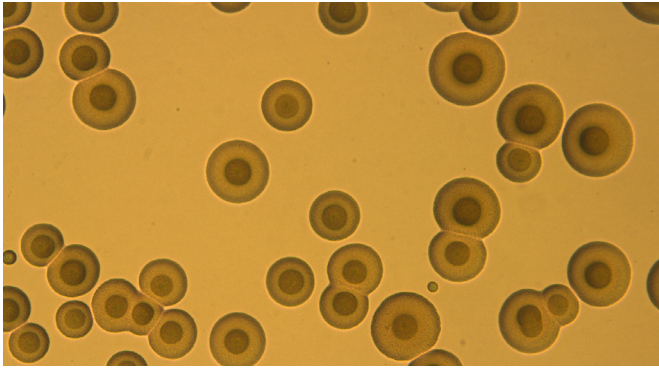
CFU



gDNA

Product name	Cat. No
Mycoplasma 10 CFU <i>M. arginini</i>	M10CFU-MA
Mycoplasma 10 CFU <i>A. laidlawii</i>	M10CFU-AL
Mycoplasma 10 CFU <i>M. fermentans</i>	M10CFU-MF
Mycoplasma 10 CFU <i>M. hyorhinis</i>	M10CFU-MH
Mycoplasma 10 CFU <i>M. orale</i>	M10CFU-MO
Mycoplasma 10 CFU <i>M. pneumoniae</i>	M10CFU-MP
Mycoplasma 100 CFU <i>M. arginini</i>	M100CFU-MA
Mycoplasma 100 CFU <i>A. laidlawii</i>	M100CFU-AL
Mycoplasma 100 CFU <i>M. fermentans</i>	M100CFU-MF
Mycoplasma 100 CFU <i>M. hyorhinis</i>	M100CFU-MH
Mycoplasma 100 CFU <i>M. orale</i>	M100CFU-MO
Mycoplasma 100 CFU <i>M. pneumoniae</i>	M100CFU-MP

Product name	Cat. No
Quantitative <i>M. arginini</i> Genomic DNA	QAGD
Quantitative <i>A. laidlawii</i> Genomic DNA	QLGD
Quantitative <i>M. fermentans</i> Genomic DNA	QFGD
Quantitative <i>M. hyorhinis</i> Genomic DNA	QHGD
Quantitative <i>M. orale</i> Genomic DNA	QOGD
Quantitative <i>M. pneumoniae</i> Genomic DNA	QPGD



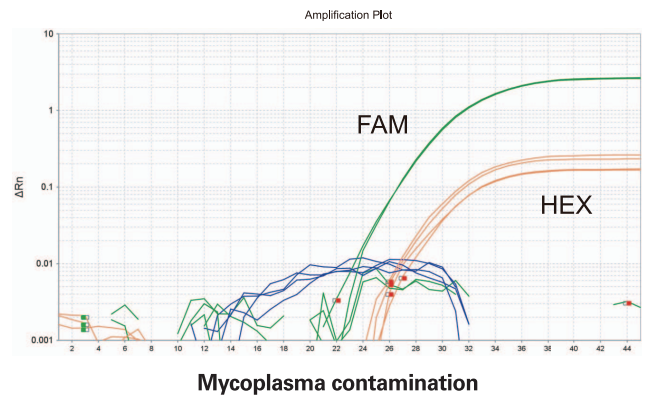
■ 추출대조군 설정을 통한 위음성 방지

부적절한 DNA 추출 또는 PCR inhibitor 등의 문제로 정상적인 PCR 증폭 반응이 이뤄지지 않는다면, 제품 내에 포함되어 있는 내부대조군(Internal DNA)에 의해 감지됩니다. 내부대조군(Internal DNA)은 전체 과정의 검증을 위해 DNA 추출 과정 및 PCR 분석 전에 샘플에 추가할 수 있습니다. 이런 검증은, 검체 내에 존재했을 수 있는 마이코플라스마가 DNA를 추출하는 과정에서 손실되어 위음성의 결과를 방지하는 역할을 수행합니다.

■ 최고의 오염방지시스템 실험자료

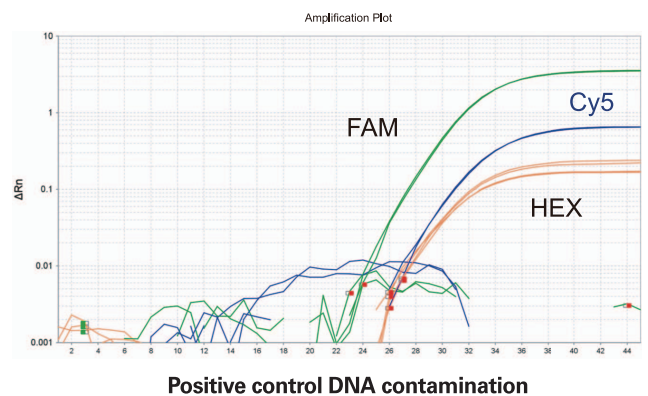
Dual probe system: 양성대조군에 의한 교차오염(Cross contamination) 확인가능

실험자의 실수나 에어로졸을 통해 양성 대조군이 검체를 오염시키는 경우 위양성 결과를 초래합니다. 제품에 포함된 양성대조군은 특수 설계된 2중 probe 증폭 시스템에 의해서 마이코플라스마 검출 신호인 FAM signal 뿐만 아니라 Cy5 signal이 동시에 발생하도록 되어 있습니다. 따라서 샘플에서 FAM과 Cy5가 모두 검출되면 교차오염에 의한 신호임을 쉽게 확인할 수 있습니다.



UDG system: 캐리-오버 오염(Carry-over contamination) 방지

반복적으로 PCR을 수행하는 경우 전에 수행된 PCR에서 생성된 PCR 증폭 산물(amplicon)이 다음 PCR 반응에 유입될 수 있는 가능성을 최소화시키도록 주의해야 합니다. 제품에 포함된 2X qPCR Master Mix에는 dTTP 대신 dUTP가 포함되어 있습니다. PCR 증폭에서 dTTP를 dUTP로 대체하면, UNG (Uracil-N-glycosylase, 제품에는 불포함)를 처리해서 dUTP를 포함하고 있는 PCR 산물의 재증폭을 방지할 수 있습니다. UNG는 dUTP를 포함하는 단일 그리고 이중 나선 DNA에 작용하고, dUTP가 포함된 DNA 부분의 uracil-glycosidic 결합을 hydrolysis시킵니다. 따라서 UDG 시스템이 사용되면 dTTP가 포함된 주형 DNA는 완전하게 유지되면서 캐리-오버(carry-over) 오염을 방지할 수 있습니다.

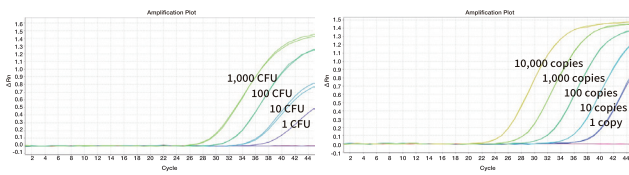


민감도 실험자료

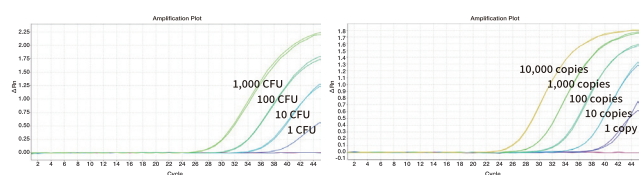
마이코플라스마 부정시험을 배양법을 대체하여 PCR 방법으로 수행하기 위해서는 검출한계가 10 CFU/mL 이하이어야 합니다. 하지만 PCR 기술은 유전자만 증폭·검출할 수 있으며, 1 CFU의 균 내 genomic copy수는 종마다, 배양조건에 따라 다릅니다. 시판되는 마이코플라스마 검출키트의 검출한계가 모두 10 CFU/mL로 동일해 보이지만 실제로는 genomic copy수/CFU 비율에 따라 Real-Time PCR(qPCR)의 민감도는 제각각입니다.

셀세이프의 MycoQSearch™ Mycoplasma qPCR Detection Kit는 타겟 유전자를 1~10 copies/reaction (1~10 CFU/mL)으로 검출할 수 있는 민감도를 보유하고 있습니다. 정확한 측정을 위해 마이코플라스마 균주 및 genomic DNA 참조 패널로 민감도 측정을 합니다.

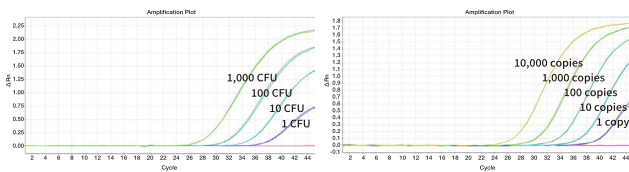
A. laidlawii



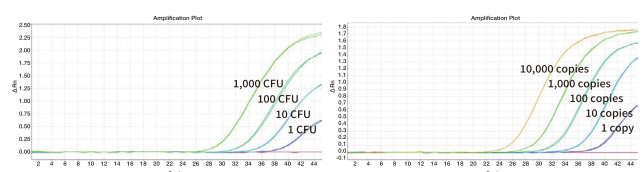
M. arginini



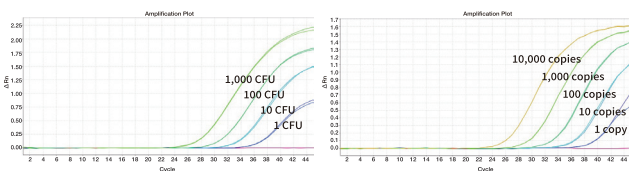
M. fermentans



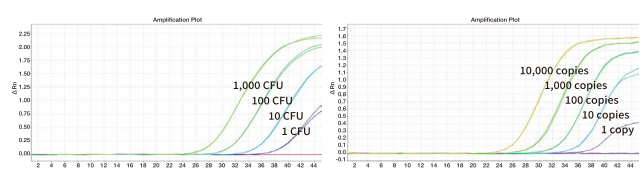
M. hyorhini



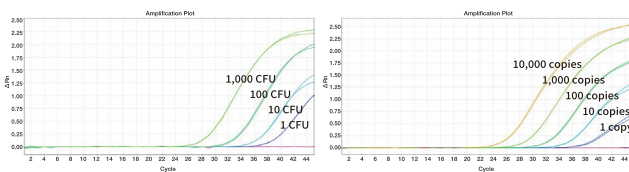
M. orale



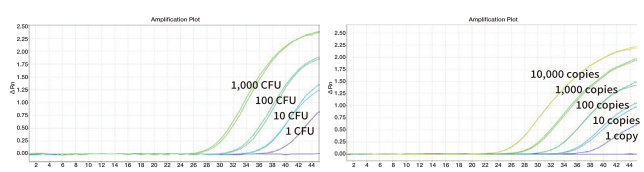
M. pneumoniae



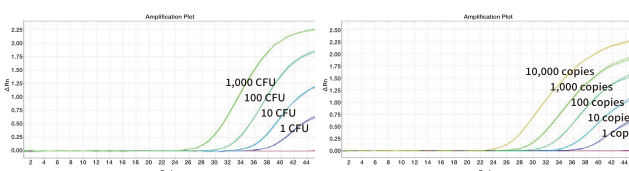
M. gallisepticum



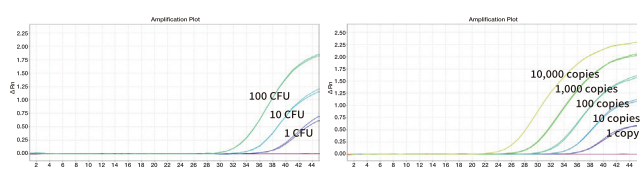
M. salivarium



M. synoviae



S. citri





www.cells-safe.com

Technical support: +82-31-285-9958, info@cells-safe.com