

Technical report

바이오 의약품의 Mycoplasma 검출시 험: 현재의 규제와 과제 및 트렌드

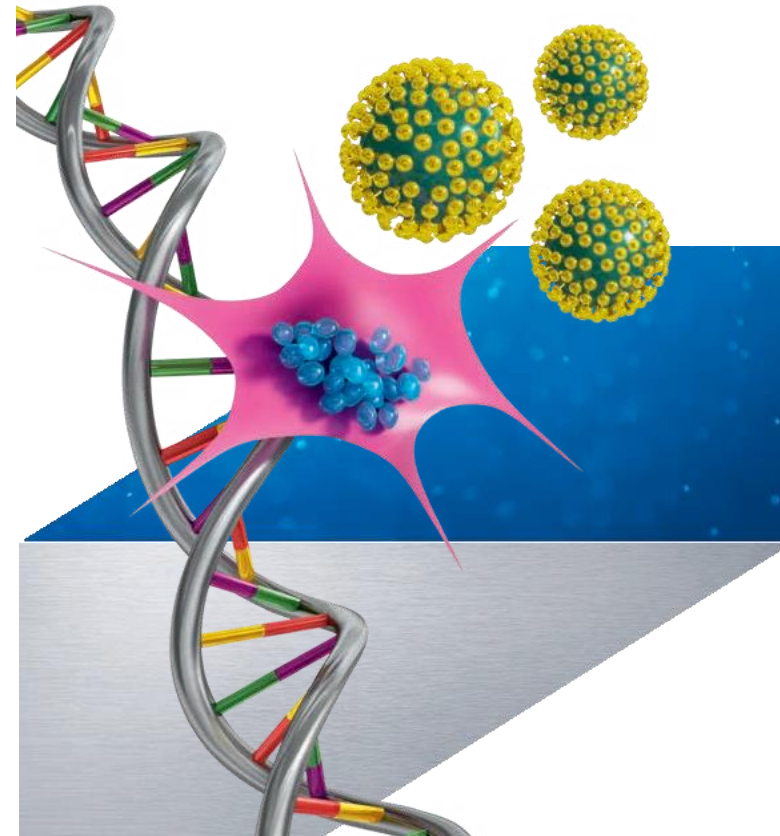
전통적인 배양 방법으로부터 대용량의 자동화
된 핵산증폭검사법을 이용한 방법까지

Preface

바이오 의약품(biologics 또는 Large molecule을 의미)의 생산과정에서 세포 배양의 오염은 바이오 의약품의 mycoplasma 오염으로 이어질 수 있으며, 바이오 의약품으로 치료를 받는 환자들의 건강을 위협할 수 있습니다. Mycoplasma는 종종 아주 작은 가시적 효과를 보이지만 사실상 모든 세포 배양과 관련된 매개변수에 영향을 미쳐 통제할 수 없는 환경을 조성하고 나아가 제약 업계가 원하지 않는 결과를 불러올 수 있습니다. 그러므로 규제 당국은 제조업자들에게 바이오 의약품에 대하여 검출시험을 시행하고 출시되는 의약품에 mycoplasma오염이 없음을 보장하게 합니다. 대부분의 규제 당국은 mycoplasma 검출시험에 관한 Protocol에 대하여 가이드라인이 발행하고, 신속한 핵산증폭검사법(nucleic acid amplification techniques, NAT)의 검증에 대한 권장 사항을 제공하고 있습니다. 그러나 mycoplasma 검출시험에 관한 이러한 권장 사항은 아직 시스템과 법규가 여러 국가 간에 통일이 되지 않는 상황이므로 검출시험법의 시행은 과제로 남아 있는 실정입니다.

January 2018

Sebastian Machado Weber, Dr. Andreas Rohwer, Alexander Bartes, Christina Krause, Raphael Greiner Roche CustomBiotech
Dr. Carl-Ulrich Zimmermann, Dr. Martina Sauert, Martin Vronka, Dr. Sandra Buczolics,
Prof. Dr. Renate Rosengarten
Mycoplasma Biosafety Services GmbH



Regulatory Disclaimer
For further processing only.

mycoplasma.cc
Mycoplasma Biosafety Services GmbH
BioTech Center Muthgasse M
uthgasse 11/2
1190 Vienna
Austria

Phone +43 136 720 450
Fax +43 136 720 453 01
office@mycoplasma.cc



Published by
Roche Diagnostics GmbH S
andhofer Straße 116
68305 Mannheim G
ermany

©2018
Mycoplasma Biosafety S
ervices GmbH,
Roche Diagnostics GmbH

All rights reserved.

CUSTOMBIOTECH

이 문서는 바이오 의약품에 대해 신속하고 자동화된 NAT기반의 Mycoplasma 검출 시험법을 시행하기 위하여 Roche MagNA Pure 96 또는 MagNA Pure 24 sample prep 시스템과 함께 Roche CustomBiotech MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR (polymerase chain reaction) Assay (MycoTOOL qPCR – <http://go.roche.com/mycotool>)에 관한 밸리데이션 및 시행 방법에 관한 가이드라인과 권장 사항을 제공하고 있습니다.

Chapter Overview

- 1. Mycoplasma에 관한 간략한 소개와 바이오 의약품 생산 과정에서의 Mycoplasma 관련성에 대해 다룹니다.
- 2. 기존에 존재하는 비 공정서 상(non-compendial)의 mycoplasma 검출시험과 공정서 상(compendial)의 mycoplasma 검출시험에 대한 개요 및 예시를 다룹니다. 공정서 상의 방법인 Culture 방법과 Indicator Cell Culture 방법에 대해 상세히 다룹니다. 또한 공정서 상의 검출시험인 신속한 NAT 기반의 방법을 소개합니다.
- 3. 신속한 mycoplasma 검출시험법의 시행 시 고려해야 할 규제 적 측면을 다룹니다. 규제와 관련된 가이드라인으로 European Pharmacopoeia (EP 2.6.7.)¹, United States Pharmacopoeia (USP <63>)², 및 Japanese Pharmacopoeia (JP 17th Ed.)³ 에 대해 논의합니다.
- 4. 제품 별 밸리데이션 및 시행 프로젝트의 설계와 권장되는 단계 별 접근법에 대해 다룹니다. 공급업체의 실사와 타당성 및 검증을 수행하는 단계부터 정기적인 검출시험을 수행하는 단계까지의 각 시행과정들을 다룹니다.
- 5. 마지막 장에서는 NAT기반의 신속한 Mycoplasma 검출시험에 관한 장기적인 전망에 대하여 요약과 견해를 제공합니다. 또한 이러한 신속한 검출시험이 조기 경보 시스템이나 품목 출시 검출시험으로 시행될 때의 장점들과 바이오 의약품 산업의 대체 검출시험 시스템으로써 제공하는 혁신적인 기회들에 대해 논의합니다.

About us

Roche CustomBiotech

Roche Diagnostics와 Roche Pharmaceuticals의 노하우를 활용하여 CustomBiotech은 바이오 의약품, 세포 치료제 그리고 체외진단기업의 고객들에게 최고급 품질의 원재료와 장비 그리고 서비스를 제공하며 규제 사항과 품질에 대한 고객의 독특한 요구에 부합하는 맞춤형 제품을 제공하고 있습니다.



자세한 내용은 (<http://go.roche.com/custombioch>)에서 참조하시기 바랍니다.

Mycoplasma Biosafety Services GmbH

Mycoplasma Biosafety는 계약 연구 기관이며 Mycoplasma 기술의 리더로서 GMP를 준수하는 바이오 의약품의 Mycoplasma 검출시험 서비스를 제공합니다. Mycoplasma Biosafety는 전통적인 배양 방법과 새로운 신속한 PCR 기반 assay를 바탕으로 가장 포괄적인 범위의 mycoplasma 검출시험 서비스를 제공합니다. 또한 mycoplasma 검출시험과 밸리데이션을 위한 mycoplasma 배양 배지와 참조 표준 제품을 개발하고 생산합니다.



자세한 내용은 (<http://go.roche.com/mbs>)에서 참조하시기 바랍니다.

Table of contents

Introduction 4

Mycoplasmas in Cell Cultures 5

Mycoplasmas in Biopharmaceutical Manufacturing Processes 6

Mycoplasma Testing Methods Overview 8

Non-compendial Testing Methods 8

Compendial Testing Methods 9

NAT-based Methods 13

Regulatory Overview 17

Step-by-step Validation and Implementation of MycoTOOL qPCR 19

Summary and Outlook 22

Appendix 23

Glossary 24

References 26

Introduction

‘Mycoplasmas’라는 용어는 흔히 박테리아의 강(class)인 Mollicutes(lat. Mollis = soft, cutis= skin) (Figure 1)의 속명입니다. Mollicutes는 세포벽이 없으며 낮은 비율 (20-40 mol%)의 GC (guanine-cytosine)로 구성된 크기가 작은 사이즈의 게놈 (0.5-2.2 megabase pair)으로 이루어져 있습니다. 이러한 유전적 특성으로 mycoplasma는 숙주에 의존하며, 인간과 그 외의 척추 동물, 식물 및 곤충들과 같은 다양한 숙주와 공생관계 또는 감염원으로 살아갑니다. 이 미생물은 호기성 또는 혐기성 조건에서 번식할 수 있습니다. 나선모양을 가진 Spiroplasmas와 터미널 구조로 인해 플라스크처럼 생긴 mycoplasma의 속(genus)에 속하는 몇몇의 mycoplasma를 제외하고 다형성 세포의 형태를 가지고 있습니다.

Mycoplasma는 종에 따라서 액체 배지에서 하나의 세포 (Mycoplasma arthritidis)또는 군집을 이루는 세포 (Acholeplasma laidlawii, Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma fermentans)⁴로 증식할 수 있습니다. Mycoplasma는 세포벽이 없기 때문에 세포벽을 표적하는 항생제인 페니실린에 저항성을 가지게 됩니다. 또한 mycoplasma는 액체 배양 시 단단한 표면인 유리나 플라스틱 표면에 생물 막을 형성하여, 살균제나 환경적인 스트레스 요인에 또 다른 저항성을 가질 수 있습니다.⁵ 1986년 Institut Pasteur에서 배양된 첫 번째 mycoplasma 종은 Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC (조그마한 colony 타입)이며 pleuropneumonia에 감염된 소로부터 분리되었습니다.

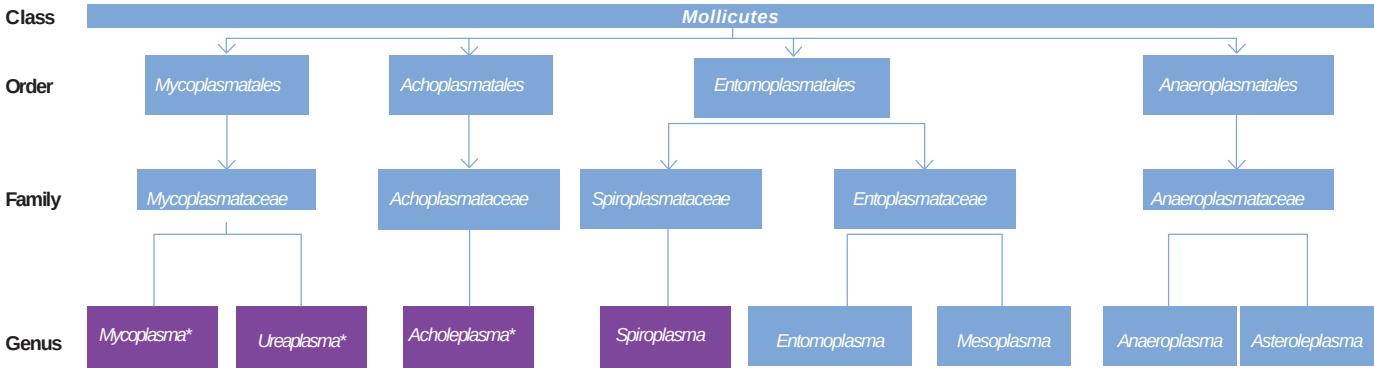


Figure 1: Mollicutes 박테리아의 강(class)의 분류체계. 빨간색 박스는 바이오 의약품 공정 과정에 관련된 종의 genera를 가리킵니다. * Genera는 인간에 널리 퍼져있는 mycoplasma종을 포함합니다. 출처: Authors, 2017.

Mycoplasmas의 작은 게놈으로 인하여 대사경로가 존재하지 않거나 부분적으로 결핍되어 있으며, 이로 인해 주변 환경으로부터 혹은 기생적인 생활 방식으로 필요한 영양분 (아미노산, 핵산 염기 및 지방산)을 섭취합니다.⁷

오랜 시간 동안 mycoplasma는 병원균으로서 상당히 저평가되어왔습니다. 이러한 이유로 적합한 분자적 진단 방법이 발전되지 않았습니니다. 하지만 최근에는 mycoplasma 감염을 확인할 수 있는 배양 기반 및 분자적 방법들의 필요성에 대해 인식하고 이것을 개발해 가고 있습니다.⁸

Mycoplasmas in Cell Cultures

Mycoplasmas가 임상적으로 그 중요도가 증가 하는 것과 더불어 세포 배양과의 관련성에도 큰 주목을 받고 있습니다. 자연에서는 식물이나 동물 조직에 상주하기 때문에 식물이나 동물로부터 얻은 보충제가 포함된 모든 세포 배양 배지에 mycoplasma가 오염되기 쉽습니다. Mycoplasmas는 평균적으로 0.1-0.8 μm 의 작은 크기 (Figure 2)이며 세포벽 결핍으로 인한 다양한 모양의 형태를 지니고 있습니다. 다양한 형태로 인하여 mycoplasmas는 표준 살균 여과장치를 통과하여 배지 또는 원료 유래의 첨가제가 함유된 세포 배양에 들어갈 수 있습니다. 오염의 가장 일반적인 두 가지 원인은 작업자 혹은 교차 오염으로 이미 오염된 세포입니다.⁹ Mycoplasma는 표준 광학 현미경으로 관찰되지 않으며 일반적으로 세포 배양 상태에 거의 영향을 미치지 않기 때문에 종종 발견되지 않습니다. 그럼에도 불구하고 세포 성장과 대사에 영향을 미치고, 결과적으로 숙주 세포에서 발현되는 치료용 단백질에 영향을 미칩니다.

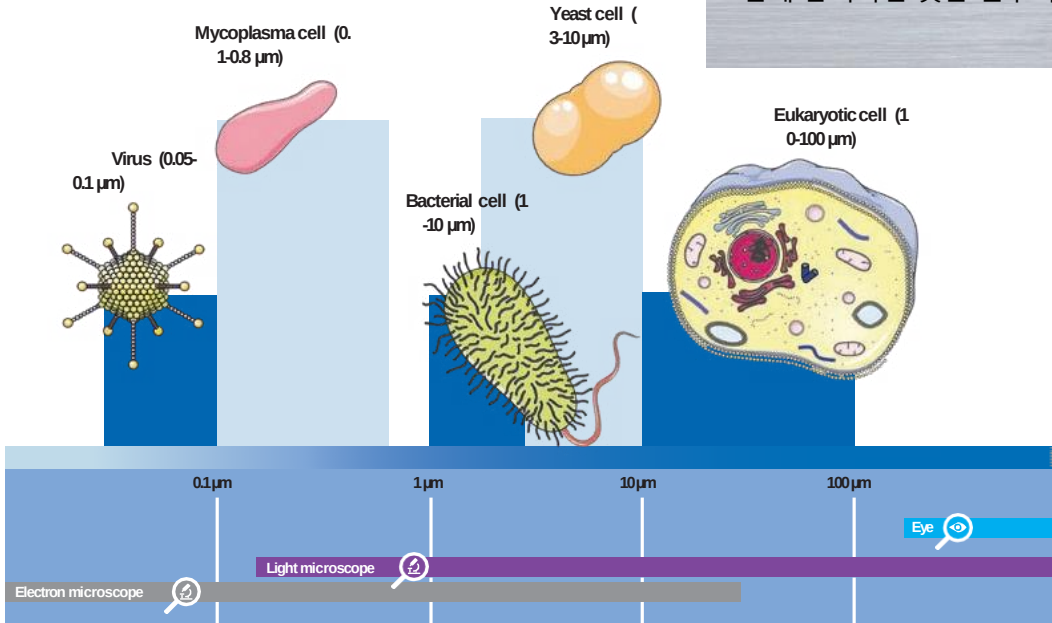


Figure 2: 다른 미생물의 상대적인 크기. 출처: Authors, 2017. 이 Figure에서는 저자의 application 노트에 의한 그래픽 일러스트레이션이며 Creative Commons Public License CC BY 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)의 조건 하에 제공되었습니다. 또한 이 문서와 관련하여 포함되어 있는 어떠한 권리와 상관없이 이러한 라이선스의 조건 하에 사용될 수 있습니다.

Mycoplasma 오염의 부정적인 영향을 감안하면 이것의 검출 시험이 품질 관리에 필요함에도 불구하고 세포 배양 시 모니터하지 않는 경우가 많습니다. 연구 결과에 따르면 전세계적으로 사용되는 기존 세포주의 감염 비율은 5-35%라고 알려져 있습니다.^{10, 11, 12} Mycoplasma가 없는 세포 배양을 유지하기 위해서는 정기적으로 검출시험을 시행하는 방법만이 유일하게 의미가 있는 안전 예방책입니다.

공정 과정 중 이루어지는 잘 구축된 정기적인 mycoplasma 검출시험만이 심각한 문제를 초래할 수 있는 오염의 위험성을 최소화 할 수 있습니다.¹³ 검출시험 절차와 그 이후의 결과에 대한 해석에 관해서는 철저한 훈련과 경험이 바탕이 되어야 하기 때문에 mycoplasma 검출 시험은 기업 내에서 수행하기 어려운 경우도 있습니다. *Mycoplasma Biosafety*와 같이 신뢰할 수 있고 숙련된 파트너에게 mycoplasma 검출 시험을 아웃소싱 하는 것도 여러 장점이 있는 대체적인 방안입니다. 첫 째로 가능한 짧은 시간에 결과를 얻을 수 있습니다. 두 번째로 기업내의 검출시험 시설을 유지할 필요성이 없으며 시험 시설의 구축과 유지에 대한 고민 없이 핵심 비즈니스에 집중할 수 있게 합니다. 마지막으로 중요한 것은 시험에 필수적인 Positive control의 사용으로 mycoplasma가 유입되어 오염 되는 잠재적 위험을 방지할 수 있습니다.

Mycoplasmas in Biopharmaceutical Manufacturing Processes

특히 바이오 의약품 산업에 있어서 mycoplasma 오염으로부터 비롯된 영향은 파괴적입니다. 전체의 생산 배치가 폐기되어야 하며 제조 공장이 생산을 중단해야 합니다.¹⁴ 규제 당국은 바이오 의약품에 관한 가이드라인을 발간한 바 있으며, 가이드라인을 통하여 바이오 의약품의 제품 안정성, 순도 및 효능을 보장하기 위해서는 mycoplasma 오염이 없어야 한다고 명시하고 있습니다. 따라서 바이오 의약품의 생산과정을 순조롭게 진행하기 위해서는 mycoplasma 조기발견이 필수적입니다. Figure 3에서 공통적으로 검출시험을 시행해야 하는 부분들을 확인할 수 있을 것 입니다. 몇몇의 체크 포인트에 대하여 mycoplasma 검출 시험에 관한 다수의 방법들이 개발되어 있으며 다음 장에서 논의할 것입니다.

Cell Therapy

진보된 치료 의약품(Advanced therapy medicinal products, ATMP)으로 유전자(유전자 치료), 체세포(세포 치료) 또는 조직(조직 공학)을 기반으로 한 치료의 새로운 종류입니다. 이 진보된 치료법은 다양한 질병에 대한 참신한 치료법의 도래를 가능하게 하며, 환자 치료에 대한 큰 잠재력을 가지고 있습니다. 세포 치료는 환자로부터의 세포를 분리 한 뒤 인체 외부에서의 세포를 배양하고 그 이후 환자에게 다시 세포를 투입하는 과정을 거칩니다.

고분자 바이오 의약품과 비교하여 세포치료 제품은 제조와 출시에 추가적인 어려움이 있습니다. 첫 째로 대부분의 세포 치료 제품은 살균될 수 없습니다. 두 번째로 때때로 짧은 유효기한으로 인하여 세포 치료 제품의 보관에 어려움이 있으며 환자에게 즉시 주입해야 합니다. 세 번째로 배치 크기가 일반적으로 매우 작아 일회의 복용량으로 구성되어 있습니다. 이러한 경우에는 더 적은 양의 샘플로 더 빠르게 제조 배치를 출시할 수 있게 하는 신속한 mycoplasma 검출시험이 기존의 mycoplasma검출시험보다 유리합니다.

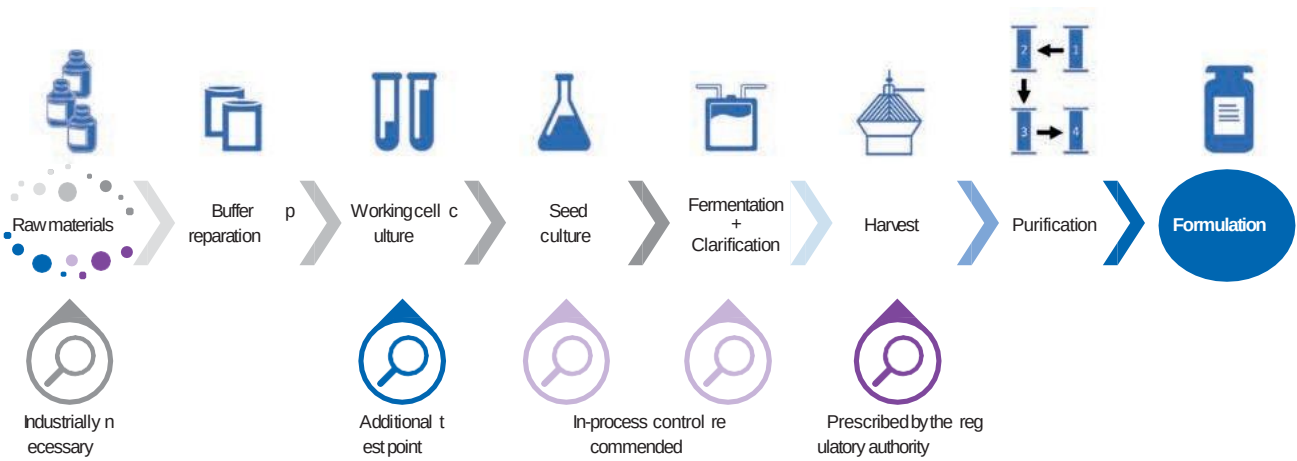


Figure 3. Mycoplasma 검출 시험을 수행해야 하는 바이오 의약품 생산과정의 부분들. 세포주 또는 작업자에 의해 mycoplasma 오염이 진행될 수 있기 때문에 원재료의 오염여부 확인 시험(회색 루프)을 진행해야 하며, buffer와 media와 같은 용액을 작업 배지에 사용할 때 오염여부를 다시 확인해야 합니다(파란색 루프). Seed 배양과 실제 배양을 진행하는 동안 in-process control을 수행할 것을 권장합니다(연보라색 루프). 마지막으로 의무적 검출시험 포인트는 배양의 최종단계인 harvest입니다(보라색 루프). Harvest의 상태가 mycoplasma 오염이 없는 것으로 판명이 되면, 정제 과정은 살아있는 유기체 없이 진행되므로 더 이상의 검출 시험이 필요하지 않습니다. 출처: Roche CustomBiotech, 2017.

Mycoplasma 종은 Table 1. 에 나열된 바와 같이 세포 배양 과정 및 바이오 의약품 공정 과정에서 빈번하게 오염원으로 발견됩니다. 제조과정에서의 오염은 제품 품질을 저하할 뿐만 아니라 발현 수준을 낮추며 결과적으로

생산 수율을 감소시킵니다. 또한 제품의 품질 저하나 mycoplasma의 오염은 환자에게 심각한 부작용을 유발할 수 있습니다.^{15, 16}

Mycoplasma species	Primary isolation source (relevant for products where raw materials of the following origins are used)	Frequent cell culture contaminant based on published reports	Potential contamination source
<i>Acholeplasma laidlawii</i>	Bovine, porcine, avian, plant	Yes	Other cell line, bovine sera, nutrient broth powders
<i>Mycoplasma arginini</i>	Bovine, ovine, caprine, porcine	Yes	Other cell line, bovine sera
<i>Mycoplasma bovis</i>	Bovine	Yes	Other cell line, bovine sera
<i>Mycoplasma fermentans</i>	Human	Yes	Other cell line, personnel
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Avian	No	Other cell line, embryonated eggs
<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	Porcine	Yes	Other cell line, porcine trypsin
<i>Mycoplasma orale</i>	Human	Yes	Other cell line, personnel
<i>Mycoplasma salivarium</i>	Human	Yes	Other cell line, personnel
<i>Mycoplasma synoviae</i>	Avian	No	Other cell line, embryonated eggs
<i>Spiroplasma citri</i>	Plant	No	Other cell line

Table 1. 바이오 의약품 공정 과정과 세포 배양에서 빈번하게 발견되는 Mycoplasma 종들.

Mycoplasma Testing Methods Overview

세포 배양과 바이오 의약품의 품질 관리에 있어서 특히 낮은 수준의 mycoplasma 오염은 전문 지식과 경험을 통해 서만 식별될 수 있으므로 mycoplasma의 검출에 어려움이 있습니다. 최근 수십 년간 두 가지의 고전적인 방법이 민감하고 신뢰할 수 있는 것으로 입증되었기 때문에 규제적인 mycoplasma 검출 시험에 사용되어 왔습니다. [(i) Culture 방법 (agar 및 broth 방식) 및 (ii) Indicator Cell Culture 방법.] 비 공정서 상의 방법인 효소 기반 및 면역학 기반의 assays는 쉽고 빠르게 적용할 수 있지만 대부분이 배양 방식의 민감도 수준에는 미치지 못합니다. 따라서 약전에서는 규제적 시험을 위해서는 이 방식으로 대체하는 것을 허용하고 있지 않습니다. 장시간이 소요되는 고전적인 배양 방식은 바이오 의약품의 출시를 지연시키고 종종 높은 비용을

Non-compendial Testing Methods

Mycoplasma 검출을 위한 비 공정서 상의 검출 시험은 규제서에서 요구하는 민감도에 미치지 못하는 경우가 많습니다. 게다가 낮은 수준의 오염인 경우 이에 대한 해석이 쉽지 않기도 합니다. 그러므로 이러한 검출 방법은 위 음성 결과를 초래할 수 있습니다.

Direct DNA Staining

DNA(Deoxyribonucleic acid) 특이적인 형광 염료를 이용하여 직접적으로 배지의 DNA를 염색하는 것은 민감하지만 mycoplasma 오염을 검출하는 목적으로는 권장되지 않습니다. 심하게 오염된 배지는 확실하게 검출될 수 있지만 배양되는 세포의 DNA도 mycoplasma와 비슷한 형광을 나타낼 수 있기 때문에 낮은 수준의 오염에 대한 해석은 종종 어려울 수 있습니다.¹⁷

Enzyme-based Method

효소 기반 assays는 mycoplasma 효소의 활성을 이용하는 선택적 생화학 테스트입니다. 이러한 테스트가 일상적인 mycoplasma 검출 시험으로 적용되기 위해서는 진핵 세포에서는 전혀 발견되지 않으면서 모든 mycoplasma 종에서는 동일하게 효소의 활성도가 측정이 될 수 있어야 한다는 것이 그 전제 조건입니다.

부담 시키기 때문에 민감하고 신뢰할 수 있으면서 빠르게 mycoplasma를 검출할 수 있는 검출 시험에 대한 필요성은 지난 수년간 제기되어 왔습니다. EP 가이드라인에 따르면 NAT 방식의 민감도가 고전적인 방식과 동일하며, 완전성 및 특이성이 높다는 것을 증명할 수 있다면 NAT로 고전적인 세포 방식을 대체하는 것을 허용합니다.

이 장에서는 mycoplasma 검출을 위한 비 공정서와 공정서 상의 방식에 대해 간략히 요약합니다. NAT 방식은 더 자세히 설명을 해 두었는데, 특히 MycoTOOL qPCR에 중점을 두고 설명을 하였습니다. 이 방식은 Indicator cell culture 방식과 Culture 방식을 대체하기 위한 EP mycoplasma NAT 밸리데이션 가이드라인이 요구하는 밸리데이션 기준을 모두 통과했음을 밝힙니다.

효소 assay의 예로서는 luciferase를 기반으로 한 mycoplasma 검출 assay가 있습니다.^{18,19} 이러한 assay는 빠르고(<20min), 상대적으로 다루기 쉽고(두 개의 luminescence만 판독하면 됨), 결과의 해석이 용이하지만, 아직까지 어떠한 검출 방법도 공정서 상의 검출에서 요구하는 검출 한계(<10 CFU/ml (colony forming unit))에 도달한 것은 없습니다. 대부분의 mycoplasma 종은 10⁴ 부터 10⁵ CFU/ml의 역가로 검출됩니다.²⁰

Mycoplasma PCR-ELISA

PCR과 후속의 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)가 결합된 어플리케이션이 mycoplasma PCR-ELISA이며, 이것은 세포 배양에서의 PCR로 증폭된 mycoplasma DNA를 검출하는 photometric enzyme immunoassay입니다.²¹ PCR반응을 진행하는 동안, digoxigenin이 표지된 뉴클레오타이드는 amplicon에 삽입되어, 후속으로 진행되는 ELISA assay에서 검출되게 됩니다. Mycoplasma PCR-ELISA 테스트는 특정 mycoplasma 종(e.g., *M. fermentans* 및 *A. laidlawii*)의 경우 검출 한계가 1-3 Mycoplasma “particle”입니다.²² 그러나 다른 종에서는 검출 한계(Limit of Detection, LOD)가 sample의 ml 당 1000 “particle”이기 때문에 이 테스트 방식은 공정서 상의 검출 시험 처럼 EP 규제 가이드라인의 요건은 충족시키지 못합니다.

Compendial Testing Methods

이러한 방법은 액체와 Agar 배지를 사용하는 고전적인 미생물의 배양 절차를 기본으로 하며, 다른 한편으로는 빠른 분자 기술을 이용하고 있습니다. 이것에 대한 방법들은 이번 장과 Table 2에 요약되어 있습니다.

Method	Advantages	Disadvantages
Culture Method	- 민감 0.1CFU/ml 검출	28일까지의 배양 기간 - 여러 종의 mycoplasma 배양을 위해 하나 이상의 배양 배지가 필요 - 표준 mycoplasma 배양 배지 사용 시 <i>M. hyorhinis</i> cultivar alpha strains은 검출 불가.
Indicator Cell Culture Method	저렴	- 주관적인 판단 개입 - Mycoplasma에 특이적이지 않음
NAT-based Method	- 민감 <10CFU/ml 검출	- 샘플 prep 및 DNA 추출의 질에 따라 효율성이 달라짐 - DNA 추출 kit와 비싼 PCR 기기가 필요 - Cell culture와 indicator cell 방법을 대체하기 위해 밸리데이션을 해야 함

Table2. Mycoplasma 검출 시험 방법의 장점 및 단점

Culture Method

고전적인 배양 방법들은 오늘날의 분자적 기술이 개발되기까지 잘 사용되어 왔으며 여전히 전 세계적(EP, USP, 및 JP 규제 가이드라인)으로 규제 및 공정서 상의 Protocol에서 찾을 수 있습니다. 배양 방법은 mycoplasma 성장을 촉진하는 배양 배지를 이용하여 mycoplasma의 표적 배양을 하는 것을 기본으로 하고 있습니다. 테스트 할 샘플은 액체 mycoplasma 배양 배지와 Agar에 접종되며, mycoplasma 성장은 미 호기성 배양 조건인 36±1 °C, 5.5±0.5% CO₂, 3±1% O₂ 및 90±5% 상대 습도에서 시행합니다. 액체 배양으로부터의 계대 배양은 Agar 플레이트에 접종 후 21일까지 진행됩니다.

Agar 배지에서 mycoplasma는 현미경으로만 관찰되는 Colony(직경<100-400µm)를 생성합니다. Mycoplasma Colony의 형태는 전형적인 달걀프라이 모양부터 불규칙적인 모양까지 다양합니다(Figure 4). Mycoplasma Colony는 매우 작기 때문에 현미경을 통한 Colony 카운팅은 숙련된 경험을 필요로 합니다. 배양 방법에 대한 도식적인 그림은 Figure 5에 있습니다.

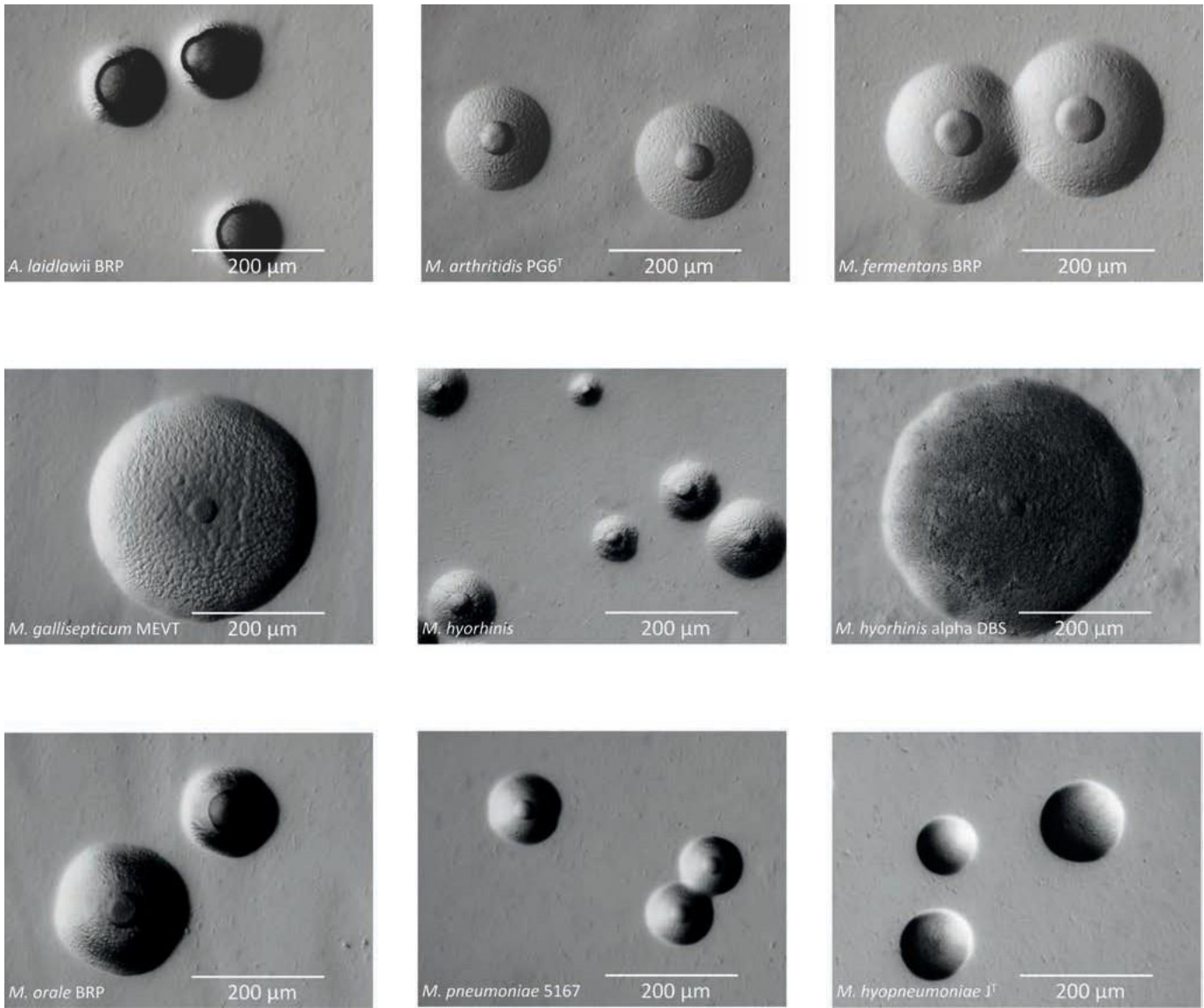


Figure 4: Agar 배지 상의 Mycoplasma reference 균주의 다양한 colony 모양
출처: Mycoplasma Biosafety Services GmbH, Dr. Carl-Ulrich Zimmerman. 2016.

상대적으로 사용되는 샘플의 양(10ml)이 많다는 것과 장기간 배양 (총 28일)을 한다는 것은 Culture 방법의 민감도를 매우 높여 이론적으로나 실험적으로 모두 1 CFU/10ml의 검출 한계가 입증 된 바 있으며, 이는, 즉, 검출 한계가 0.1CFU/ml임을 의미 합니다. 이 방법은 EP2.6.7 요건인 10 CFU/ml을 충족시키므로 여전히 전세계적으로 규제 문서의 참조 방법으로 사용되고 있습니다. 그러나 Culture 방법에는 몇 가지 단점이 있습니다. 주된 단점은 28일의 장기간의 배양 기간에 있습니다. 이러한 장시간의 배양은 많은 기업에게 문제가 되는데,

이는 제품 출시의 지연을 일으켜 결국 제품의 보관 비용 증가를 비롯하여 up stream과 down stream의 process control 및 원재료와 세포주 시험에 드는 전반적인 물류와 인건비의 증가를 야기시킵니다. 배양 방법의 또 다른 한계는 여러 가지 배양 배지가 필요하다는 것입니다. 모든 mycoplasma 종들이 동일한 culture 배지에서 성장하지 않기 때문에 샘플의 출처에 따라 오염 가능한 mycoplasma 종에 대한 검출 범위를 넓히기 위해서는 한가지 이상의 mycoplasma 배양 배지가 사용되어야 합니다.

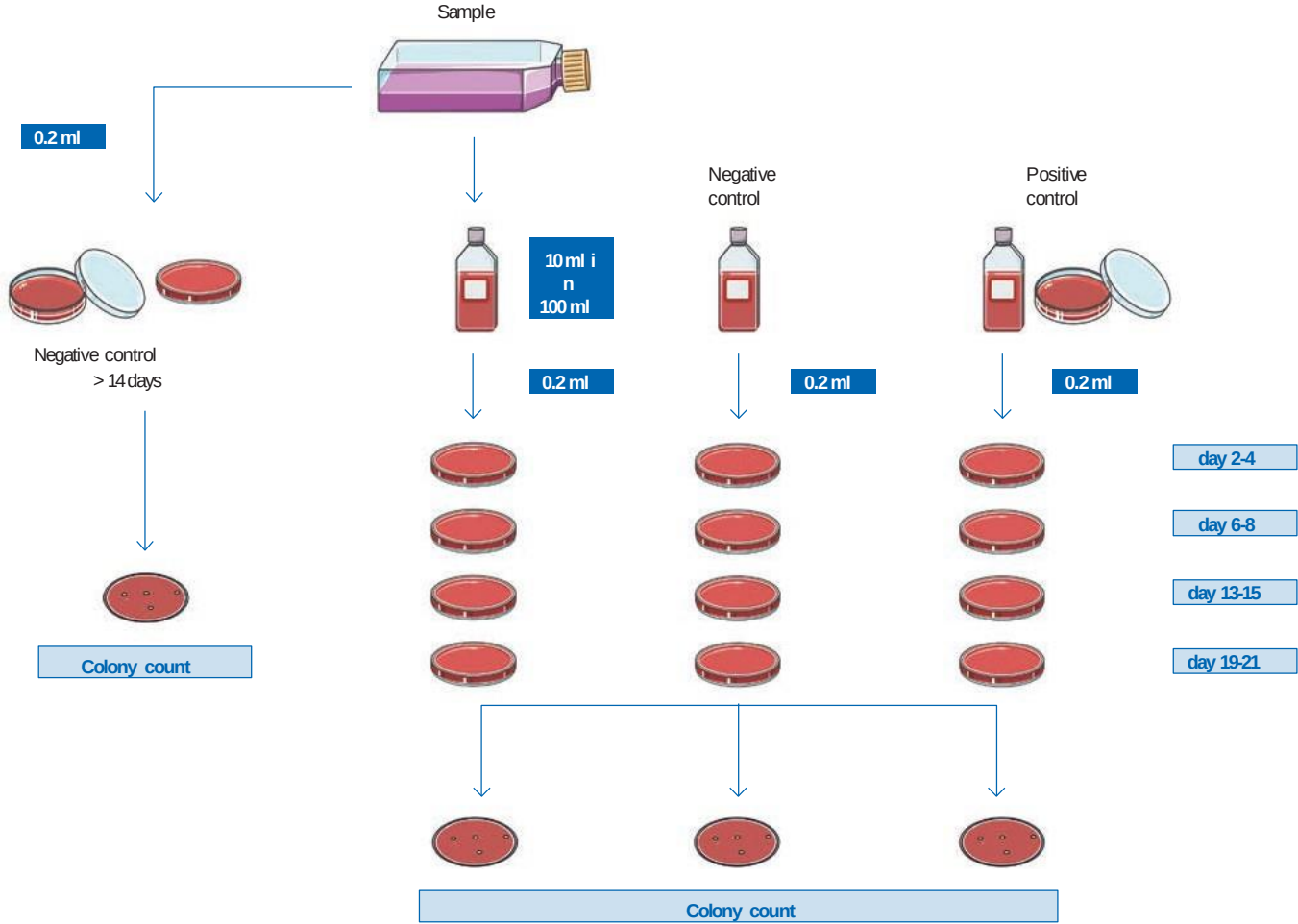


Figure 5: Mycoplasma Biosafety에 의해 수행된 EP2.6.7에 따른 Culture 방법의 도식적인 그림.
Mycoplasma 오염을 테스트하기 위해 샘플로부터 200µl의 용량을 취하여 고체의 mycoplasma 배양 배지에 도말하며 10ml의 샘플은 100ml의 액체 배양 배지에 접종합니다. 접종되지 않은 배지는 negative control로 사용하며, ≤100 CFU 으로 접종된 배지는 Positive control로 사용합니다. 액체 배지는 20-21일 간 배양됩니다. 접종 후 각 2-4일, 6-8일, 13-15일 및 19-21일에는 샘플을 접종한 액체 배지에서 200µl를 취하여 다시 도말하며, negative 및 positive control의 샘플도 동시에 Agar 배지에 도말 합니다. 마지막, 20-21일 사이에 계대 배양을 위해 도말 된 Agar 배지는 7일간만 배양을 하되 나머지 Agar 배지는 최소 14일 이상 배양 해야 합니다. 출처:Authors, 2017. 이 figure는 저자의 application 노트에 대한 그래픽 그림이며 Creative Commons Public License CC BY 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)dml 조건 하에 제공되었습니다. 또한 이 문서와 관련하여 포함되어 있는 어떠한 권리와 상관없이 이러한 라이선스의 조건 하에 사용될 수 있습니다.

이러한 이유로 EP 2.6.7에서는 최소한 두 개의 표준 mycoplasma 배양 배지의 사용을 권장합니다: non-avian mycoplasmas 검출을 위한 FRIIS 배지와 avian mycoplasma 종인 *M.synoviae* 검출을 위한 FREY 배지.

Culture 방법의 가장 큰 단점은 *M.hyorhinis* cultivar alpha 균주(reference 균주인 *M.hyorhinis* DBS 1050)와 같이 굉장히 까다로운 mycoplasma 균주의 경우 표준 배양 배지에서는 펩톤과 효모 생산물에 의한 억제로 성장이 불가

하다는 것입니다.²³ 세포배양에 적응된 균주의 성장은 그들의 서식지인 세포 배양에 의존적입니다. 이러한 cultivar alpha 균주를 검출하기 위해서는 Indicator Cell Culture 방법을 이용하여 추가적인 검출 시험을 수행해야 합니다.

Indicator Cell Culture Method

Indicator cell culture 방식은 일반적으로 Vero 또는 3T3 세포주에서 시행을 하지만 EP 규제 가이드라인은 생산에 사용된 세포주에서도 Mycoplasma의 검출 효율성이 동일한 경우 사용을 허가 하고 있습니다. Indicator cell culture 를 수행하기 위해서는 샘플을 채취하여 35-38°C에서 Confluence에 다다를때 까지 배양합니다. Postive control 의 경우, *M. orale* 과 *M. hyorhinis* cultivar alpha 참조 균주 를 각각 테스트 샘플과 동시에 혹은 샘플 없이 참조 균주 만 접종합니다. 염색을 시행하기 전, 계대 배양은 적합한 fixing solution으로 처리 후 DNA에 결합하는 형광 염료로 염색합니다.

Mycoplasma가 오염된 경우 세포 표면에 구형의 그리 고 세포 주변으로 강한 형광이 나타납니다. 세포질에 존재하는 미토콘드리아도 염색되지만, mycoplasma와 는 쉽게 구별됩니다. Positive control 에서 mycoplasmas의 전형적인 형광이 보이지 않거나 Negative control에서 mycoplasma의 전형적인 형광이 나타난다면 검출 시험은 유효하지 않습니다. Indicator Culture 방식에 대한 도식적인 그림은 Figure 6에 나타 나 있습니다.

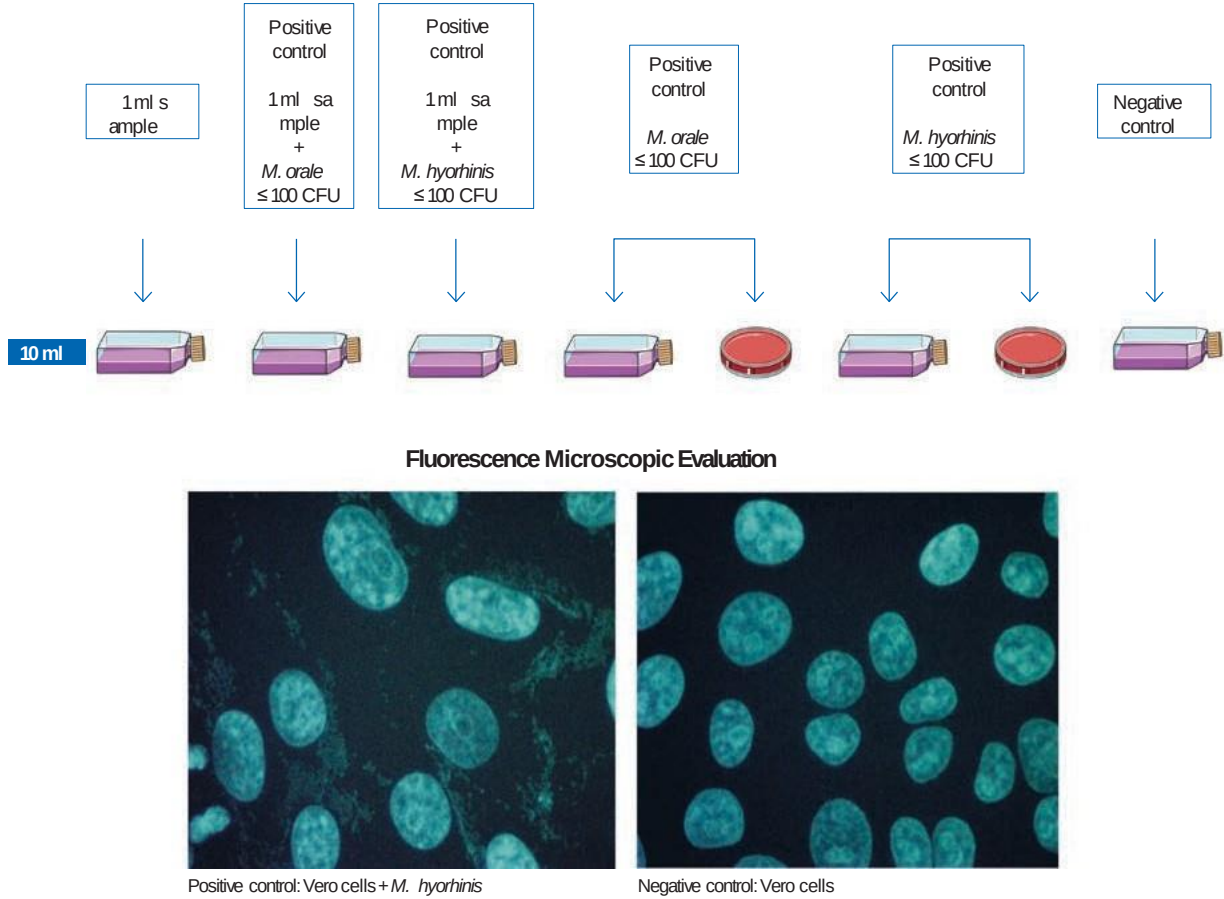


Figure 6: Mycoplasma Biosafety 에 의해 수행된 Indicator Cell Culture 방식. 새로 준비된 Vero cell culture에 1ml의 샘플을 접종합니다. 4개의 Positive control을 준비합니다. 두 개의 Positive Control은 각각 100 CFU 이하의 *M. hyorhinis*와 *M. orale* 를 각 각 샘플 1ml과 함께 Vero cell에 접종합니다. 다른 두 개의 Positive Control은 샘플 없이 각각 100 CFU 이하의 *M. hyorhinis*와 *M. orale* 를 Vero cell에 접종합니다. 두 개의 Positive Control 균주는 생존력을 확인하기 위해 Agar 배지에도 도말합니다. Negative Control은 아무것도 접종되지 않은 Vero cell을 이용합니다. 모든 세포 배양은 세포 밀도가 100%에 도달하기까지 CO₂ 배양기에서 배양합니다. 이어서 세포를 Buffer로 wash 후 Trypsin을 처리합니다. 떼낸 세포들은 chamber slide flask로 옮긴 후 세 포 밀도가 대략 50%에 도달하기 까지 CO₂배양기에서 배양합니다. 세포는 새로운 fixing solution으로 두 번 고정하며, 공기로 건 조시킨 후 Hoechst Stain 으로 염색합니다. 슬라이드는 형광 현미경을 통하여 관찰합니다. 출처: Authors 2017. 이 figure는 저자 의application 노트의 그래픽 그림이며 Creative Commons Public License CC BY 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)dml 조건 하에 제공되었습니다. 또한 이 문서와 관련하여 포함되어 있는 어떠한 권 리와 상관없이 이러한 라이선스의 조건 하에 사용될 수 있습니다.

Culture 방식과 Indicator Cell Culture 방식 모두 결과를 얻기까지 장기간(Culture 방식의 경우 최대 28일이며 Indicator Cell Culture방식의 경우 7일)이 소요되며, Positive Control으로 살아있는 mycoplasma 세포를 사용해야 하 기 때문에 이로 인하여 실험실의 mycoplasma 오염을 초래할 수 있다는 내재적인 위험성을 가지고 있습니다.

NAT-based Methods

NAT 기반 방식은 모든 테스트에서 핵산 검출을 기반 으로 하며 주로 PCR을 수행하는 방식을 사용 합니다.

PCR

중합효소연쇄반응(PCR)은 식품 및 환경 분석, 범죄과 학수사 및 의학적 진단과 같은 다양한 분야의 분자 생 물학적 방식으로 사용됩니다. 근본적인 원리는 특정한 DNA를 검출할 수 있도록 증폭하는 것입니다. 자동화 된 유전자 증폭기에서 반복되는 증폭 주기를 설정한 후 DNA polymerase 효소에 의해 증폭이 이루어집니 다. 한번의 주기는 세 개의 단계로 이루어집니다:

1. 이중 가닥 DNA (Double-stranded DNA, dsDNA)는 열에 의해 외가닥 DNA(single-stranded DNA, ssDNA)로 분해
2. PCR Primer가 특정 ssDNA 서열에 결합 (예, 특정 한 표적 유전자)
3. DNA polymerase가 ssDNA의 서열을 따라 결합된 primer에서 서열을 연장.

PCR 온도에 대한 Protocol은 더 민감하고, 특이적이며 신속한 PCR assay로 발전하기 위하여 지속적으로 최 적화 되어 왔습니다. Touchdown PCR(TD-PCR)은 PCR assay의 표적 유전자에 대한 특이성을 높이기 위 해 매우 흔하게 사용됩니다. 처음 몇 번의 PCR cycle 동안 높은 결합 온도에서 Primer는 높은 특이성으로 표 적 DNA 염기서열에 결합합니다. 이것은 특정 DNA서 열의 증폭을 보장하게 됩니다. 결합 온도는 점차적으로 감소하며 가장 높은 PCR 효율을 달성합니다. TD-PCR protocol은 PCR에 의한 비 특이적인 DNA 증폭을 감소 시킵니다.²⁴ MycoTOOL qPCR은 TD-PCR을 이용하여 높은 특이성으로 mycoplasma를 검출합니다.



기존 PCR부터 qPCR까지의 역사와 발전에 대한 요약과 자세한 정보는 아래의 홈페이지를 참조하시기 바랍니다.

(<http://go.roche.com/storypcr>)



PCR 절차에 대한 자세한 사항은 아래의 홈페이지를 참조하시기 바랍니다.

(<http://go.roche.com/dnacopy>)

보통 30-50 cycle이면 DNA 양이 충분히 증폭 되어 gel electrophoresis 후 형광 염료로 염색하여 관찰 할 수 있 게 됩니다.

일반 PCR과 대조적으로 Real-Time PCR(qPCR)은 실시간으로 DNA의 증폭을 볼 수 있습니다. 따라서 PCR후 DNA 검출을 위한 Gel electrophoresis는 필요하지 않습니다. 이것은 실험실에서의 오염에 대한 위험성을 현저 하게 감소시키며 최종 결과의 해석을 용이하게 합니다. qPCR은 PCR에 추가되는 짧은 DNA 염기서열 (18-30 염 기 쌍)에 형광을 붙인 Probe를 사용합니다. Probe는 각 증폭 cycle에서 생성된 DNA의 새로운 가닥에 첨가됩니 다. 시중에는 여러 가지 Probe 디자인이 있지만 가장 흔 하게 사용되는 Probe는MycoTOOL qPCR에서 사용되는 Hydrolysis probe입니다. 이 probe는 각 PCR cycle에서 의 DNA의 총량을 형광 강도로 나타냅니다. 형광 시그널 은 표적 염기서열 증폭과 비례하여 증가합니다. 형광 강 도는 시간에 따라 그래프로 나타나며 전형적인 S자 qPCR 곡선을 형성합니다(Figure 7 참조)

일반 PCR과 qPCR 모두 민감한 방법이므로 DNA가 오염되기 쉽습니다. 가장 흔한 오염원은 DNA template 그 자체와 PCR 반응 후 증폭된 DNA입니다. DNA 분자는 Air control system이나 작업자에 의해 실험실에 퍼질 수 있습니다. 이러한 오염원을 제거하기 위한 가장 효과적인 전략은 샘플 준비부터 DNA 검출까지 단일 방향으로 작업의 흐름을 만들며 분리된 작업 환경 또는 분리된 방에서 시행하는 것입니다.²⁵

MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit (MycoTOOL qPCR)

MycoTOOL Real-Time PCR Kit는 세포 배양에서의 mycoplasma 검출에 최적화된 qPCR assay입니다. Mycoplasma 검출의 민감도 (즉, $\leq 10\text{CFU}$ 검출한계), 특이성, 완전성 및 비교 동등성에 대한 NAT 기반 assay의 EP2.6.7 요건을 충족합니다. Mycoplasma enrichment 또는 사전 접종 단계를 필요로 하지 않습니다. 이 kit는 mycoplasma 16S 리보솜 DNA 유전자에 매우 특이적인 Primer와 Probe를 사용합니다. 이것은 150 종 이상의 배양이 가능한 혹은 배양이 불가능한 mycoplasma 종을 모두 검출할 수 있습니다. 자주 또는 잠재적으로 발생하는 세포 배양 오염원으로는 *A.laidlawii*, *M.arginini*, *M.fermentans*, *M.gallisepticum*, *M.hyorhinis*, *M. orale*, *M.salivarium*, *M.synoviae*, *S.citri* (Table 1) 및 병원성인 human mycoplasma 종인 *M.pneumoniae* 와 *M.hominis*가 있습니다.

자동화된 DNA 추출은 MagNa Pure 24 또는 MagNa Pure 96 기기장비로 수행할 수 있으며, 후속으로 LightCycler 480 II real-time PCR 장비로 qPCR을 수행합니다. Manual로 DNA를 추출하는 방법은 Roche QC Preparation Kit로 수행할 수 있으며, 세포 수에 따라 다른 Protocol을 이용하여 정제할 수 있습니다. (5×10^6 cells/ml 이하 혹은 5×10^6 cells/ml ~ 1×10^8 cells/ml의 범위에서 정제 가능) Carrier DNA는 세포가 없는 샘플 분석에 사용될 수 있으며 핵산 추출과 정제 과정 전에 첨가될 수 있습니다. 샘플 준비에서 결과를 보는데까지 전체 소요 시간은 4-6 시간이며 이는 자동화 유무, 샘플 수에 따라 달라질 수 있습니다. 전체적인 작업 흐름은 Figure 8에 묘사되어 있습니다.

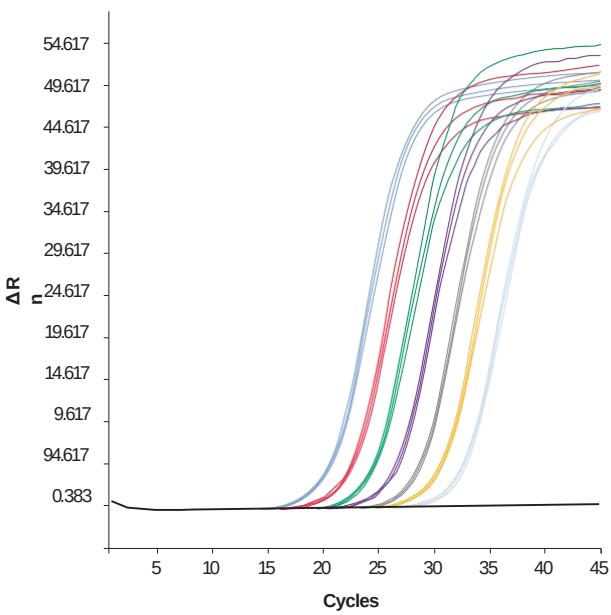


Figure 7: MycoTOOL qPCR 분석에 의한 mycoplasma 검출 시험의 예. qPCR의 처음 15개의 cycle에서의 기준선은 형광 강도의 변화가 없는 초기 신호를 나타냅니다. 이 신호는 반응의 백그라운드 형광으로도 정의할 수 있습니다. 임계주기(Cq)는 샘플의 형광 신호가 백그라운드 신호를 초과할 때의 cycle수입니다. Cq 값이 낮을수록 더 많은 DNA의 양이 샘플에 포함되었다는 것을 의미합니다. 출처: Roche CustomBiotech, 2017.

MagNa Pure 24와 96 기기장비는 Magnetic glass particle 기술을 이용하여 광범위한 물질 (예. 전혈, 혈장, 세포)로부터 핵산을 정제합니다. 더 자세한 사항은 MagNa Pure 96과 24 시스템의 QR코드에서 참조하시기 바랍니다.



(<http://go.rocke.com/mag96>)



(<http://go.rocke.com/mag24>)

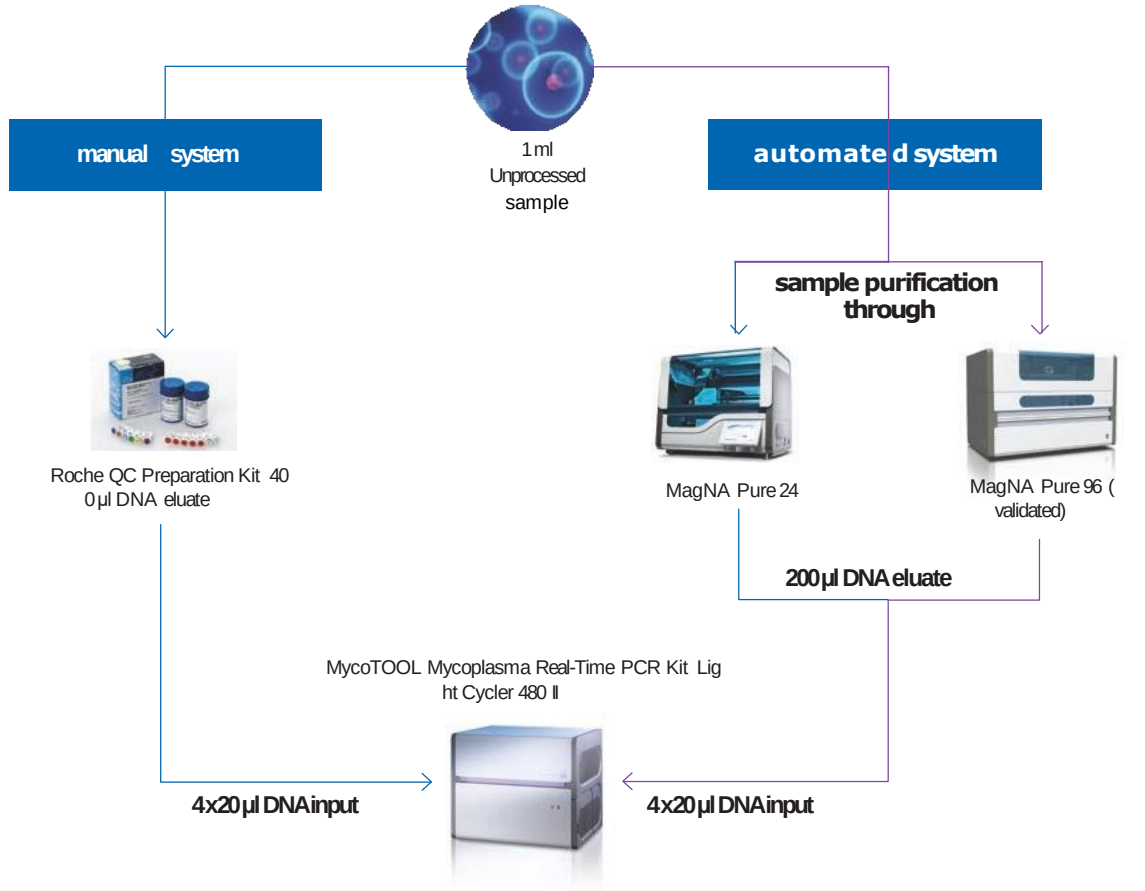


Figure 8: MycoTOOL qPCR 작업 흐름. Manual 또는 Automation 작업을 이용하여 세포 수가 5×10^6 cells/ml인 샘플(1ml)을 준비합니다. Manual sample prep은 Roche QC Preparation Kit로 핵산을 분리합니다. 자동화 핵산 분리 시스템은 MagNA Pure system 중의 하나로 샘플 DNA를 정제합니다. 이어서 LightCycler 480 II Real-Time PCR system을 사용하여 mycoplasma 특이적 qPCR 반응을 진행합니다. MagNA Pure 96과 LightCycler 480 II system을 이용한 자동화 작업은 보라색 선의 절차이며, EP 2.6.7에 따라 Roche Pharma Biotech에 의해 완전히 검증되었습니다. 포괄적인 검증 보고서에 대한 요청은 CDA (기밀정보 공개 협정) 하에 제공해 드릴 수 있습니다. 연구 설계 및 결과에 대한 요약은 <http://go.rocke.com/MycoTOOLqPCRdptj> 에서 확인할 수 있습니다. 출처: Roche CustomBiotech, 2017.

MycoTOOL qPCR은 결과의 유효성을 보장하기 위해 세 개의 control을 가지고 있습니다. qPCR에 사용된 모든 시약을 확인하기 위하여 plasmid 기반의 positive control은 각 실험에 첨가됩니다. 위 음성 결과는 H₂O 만 들어간 Negative control에 의해 통제됩니다. 세 번째 control은 plasmid기반의 Recovery control (RC; 외인성 internal control이라고도 함)으로써 DNA정제 이전에 각 샘플에 첨가됩니다.

이것은 두 번째 세트의 primer와 probe를 이용하여 별도의 vial에서 함께 증폭됩니다. RC는 DNA 정제부터 PCR까지의 전체 작업의 완전성을 확인합니다. RC가 샘플에 외인성 control으로 첨가되기 때문에 MycoTOOL qPCR은 특정 세포주에 국한되지 않고 바이오 의약품 제조업계에서 흔하게 사용되는 모든 세포주에 걸쳐 사용될 수 있습니다.

모든 증폭 반응은 반복 세트를 만들어 수행합니다. (각각 두 개 또는 네 개의 Negative control과 positive control/RC-sample). Figure 9은 96 well qPCR plate의 전형적인 pipetting 도식을 보여줍니다.

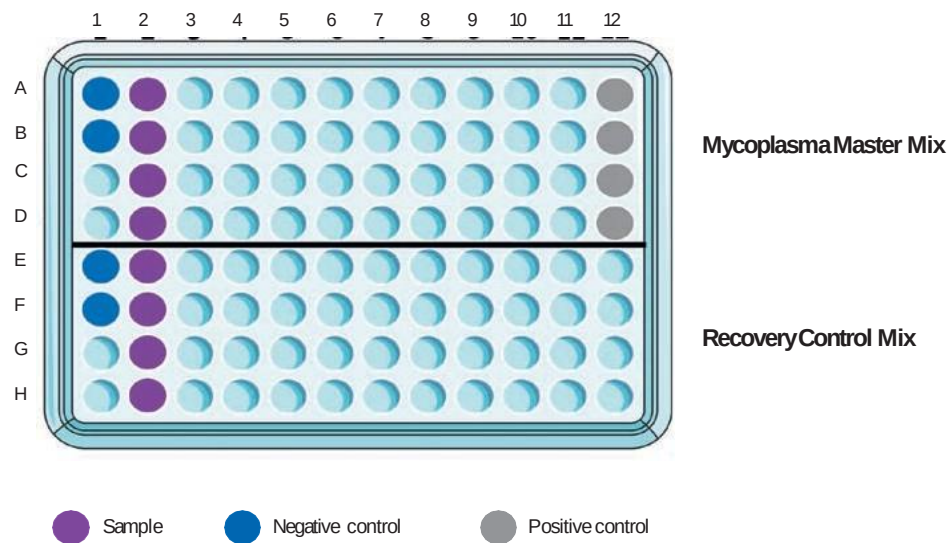


Figure 9: MycoTOOL qPCR pipetting 도식. MagNA Pure 24 또는 96 기기로 DNA를 준비하기 전에 정해진 농도의 RC plasmid를 샘플에 첨가합니다. 1ml 샘플로부터 얻은 DNA는 200µl elution buffer에 녹입니다. 각 20µl씩 4개를 반복하여 테스트합니다. 즉, 준비된 전체 샘플의 40%에 해당하는 용량을 사용한다는 의미 입니다.
출처: Authors, 2017. 이 figure는 저자의 application 노트의 그래픽 그림이며 Creative Commons Public License CC BY 3.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)dm 조건 하에 제공되었습니다. 또한 이 문서와 관련하여 포함되어 있는 어떠한 권리와 상관없이 이러한 라이선스의 조건 하에 사용될 수 있습니다.

결과를 받아 들이기 위한 수용 기준: 모든 negative control은 음성 결과를 도출해야 하며, positive control 및 샘플의 RC 반응은 양성 결과를 도출해야 합니다.

Regulatory Overview

Mycoplasma 오염이 세포 배양에 분명하게 영향을 미치기 때문에 mycoplasma 검출 시험에 대한 당국의 규제가 더 강화되고 있습니다. 오늘날 바이오 의약품 제조업계에서의 mycoplasma 검출시험은 전세계적으로 거의 모든 국가에서 법에 의해 통제되고 있습니다. 규제 당국은 mycoplasma 검출 시험에 관하여 당국의 약전과 함께 법적으로 구속력이 있는 문서를 발간하였습니다. 이 문서는 테스트의 방식과 테스트를 거쳐야 하는 제품들을 지정하고 있습니다. 그러나 mycoplasma 검출시험을 위한 권장된 방법은 국가 별로 차이가 있을 수 있습니다. 일반적으로 고전적인 배양 기반과 그 대체 법인 NAT 기반 mycoplasma 검출 시험은 구별 되어 있습니다. Culture 방식과 Indicator Cell Culture (chapter 2.2 참조)와 같은 고전적인 공정서 상의 방식은 오랫동안 최적화된 표준으로 여겨지며 모든 약전에서 널리 권장되어왔습니다. 개별적인 방법의 단계는 국가별 약전마다 조금씩 차이가 있을 수 있지만, Culture 기반 시험에 대한 protocol은 전세계에 걸쳐 상당히 통일되어 있습니다. 국가별 규제 당국과 약전에 포함된 mycoplasma 검출 시험에 관련한 규제적 가이드라인에 관한 요약은 Table 3을 참조하시기 바랍니다.

The regulatory approval system

보건 당국은 제약 회사에서 개발되는 의약품에 관한 과학적인 평가, 감독 및 안전을 위한 모니터링에 대한 책임을 맡고 있습니다. 규제 승인은 시중에서 판매되는 모든 의약품이 안전하고 효과적이며 높은 품질 임을 보장하게 합니다. 제조업자는 사람과 동물을 위한 의약품의 제약 승인과 시판 허가를 받기 위하여 공식적인 품질 기준을 충족시켜야 합니다. 이것은 규제 기관과 위원회에서 관리되고 있습니다. 제조업체가 충족해야 할 기준은 약전에 정의되어 출간되어 있습니다. 약전에서는 의약품, 중간체, 원재료에 관해 수행되어야 할 모든 시험을 나열하고 있으며, 이는 국가에 의해 법적으로 구속력을 갖습니다.

	Europe ²⁶	UK	USA	Japan	China	Brazil	Argentina
Health Authority	European Medicines Agency (EMA)	Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (MHRA)	Food and Drug Administration (FDA)	Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW)	Ministry of Health (MOH)	Brazilian Ministry of Health	Argentine Ministry of Health
Regulatory Agency for Pharmaceutical Approval	Committee for Medicinal products for Human Use (CHMP)	National Approval by MHRA Centralized Approval by EMA	Food and Drug Administration (FDA)	Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA)	Chinese Food and Drug Administration (CFDA)	National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA)	Drug Regulatory Authority (ANMAT)
Publisher Pharmacopoeia	European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM)	British Pharmacopoeia Commission	US Pharmacopeial Convention	Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA)	Chinese Pharmacopoeia Commission (ChPC)	National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA)	Drug Regulatory Authority (ANMAT)
Pharmacopoeia	European Pharmacopoeia (EP) ²⁷	British Pharmacopoeia ²⁸	United States Pharmacopoeia (USP) ²⁹	Japanese Pharmacopoeia (JP) ³⁰	Chinese Pharmacopoeia (ChP) ³¹	Brazilian Pharmacopoeia ³²	Argentine Pharmacopoeia ³³
NAT Acceptance for Mycoplasma Testing	✓	✓	✓	✓	?	Not described	Not described
Specification of NAT Validation Requirements	✓	✓	(✓)*	✓*	?	X	X

Table 3: EU, USA, Japan, China, Brazil 및 Argentina의 보건 당국, 각 나라의 규제 기관, 법적으로 구속력이 있는 문서(약전), 규제 mycoplasma 검출시험을 위한 NAT 승인 및 NAT 밸리데이션 요건의 사양에 대한 개요
* USP “유사하다고 증명된 절차”
** EP2.6.7 과 동일

NAT와 같은 신속한 mycoplasma 검출시험의 상황은 매우 다릅니다. 많은 국가의 약전에서는 NAT를 유효한 mycoplasma 검출시험으로 언급하고 있지만 protocol 또는 밸리데이션 요건에 대한 국가 간의 통일성이 거의 없습니다. EP와 JP와 같은 일부 약전은 상세한 밸리데이션 가이드라인에 대해 언급하고 있는 반면, 다른 국가에서는 단순히 NAT를 밸리데이션을 시행한 후에만 유효한 검출 시험 방법으로 인정한다고 기술하고 있습니다. 그러나 모든 국가가 적절한 밸리데이션과 공정서 상의 mycoplasma 검출 시험 방법과의 비교 동등성 분석을 요구 합니다.

Validation Requirements	EP 2.6.7.
검출한계 (Limit of Detection ,LOD)	검출한계를 정의하기 위해 각 종에 대한 검출 한계 값(positive cut-off point)을 결정해야 함. (이 장에서는 시험 군주로 사용할 mycoplasma 종의 목록을 제공함). 각각의 군주에 대해 최소 3개의 독립적인 10-fold dilution 테스트를 진행해야 하며, 각 희석 샘플은 충분한 수로 반복 실험 하되, 희석 샘플 수와 반복 샘플 수를 합쳐 전체 샘플 수는 24개가 되어야 함. 검출 한계 값은 총 시험 건수 중 95%가 양성으로 검출될 수 있는 mycoplasma 농도를 의미. 즉, 최소 23개의 시험 결과에서 양성으로 검출 되어야 함.
특이성 (Specificity)	광범위한 mycoplasma에 특이적인 PCR primer를 사용하는 것이 중요. 그러나 PCR primer가 다른 세균 종도 검출할 수 있으므로 이러한 교차검출 가능성은 mycoplasma와 유연관계가 있는 그람 양성 박테리아와 같이 관련된 세균 genera를 테스트하여 결과를 기술해야 함(이 장은 테스트를 시행할 세균 genera의 목록을 제공).
완건성 (Robustness)	NAT 시험 방법의 측정값이 작지만 있을 수 있는 변수의 변화에 영향을 받지 않음을 보여주기 위해 시험 방법에 변화를 주어 이에 대해 입증할 필요가 있음. 이 장에서는 테스트를 시행해야 할 변수와 시험 방법의 예를 제공.
비교동등성 (Comparability)	비교동등성은 NAT와 공정서 상의 방법 간의 LOD의 비교해 보여 주어야 함. 수용 기준은 다음과 같음: 1) NAT의 Culture 방식 대체: 검출한계는 최소 10CFU/ml 이상임을 입증 2) NAT의 Indicator Cell Culture 방식 대체: 각각의 mycoplasma 테스트 종에 대하여 검출한계는 최소 100 CFU/ml 이상임을 입증 3) 두가지 경우 모두 CFU가 calibration된 Mycoplasma 테스트 종을 샘플로 이용하여 NAT 법과 공정서 상의 방법을 동시에 테스트 해 LOD를 평가해야 한다.

Table 4. EP 2.6.7에 상세히 기재되어 있는 밸리데이션 요건에 대한 요약. 더 자세한 사항은 EP mycoplasma NAT 밸리데이션 가이드라인을 참조하시기 바랍니다.

NAT mycoplasma 검출 시험 방법을 시행하기 위해 참고 문헌으로는 법적인 구속력이 없는 다른 문서들도 있습니다:

(i) 비경구 약물 협회(Parenteral Drug Association, PDA)에서는 2010년 “Mycoplasma 검출시험을 위한 대체 방법”에 대한 기술적 보고서를 출판했습니다. 이 보고서는 신속한 mycoplasma 검출시험을 처음 접하는 사용자를 안내하기 위해 assay 절차, 밸리데이션 및 대체적인 mycoplasma 검출시험으로 사용 될 수 있는 어플리케이션을 설명합니다.³⁴
(ii) Roche Pharma는 새로운 제품을 출시하기 위해 MycoTOOL qPCR assay를 사용합니다. 이 assay는 EP 2.6.7에 따라 그 유효성이 검증되었으며, 포괄적인 밸리데이션 보고서는 요청 시 CDA (기밀정보 공개 협정) 하에 제공할 수 있습니다. 연구 설계 및 결과에 대한 요약은 <http://go.roche.com/MycoTOOLqPCR>에서 참조하시기 바랍니다.

EP는 chapter 2.6.7에서 다른 약전보다 더 상세하게 NAT 밸리데이션 가이드라인에 대하여 다루고 있습니다. NAT 기반 mycoplasma 검출 시험에 관하여서 네 개의 요구조건을 충족해야 합니다: 검출한계, 특이성, 완건성 및 비교 동등성 (Table 4). NAT 방법의 완전하고 포괄적인 밸리데이션을 위해 추가적인 매개변수로는 정밀성과 교차 오염에 대한 내용을 포함할 것을 권장합니다.

(iii) USP 외에도 FDA 부서에서 주제별 가이드라인을 발행하였습니다. FDA의 CBER에서는 1993년 “생물학적 제제를 생성하는 세포주의 정의에 관해 고려되어야 할 점”(PTC)에 대한 가이드라인을 발간하였으며, 2010년에는 mycoplasma 검출시험에 대한 추가적인 정보를 제공하는 “산업을 위한 가이드라인”을 발간하였습니다. 두 개의 문서는 법적으로 구속력이 없습니다.^{35,36}
(iv) FDA에서 발간한 생물학적 분석법 밸리데이션 문서는 대체적인 방법으로써의 mycoplasma 검출 시험에 대한 유효성을 검증한 모범 사례를 보여 주나 법적으로는 구속력이 없는 문서입니다.³⁷

Step-by-Step Validation and Implementation of MycoTOOL qPCR

이 장에서는 신속한 mycoplasma 검출 시험을 위한 MycoTOOL qPCR 방법의 시행 및 제품 특이적인 밸리데이션 시 고려해야 할 공정 과정 및 타임 라인에 대해 살피고자 합니다. 보통 mycoplasma 시행 프로젝트는 다섯 단계로 이루어집니다: 공급업체 실사, 타당성 조사, 밸리데이션 전략의 개발, 밸리데이션 진행 및 제출입니다. MycoTOOL qPCR은 Roche Pharma에서 포괄적으로 검증하였습니다. 밸리데이션 보고서는 요청 시 이용가능 하며 보고서는 실제 시행 시 시간 단축을 도울 수 있습니다. 전체의 작업 흐름은 Figure 13에 도식되어있으며 아래에 자세히 설명되어있습니다.

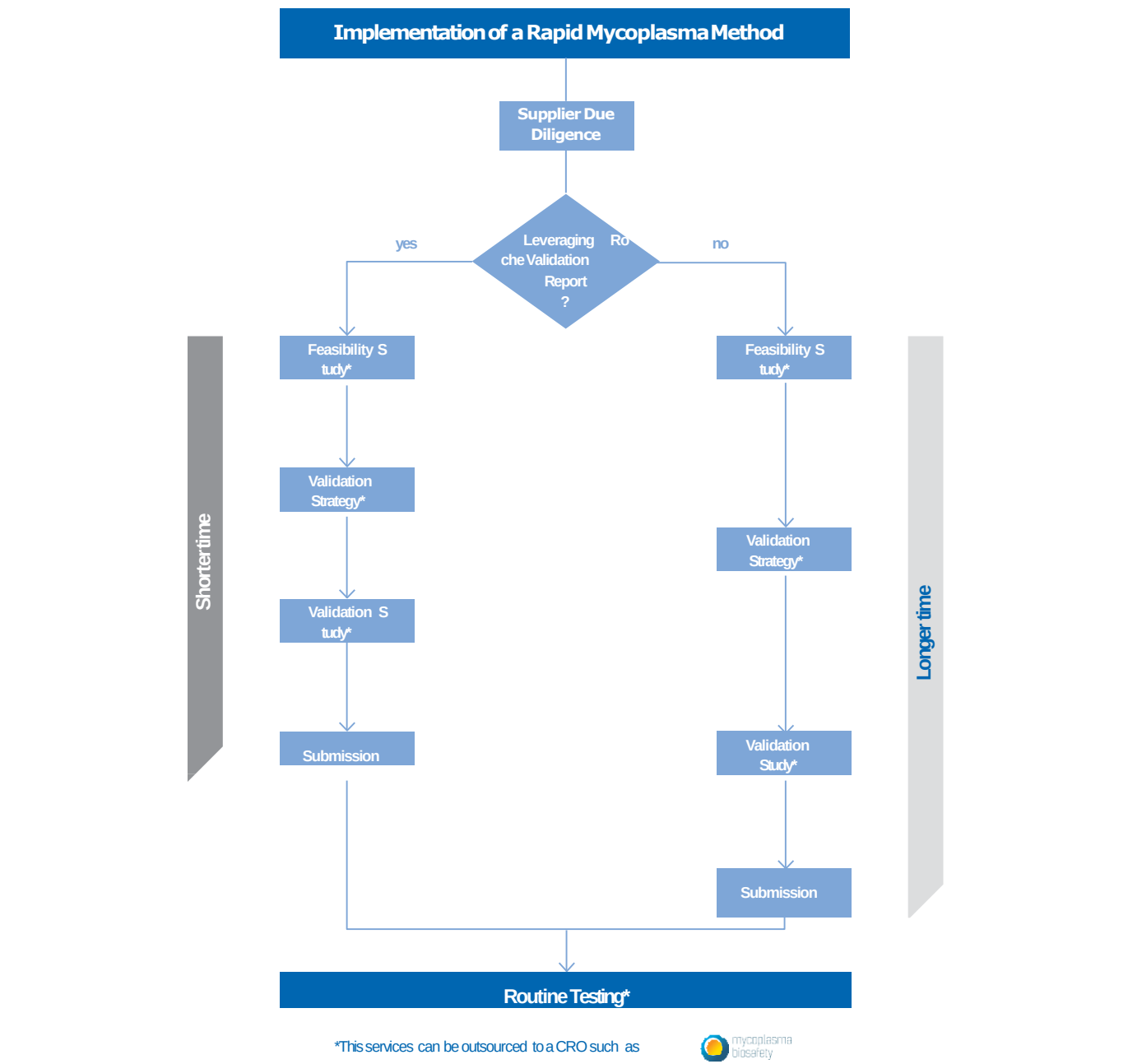


Figure 10: MycoTOOL qPCR의 시행에 대한 순서도. 순서도의 원편은 Roche의 포괄적인 밸리데이션 보고서를 활용하여 수행된 밸리데이션을 묘사하였습니다.(공정에 CHO 세포 이용). Non-CHO 공정을 위한 MycoTOOL qPCR시행 또는 Roche의 포괄적인 밸리데이션에서 사용된 방법과 다를 시 MycoTOOL qPCR 방법에 대한 재검증이 필요합니다. 이 공정은 순서도의 오른쪽에 도식되어 있으며 더 많은 시간이 소요됩니다. 밸리데이션 공정과 정기적 시험을 위해서 아웃소싱을 할 경우 Mycoplasma Biosafety는 좋은 파트너 사가 될 수 있을 것 입니다. 출처: Authors, 2017.

Supplier Due Diligence

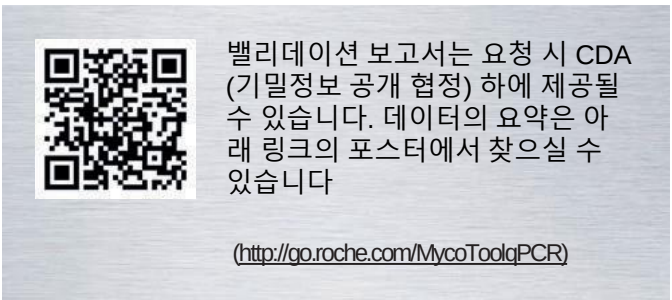
이 단계는 몇 일에서 몇 달의 기간이 소요될 수 있습니다. 시판되는 mycoplasma detection kit의 실사와 CRO 사에 대한 조사를 포함합니다. 제품 사양은 시험 요건에 맞는 지 확인되어야 하며 mycoplasma detection kit 공급자와 CRO의 능력이 평가되어야 합니다. 밸리데이션 단계를 진행하기 전 몇 가지 부분들은 명확히 확인 해야 합니다.

- 기기와 시약의 설계 및 제조에 대하여 공급업체는 적절한 문서를 제공합니까?
- 공급업체는 change control 시스템을 갖추고 있습니까?
- 공급업체는 필요한 경우 품질 및 공급에 대한 계약을 체결 합니까?
- 공급업체는 제 시간에 맞춰 확실하게 제품을 배달합니까?
- 이전에 진행된 밸리데이션 연구에 대한 참고 자료가 있습 니까?
- 공급업체와 CRO가 설문지에 응답하고 실험 시설에서 실 제 감사를 허용합니까?
- 공급업체는 최종 사용자 교육 프로그램, 현장 기술 서비스, 설치 및 운영 자격 서비스, 예방 유지, 보수 서비스 및 기술 지원에 대한 핫라인을 제공합니까?
- CRO는 제품 특이적 NAT 밸리데이션 조사와 NAT 기반의 정기적 시험의 시행에 대한 충분한 경험을 가지고 있습니 까?
- CRO는 밸리데이션 보고서, protocol 또는 이것과 유사한 문서를 제공합니까?
- CRO는 기술 이전 솔루션을 제공합니까?

이 단계에서는 내부적으로 예산을 신청하기 위해 예산에 대한 평가 또는 예산 요청서(즉, 비즈니스 제안서)를 준 비하는 것이 필요할 수 있습니다. 따라서 이 단계에서는 일회성 비용 (실험실 공간, 기기 비용, 설치 비용 등)과 운영 비용(유지 보수, 샘플 당 비용 등)과 같은 연관된 비 용에 대하여 계약 서비스 제공자에게 명확히 체크 해야 합니다.

Roche PharmaGeneric Validation Report

Roche Pharma는 특정 기기장비(LightCycler® 480 Instrument II과 MagNa Pure 96, Figure 10 참조)를 이용 하여 MycoTOOL qPCR을 하는 것에 대하여 EP2.6.7(NAT 밸리데이션 가이드라인)에 따른 완전히 포 괄적인 밸리데이션을 수행하였고, 이때 공정에는 Chinese hamster ovary (CHO) 세포주를 이용 하였습니 다. 일반적으로 FDA 또는 EMA와 같은 규제 기관은 제품 공급자의 밸리데이션과 비교하여 사용자의 기기장비를 포함한 주요 과정에 변경이 없다면 MycoTOOL qPCR에 대하여 완전한 재 검증을 요구하지 않습니다. 따라서 동 일한 작업 흐름을 이용한 제품 특이적인 밸리데이션 조 사는 더 적은 수의 샘플과 짧은 시간으로 수행 할 수 있습 니다. 그러나 이러한 옵션을 결정하기 전에 관련된 규제 기관과의 논의가 먼저 시행되어야 합니다.



Feasibility Study

이 단계는 일주일에서 수개월까지의 기간이 소요될 수 있 습니다. (*Mycoplasma Biosafety*는 유럽 고객을 위한 타당 성 조사를 일주일 이내로 완수 한 바 있습니다). 장비를 빌려 현장에서 진행을 하거나, 더 효과적으로 조사를 수 행할 수 있는 CRO와 함께 진행을 할 수 도 있습니다. 타 당성 조사는 기기장비를 구입 및 밸리데이션 조사에 투자 하기 전에 이루어지는 기술적인 개념의 입증 시험입니다. MycoTOOL qPCR과 테스트를 시행할 물질 간의 기술적 인 비호환성이 있는지 확인 해야 합니다. MycoTOOL qPCR은 5x10⁶ cells/ml의 CHO 세포를 이용하여 검증되 었기 때문에 다른 세포주나 다른 농도의 경우 PCR inhibitor가 있는지, 실험 matrix가 실험 결과에 영향을 미 치는지를 조사하기 위해 테스트를 진행해야 합니다. 타당 성 조사의 또 다른 목표는 필요한 LOD에 도달할 수 있는 지를 평가하며, 목표 LOD에 도달하기 위해 MycoTOOL qPCR 테스트 Protocol이 변경 되어야 하는지 확인하는 것입니다. 변경에는 PCR 샘플의 부피 늘리거나 PCR cycle의 증가하는 것 등이 포함 될 수 있습니다.

Validation Study

이 단계는 두 달부터 수개월의 기간이 소요될 수 있습니 다(*Mycoplasma Biosafety*는 유럽 고객을 위한 밸리데이 션 조사를 4 주 이내로 완수하였습니다). 밸리데이션 조사는 MycoTOOL qPCR이 규제 조건에 따라 지속적으로 mycoplasmas를 검출할 수 있음을 입증합니다. 이 단계는 내부적으로 각각의 기기장비를 사용하여 수행 하거나 CRO와 같은 *Mycoplasma Biosafety*에 아웃소싱을 맡길 수도 있습니다. CRO는 밸리데이션 전략에서 규정된 실험을 실행하며 밸리데이션 보고서에 데이터를 기술합니 다.

Validation Strategy

이 단계는 몇 주에서 몇 달의 기간이 소요될 수 있습니다. 밸리데이션 전략을 세우는 단계는 MycoTOOL qPCR 벨 리데이션 조사 시 수행되는 모든 실험에 관한 로드맵을 제공 할 수 있어야 합니다. (예, LOD 시험, 완전성 시험, 특이성 분석) 이 전략에는 타임라인, 담당자, 실험 방식 및 승인 기준등이 포함 되어야 합니다. Roche에 의해 수 행된 포괄적인 밸리데이션도 고려될 수 있습니다. 일반적 으로 포괄적 밸리데이션의 몇 가지 기준은 재확인되어야 합니다 (예, 선택된 mycoplasma 참조 균주의 LOD 등). 일반적으로 포괄적인 밸리데이션 보고서를 기초로 한 검 증 조사는 샘플 수 및 조사에 대한 전체 비용을 줄일 수 있게 합니다. 특히 Roche의 포괄적 밸리데이션으로 프로 젝트가 간소화되는 경우에 관련된 규제 기관과 함께 이 에 대한 논의가 미리 이루어 져야 합니다.

Submission & Routine Testing

성공적으로 제출을 하고 규제 당국의 밸리데이션 보고 서에 대한 승인을 받으면 정기적으로 시험을 수행할 수 있습니다. 정기적인 시험은 고객과 프로젝트에 따라 내 부 품질 보증 전문가 또는 *Mycoplasma Biosafety*와 같 은 CRO에 전체 과정을 아웃소싱하여 진행할 수 있습 니다.

Summary and Outlook

Mycoplasma 검출시험을 위한 자동화된 NAT 기반의 신속한 방법은 바이오 의약품 산업에 있어서 새로운 기회와 경쟁력 있는 이점들을 제공합니다. 최신의 sample prep 기술과 향상된 Mycoplasma detection kit, 그리고 규제 요건을 충족 시키기 위한 제품 특이적 밸리데이션의 어려움을 해결하기 위한 최근 많은 진전들이 있었습니다. 이는, 이런 신규 검출 시험 시스템이 공정서 상의 culture 방식을 대체 할 수 있는 장기적이면서 우수한 대안으로 떠오르고 있습니다. 최근의 발전과 트렌드를 볼 때 향후 몇 년 내로 EMA와 US FDA와 같은 규제 기관은 Roche CustomBiotech MycoTOOL qPCR assay 와 같이 상용화 되어 있는 kit를 이용한 신속 NAT 기반의 기술로 Mycoplasma를 정기적으로 검사 하는 것에 대한 승인이 증가 할 것으로 예상이 됩니다.

본 가이드라인은 In-Process control 및 바이오 의약품의 품목 출시를 위해 사용 되는 신속한 자동화 NAT 기반 Mycoplasma 검출 시험인 MycoTOOL qPCR의 밸리데이션과 시행 방법에 대한 전반적인 개요 및 구체적인 권고 사항을 제공하고 있습니다.

MycoTOOL qPCR의 현재 사용자들은 자동화된 분석 시스템의 이점을 인정하고 있습니다. 손쉬운 취급, 당일 내로 결과를 얻을 수 있는 신속한 작업 흐름, High-Throughput으로 샘플을 처리 한다는 점, 비용 효율성, 세포의 수가 매우 많은 경우와 같은 최악의 상황에서도 PCR의 Inhibition이나 실험 matrix의 영향이 거의 없다는 점, 세포가 없는 샘플에서도 테스트를 할 수 있다는 점 등은 이 시스템의 확실한 장점입니다. 자동화된 mycoplasma 테스트 시스템을 사용하기 위한 밸리데이션은 어떤 바이오 의약품이든 개별적으로 디자인 될 수 있습니다. 원재료 시험, In process control, 완제품 출시를 위하여 조기 경보 시스템으로 사용되는 MycoTOOL qPCR의 시행은 제조 단계에서의 mycoplasma 오염의 위험성을 확실히 배제하여 효율성과 제품 품질을 향상시킵니다.

자동화된 NAT 기반의 MycoTOOL qPCR법을 이용해 정기적으로 mycoplasma를 테스트 하는 것은 공정서 상의 culture 방법보다 매우 우수한 장점들이 많아 그 적용이 증가 할 것으로 예상 됩니다. 또한 고객의 제품에 특별히 맞추어진 밸리데이션을 위해 경험이 풍부한 전문가의 서비스도 CRO 회사를 통해 받으실 수 있습니다. 이것은 궁극적으로 바이오 의약품 산업 전반에 걸쳐 품질 보증과 품목 출시 기준에 변화를 가져올 것이며 시장에 확실한 영향을 미칠 것입니다.

Kits	Pack Size	Material No.	Description
MycoTOOL Mycoplasma Real-Time PCR Kit	1kit (160 PCR reactions)	06495605001	qPCR로 세포 배양 샘플의 mycoplasma 오염 유무를 확인 MycoTOOL Real-Time PCR Kit는 빠르고 쉽고 신뢰할 수 있는 Mycoplasma 검출 시험을 가능하게 함
MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Kit	MycoTOOL Mycoplasma Detection Amplification Kit	05184240001	일반 PCR로 세포 배양 샘플의 mycoplasma 오염 유무를 확인 MycoTOOL PCR kit는 빠르고 쉽고 신뢰할 수 있는 Mycoplasma 검출 시험을 가능하게 함
QC Sample Preparation Kit	1kit	08146829001	MycoTOOL Mycoplasma Real-time PCR Kit 또는 MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Amplification Kit에 사용되는 핵산을 Manual로 추출하고 정제할 수 있도록 설계되어 있음. 세포수가 일반적인 경우와 높은 경우에 대해 각각의 프로토콜을 포함하고 있으며 추가적으로 Residual DNA CHO Kit와 Residual DNA E.coli Kit를 위해서도 사용될 수 있음. 이 kit는 Triton을 사용 하지 않습니다.
MycoTOOL Control Plasmid	10 ng	05196132103	MycoTOOL 테스트를 사용하는 mycoplasma 테스트 방법의 밸리데이션을 위해 사용되는 plasmid
Residual DNA E. coli Kit	1 kit (96 reactions)	07728735001	세포 배양 샘플의 E.coli 박테리아로부터의 잔여 숙주 세포 DNA의 유무를 확인
Residual DNA CHO Kit	1 kit (96 reactions)	07427689001	세포 배양 샘플의 CHO 세포로부터의 잔여 숙주 세포 DNA의 유무를 확인
Instruments	Pack Size	Material No.	Description
MagNA Pure 96 Instrument	1 instrument, control unit and accessories	06541089001	96개까지의 샘플의 핵산의 정제를 위한 완전히 자동화된 대용량 자동처리기기
MagNA Pure 24 Instrument	1 instrument, built-in control unit, and accessories	07290519001	24개까지의 샘플의 핵산의 정제를 위한 완전히 자동화된 대용량 자동처리기기
LightCycler® 480 Instrument I	1 instrument (96-well)	05015278001	신속한 대용량 처리가 가능한 plate 형의 Real-Time PCR 장비
Reference Standards	Material No.	Description	
Mycoplasma Culture Reference Standards	mbsCRS-EP10*	EP 2.6.7에참고된 모든mycoplasma종의전체 세트: A. laidlawii PG8T, M. arginini G230T, M. fermentans PG18T, M. hyorhinis BTS7T, M. orale CH19299T, M. pneumoniae FHT, M. gallisepticum PG31T, M. synoviaeWVU 1853T, S. citri R8-A2T, and M. hyorhinis DBS 1050 cultivar-α.	
	mbsCRS-JP7*	JP 17th Ed에 참고된 7가지 mycoplasma 종의 전체 세트: A. laidlawiiPG8T, M. arginini G230T, M. fermentans PG18T, M. hyorhinis BTS7T, M. orale CH19299T, M. pneumoniae FHT, and M. salivarium PG20T.	

*EMA와 FDA에서 승인한 NAT방법 밸리데이션의 low GC/CFU mycoplasma 참조 기준. 10, 100 및 1000 CFU/100µl 농도로 이용되며, 살아있는 상태, 열 비활성 상태 또는 용해된 stock을 사용할 수 있습니다.

Glossary

Abbreviation	Definition
ADP	Adenosine diphosphate
ANMAT	Drug Regulatory Authority (Argentina)
ANVISA	National Sanitary Surveillance Agency (Brazil)
ATP	Adenosine triphosphate
CBER	Center for Biologics Evaluation and Research (US FDA)
CDER	Center for Drug Evaluation and Research (US FDA)
CFU	Colony forming unit/s
CHO	Chinese hamster ovary (cells)
ChP	Chinese Pharmacopoeia
ChPC	Chinese Pharmacopoeia Commission
Cq	Threshold cycle
CRO	Contract Research Organization
CFDA	Chinese (State) FDA
CVM	Center for Veterinary Medicine (US FDA)
DNA	Deoxyribonucleic acid
dsDNA	Double-stranded DNA
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
EP	European Pharmacopoeia
EU	European Union
FDA	US Food and Drug Administration
G+C	Guanine-cytosine content
GMP	Good manufacturing practice

Abbreviation	Definition
HEK	Human embryonic kidney
ICH	International Committee on Harmonization
JP	Japanese Pharmacopoeia
LOD	Limit of detection
MHLW	Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare
MHRA	Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency (UK)
MOH	Chinese Ministry of Health
MycotoOL qPCR	MycotoOL Mycoplasma Real-Time PCR Assay/Kit
NAT	Nucleic acid amplification technique/s
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDA	Parenteral Drug Association
PMDA	Pharmaceutical and Medical Devices Agency
PTC	Points to Consider (FDA/CBER Guideline 1993)
QC	Quality control
qPCR	Quantitative Real-time PCR
RC	Recovery control DNA
RNA	Ribonucleic acid
SC	Small colony type
ssDNA	Single-stranded DNA
TD-PCR	Touchdown PCR
UK	United Kingdom
US	United States (of America)
USP	United States Pharmacopeia

References

1)European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), European Pharmacopoeia(EP), 9th Ed., Chapter 26.7: Mycoplasmas; 2016

2)United States Pharmacopeial Convention, United States Pharmacopeia–National Formulary (USP-NF), 39th Ed., Chapter 63: Mycoplasma Tests;2016

3)Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA), Japanese Pharmacopoeia(JP), 17th Ed.: Chapter G3 Biotechnological/Biological Products: Mycoplasma Testing for Cell Substrates used for the Production of Biotechnological/Biological Products; 2016

4) Furness G, The growth and morphology of mycoplasmas replicating in synchrony. J Infect Dis 122:146-158; 1970

5)MacAuliffe L et al., Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival, Microbiology 152:913-922;2006

6)Nocard EE and Roux E, Le microbe de la péripneumonie. Ann Inst Pasteur 12:240-262; 1896. (Translated as 'The microbe of pleuropneumonia' in Rev Infect Dis 12:354-358; 1990)

7)Yus E et al., Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. Science 326: 1263-1268; 2009

8)Rosengarten R et al., The changing image of mycoplasmas: from innocent bystanders to emerging and reemerging pathogens in human and animal diseases. In: Mühlendorfer I and Schäfer KP (Eds), Emerging Bacterial Pathogens, Contributions to Microbiology, Vol 8, pp 166-185, Karger, Basel; 2001

9)Uphoff CC and Drexler HG, Prevention of mycoplasma contamination in leukemia-lymphoma cell lines. Human Cell, 14:244-247;2001

10) Hay RJ et al., Mycoplasma infection of cultured cells. Nature 339: 487-488; 1989.

11)Pawar, V et al., Trends in the incidence and distribution of mycoplasma contamination detected in cell lines and their products. JOM Lett 3:77;1994

12) Rottem S and Barile MF, Beware of mycoplasmas. Trends Biotechnol 11:143-151;1993

13) McGarrity G, Mycoplasma Infection of Cell Cultures. Springer; 2012

14)Liu S et al. (2000), Development and qualification of a novel virus removal filter for cell culture applications. Biotechnol Progress 16:425-434;2000

15)Drexler HG and Uphoff CC, Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. Cytotechnology 39:75-90;2002

16)Zinöcker S et al., Mycoplasma contamination revisited: mesenchymal stromal cells harboring Mycoplasma hyorhinis potently inhibit lymphocyte proliferation in vitro. PLOS One 6:e16005;2011

17) Young L et al., Detection of mycoplasma in cell cultures. Nature Protocols 5:929-934; 2010

18)Pitt A et al., Assay for detecting mycoplasma by measuring acetate kinase or carbamate kinase activity. WO2004/094656 A1; 2004

19) Slater KJ et al., Mycoplasma detecting methods and materials. US7585644 B2; 2004

20) Biunno I and DeBlasio P, Fundamental principles of a Stem cell biobank. In Tiziana AL and Brevini (Eds), Stem

Cells in Animal Species: From Pre-clinic to Biodiversity, pp 151-166, Human Press; 2014.

21)Roche, Mycoplasma PCR ELISA. REF 11663 925 910

22) Wirth M et al., Mycoplasma detection by the mycoplasma PCR ELISA. Biochemica 3:33-35;1995

23)Gardella RS and Del Giudice RA, Growth of Mycoplasma hyorhinis cultivar alpha on semisynthetic medium. Appl Environ Microbiol 61:1976-1979;1995

24) Metzker ML and Caskey CT, Polymerase chain reaction (PCR). eLS;2009

25) Dieffenbach CW and Dveksler GS, Setting up a PCR laboratory. Genome Research, 3:S2-S7; 1993

26)Containing all countries inside the Schengen Agreement: EU member states and countries of the European Economic Area

27) European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), European Pharmacopoeia(EP), 9th Ed; 2016

28) British Pharmacopoeia Commission, British Pharmacopoeia; 2016

29)United States Pharmacopeial Convention, United States Pharmacopeia–National Formulary (USP-NF), 39th Ed; 2016

30) Pharmaceutical and Medical Devices Agency (PMDA), Japanese Pharmacopoeia, 17th Ed; 2016

31) Chinese Pharmacopoeia Commission (ChPC), Chinese Pharmacopoeia (ChP); 2015

32) National Sanitary Surveillance Agency (ANVISA), Brazilian Pharmacopoeia. 5th Ed; 2010

33) Drug Regulatory Authority (ANMAT), Argentine Pharmacopoeia 7th Ed.; 2003

34)Parenteral Drug Association (PDA), Technical Report No. 50, Alternative Methods for Mycoplasma Testing; 2010

35)Food and Drug Administration (FDA), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals (PTC), Attachment 2, Recommended Procedures for Detection of Mycoplasma Contamination in Biological Products Produced in Cell Substrates; 1993

36)Food and Drug Administration (FDA), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), Guidance for Industry: Characterization and Qualification of Cell Substrates and other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications; 2010

37)Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER), and Center for Veterinary Medicine (CVM), Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation; 2001