

# 임상검체를 이용한 *Accupower* UU Real-Time PCR Kit의 평가

민승기, 김순기, 김유석, 조인창, 이경인<sup>1</sup>국립경찰병원 비뇨기과, <sup>1</sup>진단검사의학과

## Evaluation of Clinical Sample for *Accupower* UU Real-Time PCR Kit

Seung Ki Min, Soon Ki Kim, Yoo Seok Kim, In-Chang Cho, Gyeong In Lee<sup>1</sup>Departments of Urology and <sup>1</sup>Laboratory Medicine, National Police Hospital, Seoul, Korea

**Purpose:** In recent years, various diagnostic methods, including culture, immunological detection, conventional polymerase chain reaction (PCR) based methods, and microarray experiment have been applied for detection of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* infection. We assayed results of real time PCR and culture of variable clinical samples and evaluated various diagnostic indexes for assessing the clinical usefulness of the *Accupower* UU Real-Time PCR Kit (Bioneer Corp.) for detection of *U. urealyticum/parvum*.

**Materials and Methods:** We surveyed 111 results of culture test and antibiotic sensitivity test of *Ureaplasma* spp. that were requested to the department of laboratory medicine, National Police Hospital from January to April 2011. The specimens of *Ureaplasma* spp. were collected from 97 uterine cervical swab samples, 13 urine samples, and one expressed prostate secretion sample. Real-time PCR and culture methods were performed using the *Accupower* UU Real-Time PCR Kit (Bioneer Corp.) and *Mycoplasma* IST2 Kit (BioMérieux).

**Results:** The real-time PCR results showed that 80 clinical specimens were infected with *U. urealyticum/parvum*. These results were compared with those confirmed by microbiological culture. Compared with the culture, the diagnostic indexes (sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value) of *Accupower* UU Real-Time PCR were 88.6%, 38.8%, 48.8%, and 83.9%, and the concordance between the *Accupower* UU Real-Time PCR Kit and the microbiological culture method was 58.5%.

**Conclusions:** *Accupower* UU Real-Time PCR is a very valuable technique which can process analysis of a massive number of samples with high speed, high sensitivity and specificity, and a high detection rate, particularly for *Ureaplasma* spp.

**Keywords:** Real-time polymerase chain reaction; *Ureaplasma urealyticum*; *Ureaplasma parvum*; Culture

Received: 3 October, 2014

Revised: 22 October, 2014

Accepted: 22 October, 2014

**Correspondence to:** Gyeong In Lee  
Department of Laboratory Medicine, National Police Hospital, 123, Songi-ro, Songpa-gu, Seoul 138-708, Korea  
Tel: +82-2-3400-1334, Fax: +82-2-3400-1566  
E-mail: gyeonginlee@hanmail.net

Copyright © 2014, Korean Association of Urogenital Tract Infection and Inflammation. All rights reserved.  
© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 론

성매개감염은 *Mycoplasma genitalium*과 *Ureaplasma urealyticum*을 포함한 다양한 병원체에 의해 유발되는 흔한 감염병이다. 최근에는 배양법, 면역학적인 검출법, 전통적인 다중중합효소(polymerase chain reaction, PCR)방법, 그리고 microarray experiment를 포함하는 다양한 방법들이 *M. genitalium*과 *U. urealyticum*을 검출하기 위해 적용되고 있다. 그러나 이러한 방법들은 적은 수의 병원체 검출에 제한적일 뿐 아니라 정량적인 검출방법이 아니다. 그러므로 정확하고, 정량적이며, 고처리율(high-throughput)을 갖는 분자생물학적 진단방법이 적절한 임상치료와 효과적인 전염병 조절에 필수적이라 생각된다.

생식기계 mycoplasma 감염은 흔히 배양검사로 진단된다. 하지만 배양검사는 특수 배지(media)와 전문기술을 요하는 점에서 비용이 많이 드는 검사법이다. *Ureaplasma* spp.와 *Mycoplasma hominis*는 배양하는 데 2-5일이 걸리며 *Mycoplasma genitalium*은 8주까지 걸릴 수 있다.<sup>1</sup>

본 연구에서는 여러 가지 임상검체에서 *U. urealyticum/parvum*을 검출하기 위하여 개발된 Accupower UU Real-Time PCR Kit (Bioneer Corp., Daejeon, Korea)를 평가하고, real-time PCR 검사결과를 Mycoplasma IST2 Kit (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용한 배양검사 결과와 비교하여 민감도, 특이도, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) 및 일치율(concordance)을 분석하여 임상적 유용성을 평가하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

2011년 1월부터 4월까지 국립경찰병원 진단검사의학과에 *Ureaplasma* spp. 배양 및 항생제 감수성 검사가 의뢰된 111명의 환자 검체를 대상으로 하였다. 성별은 남자가 2명 여자가 109명이었고, 연령분포는 12세에서 81세 사이였다. 이들 연령의 중간값 및 평균은 각각 26.0세, 27.4세였으며 표준편차는 11.73이었다.

### 2. 검체

검체의 종류는 자궁경부 면봉채취 97검체, 소변 13검체, expressed prostatic secretion (EPS) 1검체였다. 자궁경부 면봉검체는 2개를 채취해 하나는 수술배지에 접종하여 배양검사에 사용하였고, 다른 하나는 원추형 튜브에 넣어 PCR 검사에 사용하였다. 소변은 무균컵에 채집하여 검사하였으며, EPS 검체는 검체채취 후 두 개의 면봉에 검체를 적서 검사하였다. 즉시 검사하지 못하는 경우에는 -70°C에 냉동 보관하였다.

## 3. 방법

### 1) PCR 검사

Urease complex 중 *UreF* gene (YP002284867.1, GenBank)을 target gene으로 하여 *U. urealyticum/parvum*을 검출하는 Accupower UU Real-Time PCR Kit를 사용하여 제조사의 지침에 따라 검사를 시행하였다.

검체 전처리로 소변검체는 10 ml 정도를 15 ml 시험관에 옮긴 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리를 시행하고, 자궁경부 면봉검체와 EPS 검체는 검체의 보관 용기를 3분간 강하게 vortex한 다음 면봉을 제거하고 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 남은 cell pellet을 핵산 추출에 사용하였다.

*ExiPrep* 16 (Bioneer Corp.) 장비에서 *ExiPrep* Bacteria Genomic DNA Kit (Bioneer Corp.)를 사용하여 bacterial genomic DNA를 추출하였으며, 추출된 bacterial genomic DNA는 AccuPower UU Real-Time PCR Kit를 사용하여 *Exicycler* 96 (Bioneer Corp.) 장비에서 real-time PCR을 시행하고 분석하였다. 결과에 대한 유효성을 확인하기 위해 PCR product에 대한 sequencing을 진행하였다. 먼저 PCR product를 전기영동하여 agarose gel-extraction (Accupower Gel Purification Kit [K-3035]; Bioneer Corp.)한 후, ABI3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 이용하여 sequencing하였다. 그 결과는 basic local alignment search tool (BLAST) analysis를 이용하여 분석하였다.

### 2) 배양검사

배양검사는 Mycoplasma IST2 Kit를 이용하여 시행하였다. 자궁경부 면봉검체와 EPS 검체는 배양면봉을 사용하여 검체를 채취한 즉시 대부분의 그람 양성 및 음성 균주를 억제하는 R1 수술배지에 면봉을 넣은 후 잘 섞었으며, 소변검체는 200 µl를 즉시 R1 수술배지에 넣어 잘 섞었다. 검체와 잘 섞인 R1 3 ml를 취해 1 ml의 lyophilized urea-arginine broth가 들어있는 R2 용액과 섞은 후 pellet이 완전히 용해될 때까지 vortex하여 접종물을 만들었다. Mycoplasma IST2 strip의 22 개 각 cupule에 55 µl씩 분주하였다. 각각의 cupule에 미네랄 오일(mineral oil)을 두 방울씩 떨어뜨린 후 strip 뚜껑을 닫고, strip과 분주하고 남은 R2를 함께 36°C±2°C에서 배양하여 24시간과 48시간에 색깔의 변화를 관찰하여 판독하였다.

## 결 과

검체의 종류는 EPS가 1검체(0.9%), 소변이 13검체(11.9%)였으며, 자궁경부 면봉 채취 검체가 97검체(87.4%)를 차지하

**Table 1.** Number of specimens positive for *Ureaplasma* spp.

Specimen type	No. of specimens		
	Tested	Culture positive (%)	PCR positive (%)
Cervical swab	97	40 (41.2)	68 (70.1)
Urine	13	4 (30.7)	12 (92.3)
EPS	1	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	111	44 (39.6)	80 (72.1)

EPS: expressed prostatic secretion.

**Table 2.** Comparison of culture with real-time PCR for detection of *Ureaplasma* spp.

	Real-time PCR		
	Positive, n (%)	Negative, n (%)	Total (n)
Culture			
Positive	39 (35.1)	5 (4.5)	44
Negative	41 (36.9)	26 (23.4)	67
Total	80 (72.1)	31 (27.9)	111

PCR: polymerase chain reaction.

였다. *U. urealyticum/parvum*을 검출하는 real-time PCR 검사의 양성 예는 총 111개 검체 중 80검체로 72.1%의 양성률을 나타냈으며, Mycoplasma IST2 검사 결과는 111 검체 중 44 검체에서 양성 결과를 나타내어 39.6%의 양성률을 나타냈다.

검체 종류에 따른 배양검사 양성률은 EPS가 0.0%, 소변이 30.7%, 자궁경부 면봉검체가 41.2%였으며, PCR 양성률은 EPS가 0.0%, 소변이 92.3%, 자궁경부 면봉검체가 70.1%였다 (Table 1).

Mycoplasma IST2 검사 결과와 real-time PCR 결과를 비교하였을 때 총 111개 검체 중에서 65개의 검체가 Mycoplasma IST2의 결과와 일치하여 58.6%의 일치율을 나타냈다 (Table 2). 자궁경부 면봉 채취 검체에서의 일치율은 60.8%였으며, 소변검체는 38.5%, EPS는 100%의 일치율을 보였다 (Table 3).

Mycoplasma IST2 검사 결과와 불일치를 보인 경우 중 real-time PCR 검사에서는 양성이었으나, Mycoplasma IST2 검사에서 음성인 경우가 111개 검체 중에서 41개(36.9%) 검체였으며, real-time PCR 검사에서는 음성이었으나 Mycoplasma IST2 검사에서 양성인 경우는 111개 검체 중에서 5개 검체 (4.5%)였다 (Table 2).

Mycoplasma IST2 검사 결과를 기준으로 한 Accupower UU Real-Time PCR의 민감도는 88.6%였으며, 특이도는 38.8%였다. Accupower UU Real-Time PCR 검사의 PPV는 48.8%였으며, NPV는 83.9%였다 (Table 4).

## 고 찰

검체 종류에 따른 Mycoplasma IST2 검사의 양성률은 EPS가

**Table 3.** Comparison of culture with real-time PCR for detection of *Ureaplasma* spp. by specimen types

	Real-time PCR					
	Cervical swab (n)			Urine (n)		
	Positive	Negative	Total	Positive	Negative	Total
Culture						
Positive	35	5	40	4	7	11
Negative	33	24	57	1	1	2
Total	68	29	97	5	8	13

PCR: polymerase chain reaction.

**Table 4.** Diagnostic index of Accupower UU Real-Time PCR (%)

Diagnostic index	Accupower UU Real-Time PCR
Sensitivity	88.6
Specificity	38.8
Concordance	58.6
Cervical swab	60.8
Urine	38.5
Positive predictive value	48.8
Negative predictive value	83.9

PCR: polymerase chain reaction.

0.0%, 소변이 30.7%였고, 자궁경부 면봉검체가 41.2%였으며, real-time PCR 양성률은 EPS가 0.0%, 자궁경부 면봉검체 70.1%, 소변이 92.3%의 순으로 높은 검출률을 나타냈다. 전체적으로 Accupower UU Real-Time PCR 검사의 양성률이 72.1%, Mycoplasma IST2 검사의 양성률이 39.6%로 real-time PCR 검사의 양성률이 훨씬 높았는데 특히 소변 검체는 real-time PCR 검사가 Mycoplasma IST2 검사보다 3배나 높은 *Ureaplasma* spp.의 검출률을 보여 검체에 따라 검사방법 선택이 중요할 것으로 생각되었다.

Mycoplasma IST2 검사 결과와 real-time PCR 결과를 비교하였을 때 58.5%의 낮은 일치율을 보였는데, Bae 등<sup>2</sup>은 유사한 배양법인 MYCOFAST Evolution 2와 전통적인 PCR 방법을 비교한 연구에서 *U. urealyticum* 검출 시 일치율을 86.8%로 보고하여 본 연구보다 높은 일치율을 보고하였다. 이들의 연구는 자궁경부 면봉채취 검체에서의 결과로 본 연구의 자궁경부 면봉검체에서 일치율인 60.8%보다 높았다. 일치율이 낮은 원인으로 주로 Mycoplasma IST2 검사에서 음성이면서 real-time PCR 분석에서 양성결과인 경우가 주 원인을 차지하고 있어 Mycoplasma IST2 검사의 낮은 민감도 때문이라고 생각되었다.

Mycoplasma IST2 검사에서 양성 판정을 보였지만 Accupower UU Real-Time PCR 검사 결과에서 음성으로 판정되었던 예는 111검체 중 5검체(4.5%)였는데 Bae 등<sup>2</sup>은 MYCOFAST 양성이고 PCR 음성인 예가 91예 중 6예(6.6%)에서 관찰되었다고 보고하면서 PCR 반응을 저해하는 물질 때문인 것으로 추측하였다. 또 다른 원인으로 ureaplasma는 urea를 암모니아

로 분해하는 urease를 생산하며 이에 따라 배지의 pH를 좀더 알칼리 값으로 이동시켜서 배지의 색깔을 변화시키고 이런 변화가 ureaplasma의 존재를 나타낸다. 하지만 ureaplasma만이 urease로 urea를 가수분해시킬 수 있는 유일한 미생물이 아니고 다른 세균(*Proteus*, *Klebsiella*)에서도 배양배지의 알칼리화를 관찰할 수 있어 결과가 양성으로 오판될 수도 있으므로<sup>3</sup> 위양성의 가능성도 배제할 수 없다. Biernat-Sudolska 등<sup>3</sup>도 시판 배양검사방법의 양성 결과가 색채반응이 비특이적이었기 때문에 분자적 방법으로 확인되지 않았던 예를 보고하고 이러한 오판의 가능성은 고체배지와 함께 시판용 검사 strip을 사용하고 검체 내 ureaplasmas와 세균집락을 형성하는 다른 상재균의 성장을 추적함으로써 제한될 수 있다고 하였다.

Mycoplasma IST2 검사 결과와 불일치를 보인 경우 중에서 Accupower UU Real-Time PCR 검사에서 양성으로 판정되었지만 Mycoplasma IST2 검사에서 검출되지 않았던 경우는 111검체 중 41검체(36.9%)였는데, 이 경우는 Accupower UU Real-Time PCR Kit를 이용하여 검사를 진행한 결과 31-42 Ct 정도에서 검출되어 적은 양의 DNA 농도 검체에도 양성으로 판정되었으나, 배양을 통한 진단 방법은 민감도가 떨어져 음성으로 판정된 것이라 생각되었다. 이에 대해서는 sequencing을 통해 검사의 유효성을 확인하였다. 비록 배양검사가 임상검체에서 ureaplasma 검출을 위한 참고방법으로 흔히 간주되기는 할지라도, 개선된 PCR 분석이 본질적으로 좀 더 민감하며 매우 적은 수의 미생물을 검출할 수도 있다. 따라서 PCR-양성이고 배양-음성인 검체는 위양성이라기보다 진양성인 것으로 볼 수 있다.<sup>4</sup> PCR 분석이 임상검체에서 ureaplasma를 검출하기 위해 배양법보다 더 민감한지 여부는 PCR target, 분석 조건, 그리고 사용된 배양방법에 의거한다. 많은 연구에서 PCR 분석이 배양법보다 우수할 수 있다고 명백히 제시되고 있다.<sup>5-9</sup>

본 연구에서는 urease complex 중 *UreF* gene을 정렬하여 *U. urealyticum*과 *U. parvum*을 동시에 검출할 수 있도록 상동관계가 높은 부위를 도안하여 증폭 가능하도록 설계된 Accupower UU Real-Time PCR Kit를 사용하였다. 두 가지 *Ureaplasma* spp.를 구별하기 위해 urease gene,<sup>10-12</sup> mba gene,<sup>13</sup> 그리고 16S rRNA gene<sup>14</sup>을 표적화한 real-time PCR 분석들이 근래에 개발되고 있다. 전통적인 PCR과 배양법과 비교해볼 때 real-time PCR 중 동정 분석방법은 보다 빠르고, 특이적이고 민감하며 오염에 덜 지배를 받을 뿐 아니라 정량적인 방법이다.<sup>11</sup>

역사적으로 배양동정법이 결정적인 것으로 간주되기는 하지만 어떤 방법도 위양성 결과에 대한 가능성을 갖고 있으며 Mycoplasma 집락 동정은 박리현미경하에서 육안적 관찰을 근거로 하기 때문에 어렵고 주관적이다.<sup>1</sup> *Ureaplasma* 배양은 어렵고 시간이 걸리며 특수 배양배지와 성장조건이 필수적이

고 통상적인 세균배양방법으로는 *Ureaplasma*종을 발견하기에 불충분하다. 배양법에 의한 동정은 ureaplasma 검출의 gold standard로 간주되고 있지만 유감스럽게도 비싸고 특수 처리와 풍부한 배지를 요한다. 게다가 결과를 얻기 위해 2-5일이 소요된다.<sup>3</sup> 또한 *Ureaplasma* spp. 검출은 전통적으로 특수 배지에 배양여부가 달려있다. 상업적으로 이용할 수 있는 진단 kit들이 개발되어 비노생식기계 검체와 신생아 호흡기 검체 등에서 *Ureaplasma* spp. 검출을 더 간단한 대체방법으로 검사할 수 있게 되었으며 이러한 검사방법들은 주로 urea를 가수분해시켜서 암모니아를 방출시켜 색 변화를 통해 24시간에서 48시간 내에 검사하는 방법이다.<sup>15</sup> 본 연구에서 사용한 Mycoplasma IST2는 *Ureaplasma* spp.와 *Mycoplasma hominis*를 정량배양하여 10<sup>4</sup> CFU/specimen을 기준으로 10<sup>4</sup> CFU/specimen 이하 양성 및 10<sup>4</sup> CFU/specimen 이상 양성으로 판독하며, 9가지 항생제(erythromycin, azithromycin, clarithromycin, josamycin, pristinamycin, tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin 및 ofloxacin)에 대해 감수성 검사를 시행하는 검사 방법이었다.

검사 소요시간은 Mycoplasma IST2 검사가 48시간 이상 길게 소요되는 반면 Accupower UU Real-Time PCR 검사는 3시간 30분 정도 걸리므로 배양검사가 장시간 소요되는 단점을 나타내었다.

## 결 론

Accupower UU Real-Time PCR 검사는 검사 소요시간이 짧고, 민감도와 특이도가 높으며, 대량의 검사업무를 고속으로 수행할 수 있고, 특히 소변검체에서 검출률이 매우 높아 임상적으로 매우 유용한 검사라고 생각한다.

## CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

## REFERENCES

1. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. J Clin Microbiol 2004;42:1528-33.
2. Bae HG, Heo WB, Lee NY, Lee WK, Koo TB. Detection of ureaplasma urealyticum and mycoplasma hominis in pregnant women using MYCOFAST(R) evolution 2 and PCR. Korean J Clin Microbiol 2003;6:74-80.
3. Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrzewska D, Lauterbach R. Assessment of various diagnostic methods of ureaplasma

- respiratory tract infections in newborns. *Acta Biochim Pol* 2006;53:609-11.
4. Xiao L, Glass JI, Paralanov V, Yooseph S, Cassell GH, Duffy LB, et al. Detection and characterization of human *Ureaplasma* species and serovars by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2010;48:2715-23.
  5. Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P, Zimmermann A, Vahlensieck W, Pfaff F, et al. Polymerase chain reaction versus culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996;15:595-8.
  6. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis* 1993;17 (Suppl 1):S148-53.
  7. Luki N, Lebel P, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:255-63.
  8. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005;18: 757-89.
  9. Yoon BH, Romero R, Lim JH, Shim SS, Hong JS, Shim JY, et al. The clinical significance of detecting *Ureaplasma urealyticum* by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189: 919-24.
  10. Cao X, Jiang Z, Wang Y, Gong R, Zhang C. Two multiplex real-time TaqMan polymerase chain reaction systems for simultaneous detecting and serotyping of *Ureaplasma parvum*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59:109-11.
  11. Mallard K, Schopfer K, Bodmer T. Development of real-time PCR for the differential detection and quantification of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. *J Microbiol Methods* 2005;60:13-9.
  12. Yi J, Yoon BH, Kim EC. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR. *Mol Cell Probes* 2005;19:255-60.
  13. Cao X, Wang Y, Hu X, Qing H, Wang H. Real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for quantitative detection and differentiation of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:373-8.
  14. Yoshida T, Deguchi T, Meda S, Kubota Y, Tamaki M, Yokoi S, et al. Quantitative detection of *Ureaplasma parvum* (biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) in urine specimens from men with and without urethritis by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis* 2007;34:416-9.
  15. Cheah FC, Anderson TP, Darlow BA, Murdoch DR. Comparison of the *Mycoplasma* Duo test with PCR for detection of ureaplasma species in endotracheal aspirates from premature infants. *J Clin Microbiol* 2005;43:509-10.