

Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Genital *Mycoplasmataceae* in Korean Women: Correlation between Phenotypic Test and Resistance Genes

Jiyoung Chang¹, Jin Kyung Yu¹, Changeun Song¹, In Yang Park², Yeon-Joon Park¹

Departments of ¹Laboratory Medicine, ²Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Background: While 7.6% of cultured genital *Mycoplasmataceae* was identified as *Ureaplasma urealyticum*, most of them were *Ureaplasma parvum* (80.3%). This is the first study differentiating between these two species. We investigated the prevalence and antimicrobial resistance of genital *Mycoplasmataceae* in Korean women.

Methods: A total of 150 specimens submitted to the laboratory for culture of *M. hominis* and *Ureaplasma* spp. were included. Detection and antimicrobial susceptibility tests were performed with the Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux, France). The identification of *Ureaplasma* spp. was performed by PCR, and mutations in drug resistance genes were investigated by PCR and sequencing.

Results: In total, 66 specimens (44.0%) were positive for genital *Mycoplasmataceae*: *U. parvum*, 53 (80.3%); *U. urealyticum*, 5 (7.6%); *M. hominis*, 2 (3.0%); mixed infection, 6 (9.1%). Susceptibilities of *Ureaplasma* spp. to erythromycin, azithromycin, clarithromycin, and doxycycline were 86.0%, 80.7%, 98.2%, and 94.7%, respectively. The susceptibility of *Ureaplasma* spp. to

ofloxacin and ciprofloxacin was 47.4% and 17.5%, respectively. The S83L mutation was found in the *ParC* subunit of the ofloxacin-resistant (5/7, 71.4%) and the ciprofloxacin-resistant isolates (7/14, 50.0%). One *M. hominis* isolate showed resistance to erythromycin, azithromycin, and clarithromycin but susceptibility to josamycin, pristinamycin, fluoroquinolones, and tetracyclines.

Conclusion: The prevalence of genital *Mycoplasmataceae* in Korean women was 44.0%; most of them were identified as *U. parvum*. As more than 10% of *Ureaplasma* spp. showed non-susceptibility to erythromycin and azithromycin (15.5%, 20.7%), a susceptibility test is needed prior to use of these antibiotics. Further study is needed about the clinical features of infections caused by *U. urealyticum* vs. *U. parvum* and their associated resistance mechanisms. (Ann Clin Microbiol 2016;19:13-19)

Key Words: Antimicrobial susceptibility, Mycoplasma IST2 kit, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*

INTRODUCTION

*Ureaplasma*와 *mycoplasma*는 세포벽이 없는 균속으로 독립적인 증식이 가능한 가장 작은 미생물체이다[1]. 이들은 *Mycoplasmataceae*과에 속하나, *Ureaplasma* 균속은 urea를 가수분해하는 능력이 있어 *Mycoplasma* 균속과 구별된다[2]. *Ureaplasma*와 *mycoplasma*는 건강 성인의 비노생식기에서도 분리되나, 요도염, 골반염, 불임, 자연유산, 조기분만, 조기진통, 조기양막파수, 저체중아, 조산아의 호흡기 감염, 패혈증 등의 원인으로 여겨지고 있다[1-3]. *Ureaplasma*에는 두 가지의 뚜렷한 변종이 알

려져 있는데, biovar 2 (*Ureaplasma urealyticum*)은 상기 질환들을 일으키나 biovar 1 (*Ureaplasma parvum*)의 역할은 뚜렷하지 않다[4,5]. 그러나 Martínez 등[6]의 연구에서는 두 biovars 모두 양막강 내 침입하여 임신기 합병증과 관련이 있다고 하였고 De Francesco 등[7]은 생식기 감염 증상이 있는 여자 환자의 44%에서 *U. parvum* serovar 3/14가 발견되었으며, Kong 등[8]은 임신부 질도말 검체 87%에서 *U. parvum*이 동정되었고 이는 임신 시 합병증과 관련이 있었다고 하였다. 한편 Xiao 등[2]의 연구에 따르면 변종들의 감별이 임상적으로 *ureaplasma* 병원성을 구별하는데 도움을 주지 못하며 감염된 숙주의 특이적 면역

Received 10 November, 2015, Revised 12 January, 2016, Accepted 27 January, 2016

Correspondence: Yeon-Joon Park, Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul St. Mary's Hospital, 222 Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 06591, Korea. (Tel) 82-2-2258-1640, (Fax) 82-2-2258-1719, (E-mail) yjpk@catholic.ac.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

반응에 따라 감염 양상이 다르게 나타날 것이라고 하였다.

Ureaplasma와 mycoplasma는 세포벽이 없어 베타락탐(β -lactam) 제제에 의해 억제되지 않고, 단백질 합성 억제에 작용하는 마크로라이드(macrolides), 테트라사이클린(tetracycline) 또는 DNA복제를 억제하는 퀴놀론(quinolone) 등에 감수성을 보인다. 산모의 경우 생식기 마이코플라즈마 감염은 조기분만 위험이 있으므로 조기 양막박리 시 주산기를 연장하고 그와 관련된 합병증과 신생아 감염을 줄이기 위해 항균제 투여가 필요하다. 이때 주로 마크로라이드 계열의 약제가 쓰이며, 마크로라이드에 내성일 경우 독시사이클린(doxycycline)이 사용된다.

이러한 마이코플라즈마의 배양 및 감수성 검사방법은 매우 까다로우므로 대부분의 임상검사실에서는 상품화된 kit를 사용한다. 본 검사실에서는 Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하는데, 이 검사법에서는 *U. urealyticum*과 *U. parvum*이 모두 자라므로 이들의 감별이 필요하다. 그리고 마이코플라즈마의 CLSI에서 제안하는 항생제 감수성 검사방법과 Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)에서 사용되는 항균제 농도, 균액 농도 등의 차이로 실험방법이 다르고 설정된 항생제별 기준(breakpoint) 또한 다르다[9].

Ureaplasma spp.의 항균제 내성은 마크로라이드의 경우 항균제 작용부위의 변이, 즉 23S rRNA의 erythromycin 결합부위의 유전자변이(A2066G)가 리보솜 단백질 L4의 변이[A208C (T70P) or insertion] 또는 L22 부위의 변이와 동반되어 일어나며[10,11] 테트라사이클린은 내성유전자인 *tet(M)* 또는 *tet(M)* transposon의 marker인 *int-Tn*에 의한 ribosomal protection에 의한다[12]. 퀴놀론의 경우 Type II topoisomerases인 DNA gyrase와 topoisomerase IV를 전사하는 *gyrA* (A2399T, C310A), *parC* (G244A, C248T, G259A, T8A), *parE* (G1369A, C1409T, C5T, A1280T) 유전자의 변이에 의해 초래되는 아미노산의 변이 *gyrA* (N800I, Q104K), *parC* (D82N, S83L, E87K, V3E), *parE* (A457T, S470L, A2V, D427V)가 관여한다[10,13].

본 연구에서는 배양된 ureaplasma 중 병원성이 보고된 *U. urealyticum*의 비율을 알아보고, kit를 이용한 내성검사결과를 내성유전자의 변이와 비교하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상

2014년 10월부터 2014년 11월까지 서울성모병원 진단검사의학과에 *Ureaplasma/Mycoplasma hominis* 배양검사가 의뢰된 150개의 검체들(질도말검체 142, 자궁경부도말검체 5, 양수 3)을 대상으로 하였고 대상군의 나이 분포는 중앙값 31세로 최소 19세부터 최대 49세 사이였으며 그중 118명이 산모였다.

2. Mycoplasma IST kit를 이용한 Ureaplasma 배양동정 및 항생제감수성검사

*Ureaplasma*의 배양동정과 항생제감수성검사를 위하여 *Mycoplasma* IST2 (bioMérieux)를 사용하였다. 이를 간단히 설명하면 다음과 같다. 환자로부터 수송배지에 얻어진 도말검체를 kit 내에 있는 시약인 R1배지에 접종한 후 3 mL를 덜어 R2배지에 넣고 vortex하여 lyophilized pellet이 모두 용해될 때까지 섞는다. 스트립의 22웰에 혼합된 용액을 55 μ L씩 분주한 후 파라핀오일을 2방울씩 떨어뜨린다. 37°C에서 24-48시간 배양 후 각 웰에 있는 용액의 색 변화로 판독한다. 배지가 적색이나 오렌지색으로 바뀌었을 때 생식기의 마이코플라즈마가 성장한 것이며, 배지가 노랑색일 경우 생식기의 마이코플라즈마의 성장이 없는 것을 의미한다. 스트립은 *M. hominis*와 *U. urealyticum*의 배양유무, 검체의 균배양농도($\geq 10^4$ CFU), 항생제 감수성; doxycycline (DOT), josamycin (JOS), ofloxacin (OFL), erythromycin (ERY), tetracycline (TET), ciprofloxacin (CIP), azithromycin (AZI), clarithromycin (CLA) 그리고 pristinamycin (PRI)을 판독할 수 있도록 되어 있고 이는 제조사의 지침을 따라 하였다. 항생제별 breakpoint는 다음과 같고 이에 따라 항생제 감수성을 판단하였다. [ureaplasma (mg/L): erythromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; azithromycin S ≤ 0.12 , R ≥ 4 ; clarithromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; josamycin S ≤ 2 , R ≥ 8 ; ciprofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 2 ; ofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; tetracycline, doxycycline S ≤ 4 , R ≥ 8 ; pristinamycin S ≤ 2 mycoplasma (mg/L): erythromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; azithromycin S ≤ 0.12 , R ≥ 4 ; clarithromycin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; josamycin S ≤ 2 , R ≥ 8 ; ciprofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 2 ; ofloxacin S ≤ 1 , R ≥ 4 ; tetracycline, doxycycline S ≤ 4 , R ≥ 8 ; pristinamycin S ≤ 2]

3. DNA 추출과 Ureaplasma 동정을 위한 PCR 검사

-70°C에 냉동시킨 배양용액을 해동한 후 전체 1 mL의 용액을 12,000 revolutions per minute (RPM)에서 5분간 원심분리한 후 상청액을 버리고 침사를 0.01 M의 phosphate-buffered saline (PBS) 500 μ L로 씻어낸 후 12,000 RPM에서 5분간 원심분리하였다. DW 용액으로 재부유시킨 후 100°C water bath에서 10분간 끓인다. 용액을 식힌 후 12,000 RPM에서 5분간 원심분리 후 상청액을 PCR template로 사용하였다. *U. parvum*, *U. urealyticum* 그리고 *M. hominis*를 구별하여 동정하기 위해 Stellrecht 등[14]이 제안한 방법을 이용하였다.

4. 염기서열분석을 통한 항생제 내성유전자 변이검사

마크로라이드 계열 항생제 내성표현형의 유전자 변이를 검사하기 위하여 마크로라이드 비감수성 균주에 대하여 23S rRNA domain II, domain V, 16S rRNA L4 또는 L22 리보솜 단백질 유전자부위 염기서열분석을 시행하였고[10,15] 이를 마크

로라이드 감수성 10개의 균주와 비교하여 분석하였다. 테트라 사이클린 계열 항생제 비감수성 균주에 대하여 *tet(M)* 유전자와 *tet(M)* transposon의 marker인 *int-Tn* 존재유무를 PCR로 분석하였다[16]. 퀴놀론 계열 항생제와 관련된 내성유전자 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 변이를 검사하기 위하여 퀴놀론 내성균주의 염기서열분석을 시행하였다[10].

5. 통계

수집된 자료는 MedCalc, version 14.8.1 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 이용하여 균농도별 항생제 감수성을 비교를 Chi-square test로 분석하였다. *P*값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 의미가 있는 것으로 해석하였다.

RESULTS

1. *Mycoplasma* IST2 kit의 배양 결과와 항생제 감수성양상 결과

Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)를 사용하여 배양한 결과 균양성물을 살펴보면 전체 생식기 마이코플라즈마 양성물은 44.0% (66/150)으로 그중 *Ureaplasma* spp. 농도 10^4 이상은 17검체(11.3%), *Ureaplasma* spp. 농도 10^4 이하는 41검체(27.3%), *M. hominis*는 1검체(0.7%), *U. parvum*과 *M. hominis*의 복합감염은 6검체(4.0%)였고 나머지 1검체(0.7%)는 판독이 불가능하였다.

PCR을 이용하여 균종 동정한 결과 전체 양성검체 66검체 중 53검체에서 *U. parvum* (80.3%)으로 동정되었고 5검체에서 *U. urealyticum* (7.6%), 2검체에서 *M. hominis* (3.0%), 6검체에서 *U. parvum*과 *M. hominis*의 복합감염(9.1%)으로 동정되었다.

Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)와 PCR과의 일치율을 살펴보면 *Ureaplasma* spp.가 10^4 이상으로 배양된 17검체 중 16검체가 PCR결과와 일치하였고 그중 14검체가 *U. parvum*, 2검체가 *U. urealyticum*이었으며 불일치한 1검체는 *U. parvum*과 *M. hominis*의 복합감염으로 동정된 경우였다. *Ureaplasma* spp.가 10^4 이하로 배양된 41검체는 모두가 PCR과 일치하였고 *U. parvum* 38검체, *U. urealyticum* 3검체였다. *M. hominis*는 1검체에서 배양되었는데 PCR 결과도 동일하였다. *U. parvum*과 *M. hominis*이 혼합되어 자란 6검체 중 5검체가 일치하였으며 1검체에서는 PCR에서 *U. parvum*만 양성이었다. 판독불가였던 1검체는 PCR에서 *M. hominis*로 동정되었다.

Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)를 통해 알아본 항생제 감수성 검사결과는 *Ureaplasma* spp.의 감수성률이 각각 clarithromycin 98.2% (56/57), erythromycin 86.0% (49/57), azithromycin 80.7% (46/57)였으며 doxycycline 94.7% (54/57), tetracycline 93.0% (53/57) 그리고 ofloxacin 47.4% (27/57), ciprofloxacin 17.5% (10/57), josamycin 96.5% (55/57), pristinamycin 100% (57/57)였다. 각각의 균과 그 농도별로 항생제 감수성을

Table 1. Antimicrobial susceptibilities (%) of *Ureaplasma* spp. and *M. hominis* by *Mycoplasma* IST2

Isolates	ERY		AZI		CLA		JOS		CIP		OFL		DOT		TET		PRI			
	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$		
Up	57.1* (8/14)	97.4* (37/38)	64.3* (9/14)	89.5* (34/38)	100 (14/14)	97.4 (37/38)	85.7 (12/14)	100 (38/38)	7.1* (1/14)	23.7* (9/38)	42.9 (6/14)	55.3 (21/38)	100 (14/14)	92.1 (35/38)	92.9 (13/14)	92.1 (35/38)	100 (14/14)	100 (38/38)	100 (14/14)	100 (38/38)
Uu	50 (1/2)	100 (3/3)	0 (0/2)	100 (3/3)	100 (2/2)	100 (3/3)	100 (2/2)	100 (3/3)	0 (0/2)	0 (0/3)	0 (0/2)	0 (0/3)	100 (2/2)	100 (3/3)	100 (2/2)	100 (3/3)	100 (2/2)	100 (3/3)	100 (3/3)	
Mixed (Up+Mh)	0 (0/6)	0 (0/6)	16.7 (1/6)	16.7 (1/6)	16.7 (1/6)	16.7 (1/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	16.7 (1/6)	16.7 (1/6)	66.7 (4/6)	66.7 (4/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)	
Mh	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)	

**P* < 0.05.

Abbreviations: ERY, erythromycin; AZI, azithromycin; CLA, clarithromycin; JOS, josamycin; CIP, ciprofloxacin; OFL, ofloxacin; DOT, doxycycline; TET, tetracycline; PRI, pristinamycin; $\geq 10^4$, titer $\geq 10^4$ CFU in the specimen; $< 10^4$, titer $< 10^4$ CFU in the specimen; Up, *U. parvum*; Uu, *U. urealyticum*; Mh, *M. hominis*.

을 살펴보면 Table 1과 같았다. Erythromycin, azithromycin, ciprofloxacin의 감수성률이 균농도 10^4 이하보다 10^4 이상에서 통계적으로 유의하게 낮았다($P=0.000$, $P=0.001$, $P=0.035$) (Table 1).

분리된 *M. hominis* 균주는 erythromycin, azithromycin, clarithromycin에는 내성을 나타냈으나 josamycin, pristinamycin, fluoroquinolones 그리고 tetracyclines에서는 감수성을 보였다.

2. *U. parvum*과 *U. urealyticum*의 Macrolide, Tetracycline과 Quinolone 내성유전자변이

마크로라이드 비감수성 균주들에 대한 염기서열분석 결과 23S rRNA domain II와 L4와 L22 ribosomal proteins에서 변이를 보인 중간내성균주의 수는 azithromycin 3균주, erythromycin 4균주였고 그 변이 종류는 *U. urealyticum*의 경우 23S rRNA domain II에서 I234V, F230L을 L22 protein에서 A132V, I152T, I136V를 보였고 *U. parvum*의 경우 L22 protein에서 A121S, I136V, T141I를 보였다. 그러나 이들 모두가 감수성 균주에서도 관찰되어 내성에는 관여하지 않는 것으로 생각되었다. 23S rRNA domain V의 염기서열분석에서는 double peaks가 보여 결과에 포함시키지 않았다(Table 2).

테트라사이클린 비감수성 균주들에 대한 *tet(M)* 유전자와 *int-Tn* PCR검사결과 tetracycline 내성균주 4검체 중 3검체, doxycycline 내성균주 3검체 중 2검체 doxycycline intermediate 균주 1검체에서 *tet(M)*유전자 또는 *int-Tn* 유전자가 발견되었으며 이 균주들 모두 *U. parvum*이면서 균농도는 10^4 이하였다 (Table 3).

퀴놀론 비감수성 균주들에 대한 *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* 유전자부위 염기서열분석 결과 ofloxacin 내성인 *U. parvum* 7균주 중 5균주, ofloxacin 중간내성인 18균주 중 2균주, cipro-

floxacin 내성인 14균주 중 7균주에서 quinolone 내성에 관여하는 S83L 아미노산 변이가 관찰되었다. Quinolone 내성 또는 중간내성인 *U. urealyticum* 5균주 중에서는 내성에 관여하는 변이가 관찰되지 않았고, serovar에 따라 다른 아미노산의 차이만을 보였다(Table 4).

DISCUSSION

상용화되어 있는 Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)를 사용하여 배양된 한국인 여성의 생식기 마이코플라즈마의 분리율은 44.0% (균농도 10^4 이상; 11.3%, 10^4 이하; 27.3%)로 매우 높게 나타났으며 이는 생식기 마이코플라즈마가 한국인 여성의 생식기 내 집락화를 이루고 있음을 보여주는 결과였고 과거에 보여준 Koh 등[17]의 연구결과와 유사하였다. 그러나, *U. parvum*과 *U. urealyticum*의 균종을 감별한 것은 이 연구가 국내에서 처음 시행된 것으로 대부분이 *U. parvum* (80.3%)으로 동정되었고 병원성이 보고된 *U. urealyticum*은 7.6%로 관찰되었다.

Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)과 PCR검사와의 균 검출의 일치율은 높았지만 *Ureaplasma* spp.의 감수성 검사결과 균의 농도에 따라 erythromycin, azithromycin, ciprofloxacin에서

Table 3. Presence of *tet(M)* or *int-Tn* from tetracycline resistant, doxycycline non-susceptible isolates of *Ureaplasma* spp.

Up <math><10^4</math> (n)	TET-R (3)	DOT-R (2)	DOT-I (1)
<i>tet(M)</i>	2	1	0
<i>int-Tn</i>	1	1	1

Abbreviations: TET, tetracycline; DOT, doxycycline; R, resistant; I, intermediate; $<10^4$, titer $<10^4$ CFU in the specimen; Up, *U. parvum*.

Table 2. Amino acid changes in 23S rRNA domain II, L4 and L22 ribosomal proteins from erythromycin intermediate, azithromycin intermediate isolates of *Ureaplasma* spp.

Amino acid related to resistance	Uu		Up	
	$\geq 10^4$	$< 10^4$	$\geq 10^4$	$< 10^4$
ERY-I	1	0	6	1
23S rRNA II	I234V, F230L (1)			
L4				
L22	A132V, I152T (1)		A121S, I136V, T141I (2)	
AZI-I	2	0	5	4
23S rRNA II	F230L (1), I234V, F230L (1)			
L4				
L22	A132V, I136V (1)		A121S, T141I (1)	
	A132V, I152T (1)			

Abbreviations: ERY, erythromycin; AZI, azithromycin; I, intermediate; $\geq 10^4$, titer $\geq 10^4$ CFU in the specimen; $< 10^4$, titer $< 10^4$ CFU in the specimen; Uu, *U. urealyticum*; Up, *U. parvum*.

Table 4. Amino acid changes in *GyrA*, *GyrB*, *ParC* and *ParE* from ofloxacin non-susceptible, ciprofloxacin non-susceptible isolates of *Ureaplasma* spp.

Genes related to resistance	Uu		Up	
	≥10 ⁴	<10 ⁴	≥10 ⁴	<10 ⁴
OFL-R	0	0	3	4
<i>gyrA</i>				
<i>gyrB</i>				
<i>parC</i>			S83L (1)	S83L (4)
<i>parE</i>			A429S (1), P446S (1)	
OFL-I	2	3	5	13
<i>gyrA</i>	D112E (2)	D112E (3)		
<i>gyrB</i>				
<i>parC</i>	A125T, A136T (2)	A125T, A136T (3)	S83L (1)	S83L (1)
<i>parE</i>				
CIP-R	2	2	6	8
<i>gyrA</i>	D112E (2)	D112E (2)		
<i>gyrB</i>				
<i>parC</i>	A125T, A136T (2)	A125T, A136T (2)	S83L (2)	S83L (5)
<i>parE</i>				
CIP-I	0	1	7	21
<i>gyrA</i>		D112E (1)		
<i>gyrB</i>				
<i>parC</i>		A125T, A136T (1)		A136S (1)
<i>parE</i>				

Abbreviations: OFL, ofloxacin; CIP, ciprofloxacin; R, resistant; I, intermediate; ≥10⁴, titer ≥10⁴ CFU in the specimen; <10⁴, titer <10⁴ CFU in the specimen; Uu, *U. urealyticum*; Up, *U. parvum*.

유의한 차이를 보여 상품화된 kit의 감수성 검사의 정확도가 inoculum의 영향을 받는 것으로 생각되었다. 하지만 균농도를 달리하여 감수성 시험을 비교하는 추가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다. 또한, 동일 계열의 약제에 대해서도 감수성률이 약제에 따라 차이가 있어서 clarithromycin 98.2%, erythromycin 86.0%, azithromycin 80.7% 순으로 높았고 퀴놀론 계열의 감수성률은 ofloxacin이 47.4%로 ciprofloxacin (17.5%)에 비해 높았다. 이러한 차이는 동일한 검사방법으로 시행한 Koh 등[17]의 연구에서도 항생제 감수성률이 clarithromycin 88.6%, erythromycin 82.9%, azithromycin 75.2% 그리고 ofloxacin 56.2%, ciprofloxacin 15.2%로 유사하였다. 터어키의 연구[18]에서는 마크로라이드와 퀴놀론계열 모두 clarithromycin 88.9%, erythromycin 59.3%, azithromycin 55.6% 그리고 ofloxacin 11.1%, ciprofloxacin 7.4%로 더 낮은 감수성률을 보였고, 중국에서의 연구[19]와는 마크로라이드 계열은 유사하였으나 퀴놀론 계열은 ofloxacin 22.1%, ciprofloxacin 5.8%로 더 낮은 감수성률을 보였다. 이태리의 연구[20]와는 clarithromycin 79.5%, erythromycin 69.1%, azithromycin 73.7% 그리고 ofloxacin 38.7%, ciprofloxacin 11.7%로 비교적 유사하였지만, 스위스의 연구 [21]에서는 퀴놀론 계열이 ofloxacin 90.3%, ciprofloxacin 80.6%로 감수성률이 높았다.

Kit를 이용하여 살펴본 표현형으로 나타난 내성양상과 염기 서열분석을 통하여 항생제 내성 유전자변이검사로 본 유전자형 내성 양상과의 상호연관성을 살펴본 결과, 마크로라이드 비감수성균주에서 관찰된 23S rRNA domain II와 L4와 L22 ribosomal protein에서 보이는 모든 아미노산 변이가 마크로라이드 감수성균주에서도 보여 항균제내성과의 연관성은 없는 것으로 생각되었다. 테트라사이클린 내성균주에서는 75% (3/4)에서 내성유전자 *tet(M)*과 *int-Tn*을 가지고 있었다. 퀴놀론 내성 *U. urealyticum*균주에서는 *gyrA* D112E, *parC* A125T, A136T가 관찰되었으나 이들 변이는 serovar에 따른 아미노산의 차이로 보고된 바 있는 변이여서[22] 내성과의 연관성은 없는 것으로 생각되었다. 이에 비해 퀴놀론 내성 *U. parvum*에서는 *parC* 내성 유전자변이로 알려진 S83L 아미노산 변이가 ofloxacin 내성균주에서는 7검체 중 5균주(71.4%)에서 ciprofloxacin 내성균주에서는 14검체 중 7균주(50.0%)에서 관찰되었으며, 10⁴ 이하이면서 내성을 보인 경우에 내성관련 유전자변이가 있는 비율이 더 높은 경향을 보였다. Schneider 등[21]의 연구에서는 *Mycoplasma* IST2 kit (bioMérieux) 결과 ciprofloxacin 비감수성균주 13균주 중 2균주만이 CLSI 지침에 따른 미세농도희석법으로 시험했을 때 비감수성이었으며, 내성에 관여하는 유전자변이도 1균주에서만 관찰되었다. 따라서, *Mycoplasma* IST2 kit (bioMérieux)를

이용한 quinolone 감수성 결과의 정확도에 대해서는 향후 더 많은 검체로 연구가 필요하다. 또한, 2군주에서는 *parE* A429S, P446S 아미노산 변이가 관찰되었는데, 이는 serovar에 따른 차이는 아니어서 이 변이의 의미에 대해서는 추후 연구가 필요하다.

결론적으로 Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)를 이용한 생식기 마이코플라즈마 양성률은 과거 2009년 진주에서 시행한 결과와 유사한 결과를 보였고[17] kit와 PCR검사 간의 일치율도 높게 나타났다. *Ureaplasma* spp.가 배양되는 검체 중 대다수(80.3%)가 *U. parvum*이어서 *U. urealyticum*과 *U. parvum*을 감별하여 보고하는 것이 필요하며, 두 가지 군종이 분리되는 환자들의 임상 양상의 차이에 대한 연구가 필요하다. 또한, *Ureaplasma* 군종의 10% 이상에서 erythromycin과 azithromycin에 비감수성(15.5%, 20.7%)을 보이므로 이 약제들을 사용하기 전 감수성 검사가 필요할 것으로 생각된다. 염기서열분석을 통한 유전자변이와 배양법에 기반한 항균제 내성과의 일치도는 비교적 낮았으나, 본 연구에서는 CLSI guideline에 따른 감수성 시험 결과가 아닌 점과 efflux pump를 비롯한 다양한 내성기전에 대한 유전학적 검사는 시행하지 못한 제한점이 있다. 추후 *ureaplasma*의 항생제 내성에 대한 지속적인 관심과 연구가 필요할 것으로 보인다.

ACKNOWLEDGMENTS

본 연구는 2014년도 대한임상미생물학회의 연구비 지원을 받아 수행되었음.

REFERENCES

1. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:757-89.
2. Xiao L, Paralanov V, Glass JI, Duffy LB, Robertson JA, Cassell GH, et al. Extensive horizontal gene transfer in ureaplasmas from humans questions the utility of serotyping for diagnostic purposes. *J Clin Microbiol* 2011;49:2818-26.
3. Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010. doi: 10.1155/2010/521921.
4. Redelinghuys MJ, Ehlers MM, Dreyer AW, Lombaard HA, Kock MM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *BMC Infect Dis* 2014;14:171.
5. Choi SJ, Park SD, Jang IH, Uh Y, Lee A. The prevalence of vaginal microorganisms in pregnant women with preterm labor and preterm birth. *Ann Lab Med* 2012;32:194-200.
6. Martínez MA, Ovalle A, Santa-Cruz A, Barrera B, Vidal R, Aguirre R. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma parvum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 1) and *Ureaplasma urealyticum* (*Ureaplasma urealyticum* biovar 2) from patients with adverse pregnancy outcomes and normal pregnant women. *Scand J Infect Dis* 2001;33:604-10.
7. De Francesco MA, Negrini R, Pinsi G, Peroni L, Manca N. Detection of *Ureaplasma* biovars and polymerase chain reaction-based subtyping of *Ureaplasma parvum* in women with or without symptoms of genital infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:641-6.
8. Kong F, Ma Z, James G, Gordon S, Gilbert GL. Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays. *J Clin Microbiol* 2000;38:1175-9.
9. CLSI. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; approved guideline. CLSI Document M43-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
10. Beeton ML, Chalker VJ, Maxwell NC, Kotecha S, Spiller OB. Concurrent titration and determination of antibiotic resistance in *Ureaplasma* species with identification of novel point mutations in genes associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2020-7.
11. Xiao L, Crabb DM, Duffy LB, Paralanov V, Glass JI, Hamilos DL, et al. Mutations in ribosomal proteins and ribosomal RNA confer macrolide resistance in human *Ureaplasma* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:377-9.
12. Blanchard A, Crabb DM, Dybvig K, Duffy LB, Cassell GH. Rapid detection of *tetM* in *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by PCR: *tetM* confers resistance to tetracycline but not necessarily to doxycycline. *FEMS Microbiol Lett* 1992;74:277-81.
13. Xiao L, Crabb DM, Duffy LB, Paralanov V, Glass JI, Waites KB. Chromosomal mutations responsible for fluoroquinolone resistance in *Ureaplasma* species in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2780-3.
14. 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.
15. Pereyre S, Métifiot M, Cazanave C, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, et al. Characterisation of in vitro-selected mutants of *Ureaplasma parvum* resistant to macrolides and related antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 2007;29:207-11.
16. Mardassi BB, Aissani N, Moalla I, Dhahri D, Dridi A, Mlik B. Evidence for the predominance of a single *tet(M)* gene sequence type in tetracycline-resistant *Ureaplasma parvum* and *Mycoplasma hominis* isolates from Tunisian patients. *J Med Microbiol* 2012; 61:1254-61.
17. Koh E, Kim SJ, Kim IS, Maeng KY, Lee SA. Antimicrobial susceptibilities of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *Korean J Clin Microbiol* 2009;12:159-62.
18. Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *Int J Infect Dis* 2010;14:e90-5.
19. Wang QY, Li RH, Zheng LQ, Shang XH. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female outpatients, 2009-2013. *J Microbiol Immunol Infect* 2014. [Epub ahead of print]
20. Pignanelli S, Pulcrano G, Iula VD, Zaccherini P, Testa A, Catania MR. In vitro antimicrobial profile of *Ureaplasma urealyticum* from genital tract of childbearing-aged women in Northern and Southern Italy. *APMIS* 2014;122:552-5.
21. Schneider SC, Tinguely R, Droz S, Hilty M, Donà V, Bodmer T, et al. Antibiotic susceptibility and sequence type distribution of *Ureaplasma* species isolated from genital samples in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:6026-31.
22. Beeton ML, Chalker VJ, Kotecha S, Spiller OB. Comparison of

full *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from

non-resistance polymorphism. J Antimicrob Chemother 2009;64: 529-38.

=국문초록=

한국인 가임기여성에서 *Ureaplasma Species*의 빈도와 항생제감수성: 유전자 변이와의 일치

가톨릭대학교 의과대학 ¹진단검사의학교실, ²산부인과학교실

장지영¹, 유진경¹, 송창은¹, 박인양², 박연준¹

배경: Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux, France)로 검출된 생식기 mycoplasma 중 *Ureaplasma urealyticum*은 7.6% 관찰된 반면 대부분이 *Ureaplasma parvum*으로 동정되었다(80.3%). *U. parvum*과 *U. urealyticum*을 감별한 것은 본 연구가 처음으로 저자들은 한국인 여성의 ureaplasma 분리율과 항생제 내성을 알아보고자 하였다.

방법: 2014년 10월에서 11월까지 서울성모병원에서 Mycoplasma IST2 kit (bioMérieux)를 사용하여 배양된 150검체를 대상으로 하였다. Mycoplasma IST2 kit로 배양과 항균제 감수성검사를 하였고 *Ureaplasma* spp. 동정을 위하여 PCR 검사를, 내성유전자변이를 보기 위하여 PCR과 sequencing을 시행하였다.

결과: 생식기 mycoplasma의 양성률은 44.0% (66/150)였고 그 중 53 (80.4%) 검체가 *U. parvum*으로 동정되었으며 5 (7.6%) 검체는 *U. urealyticum*, 2 (3.0%) 검체는 *Mycoplasma hominis*, 6 (9.0%) 검체는 복합감염을 보였다. *Ureaplasma* spp.에 대한 항균제감수성률은 erythromycin, azithromycin, clarithromycin과 doxycycline에서 각각 86.0%, 80.7%, 98.2%, 94.7%였고 ofloxacin, ciprofloxacin에서는 각각 47.4%, 17.5%였다. Ofloxacin 내성 균주와(5/7, 71.4%), ciprofloxacin 내성 균주에서 (7/14, 50.0%) *ParC* 부위의 S83L 아미노산변이가 각각 관찰되었다. 한 균주의 *M. hominis*는 erythromycin, azithromycin, clarithromycin에는 내성을, josamycin, pristinamycin, quinolone, tetracycline에는 감수성을 각각 보였다.

결론: 한국인 여성의 생식기 mycoplasma의 분리율은 44.0%였고 대부분은 *U. parvum*이었다. *Ureaplasma* spp.의 erythromycin과 azithromycin의 비감수성률이 10% 이상 보이므로(15.5%, 20.7%) 이들 약제를 사용하기 전 항균제감수성검사가 필요할 수 있다. *U. urealyticum*과 *U. parvum* 감염으로 인한 임상적 양상차이와 내성기전에 대한 추후 연구가 필요하겠다.

[Ann Clin Microbiol 2016;19:13-19]

교신저자 : 박연준, 06591, 서울시 서초구 반포대로 222
가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과
Tel: 02-2258-1640, Fax: 02-2258-1719
E-mail: yjpk@catholic.ac.kr