

Comparative Evaluation of Multiplex Real-Time PCR Assays for Six Pathogens of Sexually Transmitted Infections

Hae-Sun Chung, Miae Lee

Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: The multiplex real-time PCR assay is a sensitive test for simultaneous detection of various pathogens of sexually transmitted infections (STIs). We evaluated the performance of two multiplex real-time PCR assays for six STI pathogens.

Methods: DNA samples after being used to conduct PCR for STI pathogens were stored below -70°C . *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), and *Trichomonas vaginalis* (TV) were detected by multiplex real-time PCR with GeneFinder STD I (CT/NG/UU)/II (MG/MH/TV) Multiplex Real-time PCR Kits (Infopia, Korea; GeneFinder assay) and Real-Q CT&NG/MH&TV/MG&UU Kits (BioSewoom, Korea; Real-Q assay). Discrepant results were resolved by another multiplex real-time assay, Anyplex II STI-7 Detection (Seegene, Korea). Any two positive results for the assays were considered true positive.

Results: Among 81 samples, the GeneFinder assay detected 63 pathogens from 45 cases (16 CT, 2 NG, 6 MG, 20 MH, 18 UU, and 1 TV) and Real-Q assay detected 66 pathogens from 47 cases (16 CT, 2 NG, 8 MG, 20 MH, 19 UU, and 1 TV). For the results of positive cases and negative cases, the overall concordance rate between the two multiplex real-time assays was 93.8% (Kappa=0.87). For each pathogen, the agreement rates of the two assays ranged from 97.5 to 100% (Kappa>0.8).

Conclusion: There was no significant difference between the results of GeneFinder assay and Real-Q assay. Both multiplex real-time PCR assays can be useful methods for the detection of STI pathogens in clinical laboratories. (Ann Clin Microbiol 2017;20:1-6)

Key Words: Multiplex real-time polymerase chain reaction, Sexually transmitted infection

INTRODUCTION

성매개감염(sexually transmitted infection, STI)은 흔한 감염성 질환으로, 사람과 사람 사이에 성접촉을 통해 전파되는 감염을 말한다. 성매개감염은 심각한 이환율과 합병증 및 후유증을 유발할 수 있으며, 임신 및 출산에도 영향을 주어 태아와 신생아 건강에도 영향을 미치기 때문에 정확한 진단과 적절한 치료가 매우 중요하다[1-5].

성매개감염은 원인 병원체가 세균, 바이러스, 원충, 진균 등으로 다양하며, 주요 원인 세균으로는 *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU) 등이 있고, 원충인 *Trichomonas vaginalis* (TV)도 흔한 원인 병원체이다. 원인 병원체 또는 질환별로 다양한 진단법이

존재하는데, 통상적인 배양이나 혈청학적 검사 등 기존 방법으로는 검사가 어려운 병원체들이 많아, 최근에는 분자생물학적 진단법으로 검출하는 방법이 추천되고 있다. 분자생물학적 진단법 중 주로 쓰이는 것은 핵산증폭검사로, *Chlamydia* 등의 병원체에 있어서 표준진단법으로 이용되고 있으며, 검체의 운반과 배양 조건이 나쁜 상황에서 유용하게 쓰일 수 있다. 또한, 성매개감염은 증상과 임상 양상이 비슷하고 중복감염도 가능하므로, 다양한 병원체를 한번에 검사하기 위해서 한 검체에서 여러 표적 DNA를 검출하는 다중 중합효소연쇄반응(multiplex PCR) 방법이 비용과 시간을 절약할 수 있다[2-6].

실시간중합효소연쇄반응(real-time PCR)은 중합효소연쇄반응 이후 전기영동 또는 부합 반응과 같은 추가 과정 없이 결과 분석이 가능하므로, 기존 중합효소연쇄반응보다 증폭산물에 의한 오염 가능성이 개선되고 검사소요시간도 단축되는 장점

Received 16 November, 2016, Revised 27 February, 2017, Accepted 28 February, 2017

Correspondence: Miae Lee, Department of Laboratory Medicine, Ewha Womans University College of Medicine, 1071 Anyangcheon-ro, Yangcheon-gu, Seoul 07985, Korea. (Tel) 82-2-2650-5222, (Fax) 82-2-2650-5091, (E-mail) miae@ewha.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.

이 있다. 또한 한 쌍의 시발체와 소식자가 함께 사용되어 비특이적 반응이 감소되고 특이도를 향상시킬 수 있다. 중합효소연쇄반응은 한천에 전기영동하여 결과를 판독하는데, 약양성의 경우 양성 또는 음성에 대한 객관적인 판독이 어려운 점이 있으며, 이런 문제점은 특히 증폭산물의 크기가 작은 경우에 심각하다. 반면, 실시간중합효소연쇄반응은 증폭곡선과 threshold cycle (Ct) 값을 객관적인 지표로 활용하여 판독하므로 판독 과정에 있어 주관적인 판단을 배제할 수 있다[7]. 따라서 다중 실시간중합효소연쇄반응(multiplex real-time PCR) 방법은 성매개감염의 여러 원인 병원체들을 동시에 검출할 수 있는 민감하고 비용 효과적인 검사법이라고 할 수 있다.

성매개감염에 대한 실시간중합효소연쇄반응과 기존 중합효소연쇄반응과의 비교 연구에서 실시간중합효소연쇄반응이 기존의 검사 방법들보다 동일하거나 더 나은 효능을 보여주었다[8,9]. 하지만 다수의 원인 병원체들에 대한 다중 실시간중합효소연쇄반응 검사법 간의 비교 평가 자료는 많지 않다.

본 연구에서는 다중 실시간중합효소연쇄반응을 이용하여 6종의 성매개감염 원인 병원체를 한 검체에서 검출하는 GeneFinder STD I (CT/NG/UU)/II (MG/MH/TV) Multiplex Real-time PCR (Infopia, Anyang, Korea; GeneFinder assay)과 Real-Q CT&NG/MH&TV/MG&UU (BioSewoom, Seoul, Korea; Real-Q assay)를 비교평가하여 임상 검사실에서의 유용성을 살펴 보았다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상 및 핵산 추출

2015년 2월부터 2016년 2월까지 서울의 한 병원 진단검사의학과 검사실로 성매개감염 원인병원체 PCR 검사가 의뢰되었던 검체를 대상으로 하였다. DNA 추출은 상품화된 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하였다. 추출한 DNA로 의뢰된 검사를 시행 후 잔여 DNA 검체를 평가를 위한 검사 전까지 -70°C 에 냉동하였다.

2. GeneFinder assay

GeneFinder assay는 STD I과 STD II 시약 각각을 한 튜브에서 검사하여 검체당 총 2개의 튜브를 사용한다. STD I은 CT, NG, UU를, STD II는 MG, MH, TV를 검출한다. PCR 반응 혼합물을 준비한 후 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA; AB7500)을 이용하여 50°C 2분, 95°C 10분, 95°C 15초/ 60°C 60초를 40회 반복하는 조건으로 반응시켰다. 검체 결과 해석은 표적의 Ct값이 40 미만인 경우는 양성으로, 표적의 Ct값이 40 이상이거나, 표적이 증폭되지 않고 내부대조물질(internal control, IC)의 Ct값이 40 이하인 경우는 음성으로 판정하였다. 시약 내에 포함된 음성 대조가 증폭되지 않고 양성 대조의 Ct값

이 모두 허용범위 이내임을 확인하고 결과를 해석하였다.

3. Real-Q assay

Real-Q assay는 CT&NG, MH&TV, MG&UU 시약 각각을 한 튜브에서 검사하여 검체 당 총 3개의 튜브를 사용한다. PCR 반응 혼합물을 준비한 후 AB7500을 이용하여 50°C 2분, 95°C 10분, 95°C 15초/ 60°C 45초를 45회 반복하는 조건으로 반응시켰다. 검체 결과 해석은 표적의 Ct값이 38 미만인 경우는 양성으로, 표적의 Ct값이 38 이상이거나, 표적이 증폭되지 않고 IC의 Ct값이 38 이하인 경우는 음성으로 판정하였다. 시약 내에 포함된 음성 대조가 증폭되지 않고 양성 대조의 Ct값이 모두 허용범위 이내임을 확인하고 결과를 해석하였다.

4. 결과 분석 및 통계 처리

두 검사법의 결과가 일치할 경우 진양성(true positive) 또는 진음성(true negative)으로 판단하였다. 두 검사법의 결과가 불일치할 경우, 다중 실시간중합효소연쇄반응을 이용하여 성매개감염 원인 병원체를 검출하는 제3의 시약인 Anyplex II STI-7 Detection (Seegene, Seoul, Korea; Anyplex assay)으로 검사하여, 두 개 이상의 검사법에서 양성인 결과를 진양성으로 판단하였다.

각 병원체별로 두 검사법의 일치율을 구하고, Kappa 통계량을 구하였다. 양성 일치율과 음성 일치율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{양성 일치율} = \frac{2 \times \text{양성 일치 개수}}{\text{전체 개수} + \text{양성 일치 개수} - \text{음성 일치 개수}}$$

$$\text{음성 일치율} = \frac{2 \times \text{음성 일치 개수}}{\text{전체 개수} - \text{양성 일치 개수} + \text{음성 일치 개수}}$$

두 검사법의 병원체 검출 성능 비교를 위해 McNemar 카이제곱분석을 시행하였다. 통계 분석은 MedCalc Version 10.0 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium)을 이용하여 시행하였다. P값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 의미가 있는 것으로 해석하였다.

RESULTS

총 81검체에 대해 검사를 시행하였다. GeneFinder assay에서는 45개의 검체에서 총 63개의 병원체(CT 16주, NG 2주, MG 6주, MH 20주, UU 18주, TV 1주)가 검출되었고, Real-Q assay에서는 47개의 검체에서 총 66개의 병원체(CT 16주, NG 2주, MG 8주, MH 20주, UU 19주, TV 1주)가 검출되었다. 수집된 검체 중 중복 검출 검체는 양성 검체 48개 중 16개였다. 단독 양성과 2개 이상 양성을 구분했을 때 각 병원체의 검출 양상은

Table 1과 같다.

중복 검출 중 MH와 UU 2중 양성인 4 검체, CT와 MH 2중 양성인 3 검체, CT와 MG, CT와 UU 2중 양성인 각각 2 검체가 있었다. CT와 NG의 2중 양성인 1 검체였다. 3중 양성인 3 검체에서 있었다(CT, MG, MH; CT, MH, UU; NG, MH, UU).

양성 검체(병원체 모두 보고)와 음성 검체 결과를 정확하게 보고하는 것에 대한 두 검사의 일치율은 93.8%였다(Kappa=0.87). 두 검사법의 검출 성능의 차이는 유의하지 않았다($P=0.37$) (Table 2).

각 병원체별 일치율은 97.5-100%였다(Kappa>0.8). CT 16주, NG 2주, TV 1주의 결과는 모두 일치하였다. 불일치한 결과가 있었던 MG, MH, UU에 대한 두 검사의 검출 성능의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($P\geq 0.5$) (Table 3).

두 검사에서 불일치했던 검체에 대해 Anyplex assay로 확인한 결과, 모두 진양성으로 판정되었다. 불일치했던 병원체의 Ct 값은 각 병원체의 양성 검체 Ct 값 중에서 가장 높은 값들이었고, 대부분 Anyplex assay에서의 반응강도(intensity)가 낮은 편이었다(Table 4).

DISCUSSION

성매개감염에 대한 검사실 진단 검사는 증상이 있는 환자에서 정확한 원인 병원체를 진단하는 데 필수적이다. 또한, 특히 임신부를 포함한 성적으로 활동적인 여성에서의 CT와 NG를 비롯한 성매개감염 검진은, 합병증을 억제하고 성매개감염을 예방하는 데 효과적이므로, 선별검사를 시행하는 것이 권고되고 있다[10]. 따라서, 성매개감염의 진단 검사는 정확하고 효율적으로 진행되어야 한다. 이를 위해 최근 다양한 병원체를 한번에 민감하게 검출할 수 있는 다중 실시간중합효소연쇄반응 검사법이 유용하게 쓰이고 있으며, 최근 GeneFinder assay와 Real-Q assay 등의 검사가 국내 검사실에 도입되었다.

본 연구 결과 두 검사법은 우수한 일치율을 보여주었으며, 성매개감염 병원체 검출 성능에 유의한 차이는 발견되지 않았다. 일부 두 검사에서 불일치했던 병원체들의 Ct 값이 모두 양성 검체 중 가장 높은 값을 보였던 것으로 보아, 검체 내 낮은 농도로 존재하였던 것으로 추정할 수 있다. 판정기준치(cutoff) 근처의 농도에서는 양성/음성 결과가 같은 검사법 내에서도 다

Table 1. Results of detection of single and multiple pathogens by GeneFinder and Real-Q assays

Pathogen	Single pathogen			Multiple pathogens					
				2 pathogens			3 pathogens		
	True positive	GeneFinder	Real-Q	True positive	GeneFinder	Real-Q	True positive	GeneFinder	Real-Q
<i>Chlamydia trachomatis</i>	6	6	6	8	8	8	2	2	2
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	1
<i>Mycoplasma genitalium</i>	5	3	5	2	2	2	1	1	1
<i>Mycoplasma hominis</i>	11	10	10	7	7	7	3	3	3
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	10	10	10	7	7	7	2	1	2
<i>Trichomonas vaginalis</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0
Sum	32	29	31	26	26	26	9	8	9
(No. of cases)	(32)	(29)	(31)	(13)	(13)	(13)	(3)	(2)	(3)

Abbreviations: GeneFinder, GeneFinder STD I (CT/NG/UU)/II (MG/MH/TV) Multiplex Real-time PCR; Real-Q, Real-Q CT&NG/MH&TV/MG&UU.

Table 2. Overall agreement between GeneFinder and Real-Q assays

Assays		Real-Q			Kappa	Agreement rate (%)	P_{pos}^* (%)	P_{neg}^* (%)	P value [†]
		Positive cases	Negative cases	Sum					
GeneFinder	Positive cases	43	1	44	0.87	93.8	94.5	93.0	0.37
	Negative cases	4 [‡]	33	37					
	Sum	47	34	81					

*Proportion of positive agreement (P_{pos}), calculated as twice the number of agreed positive cases/(total number of cases+number of agreed positive cases-number of agreed negative cases); and proportion of negative agreement (P_{neg}), calculated as twice the number of agreed negative cases/(total number of cases+number of agreed positive cases-number of agreed negative cases). [†]by McNemar test. [‡]Number of cases of GeneFinder negative and Real-Q positive included one mixed infection case; one of three pathogens was missed.

Abbreviations: GeneFinder, GeneFinder STD I (CT/NG/UU)/II (MG/MH/TV) Multiplex Real-time PCR; Real-Q, Real-Q CT&NG/MH&TV/MG&UU.

Table 3. Comparison of the results of GeneFinder and Real-Q assays according to the pathogens

Pathogen	Assays	Results	Real-Q			Kappa	Agreement rate (%)	P_{pos}^* (%)	P_{neg}^* (%)	P value [†]
			Positive	Negative	Sum					
<i>Chlamydia trachomatis</i>	GeneFinder	Positive	16	0	16	1.00	100	100	100	
		Negative	0	65	65					
		Sum	16	65	81					
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GeneFinder	Positive	2	0	2	1.00	100	100	100	
		Negative	0	79	79					
		Sum	2	79	81					
<i>Mycoplasma genitalium</i>	GeneFinder	Positive	6	0	6	0.84	97.5	85.7	98.6	0.50
		Negative	2	73	75					
		Sum	8	73	81					
<i>Mycoplasma hominis</i>	GeneFinder	Positive	20	1	21	0.94	97.5	95.2	98.3	1.00
		Negative	1	59	60					
		Sum	21	60	81					
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	GeneFinder	Positive	18	0	18	0.96	98.8	97.3	99.2	1.00
		Negative	1	62	63					
		Sum	19	62	81					
<i>Trichomonas vaginalis</i>	GeneFinder	Positive	1	0	1	1.00	100	100	100	
		Negative	0	80	80					
		Sum	1	80	81					

*Proportion of positive agreement (P_{pos}), calculated as twice the number of agreed positives/(total number of specimens+number of agreed positives-number of agreed negatives); and proportion of negative agreement (P_{neg}), calculated as twice the number of agreed negatives/(total number of specimens+number of agreed positives-number of agreed negatives). [†] P values were calculated by McNemar test for pathogens with discrepant results.

Abbreviations: GeneFinder, GeneFinder STD I (CT/NG/UU)/II (MG/MH/TV) Multiplex Real-time PCR; Real-Q, Real-Q CT&NG/MH&TV/MG&UU.

Table 4. Interpretation of discrepant results

Pathogen	Anyplex		Real-Q			GeneFinder		
	Results	Intensity	Results	Ct*	Interpretation	Results	Ct [†]	Interpretation
<i>Mycoplasma genitalium</i>	P	++	P	34.62	True positive	N	No Ct	False negative
	P	+	P	35.99	True positive	N	No Ct	False negative
<i>Mycoplasma hominis</i>	P	+	P	36.43	True positive	N	No Ct	False negative
	P	+	N	No Ct	False negative	P	37.50	True positive
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	P	+	P	36.94	True positive	N	No Ct	False negative

*Ct ranges for positive specimens of *M. genitalium*, *M. hominis*, and *U. urealyticum* were 23.09-35.99 (median 29.23), 19.70-36.43 (median 26.67), and 23.82-36.94 (median 32.49) by Real-Q assay. [†]Ct range for positive specimens of *M. hominis* was 20.64-37.50 (median 27.35) by GeneFinder assay.

Abbreviations: Anyplex, Anyplex II STI-7 Detection; GeneFinder, GeneFinder STD I (CT/NG/UU)/II (MG/MH/TV) Multiplex Real-time PCR; Real-Q, Real-Q CT&NG/MH&TV/MG&UU.

르게 나올 수 있다. 민감도의 차이도 영향을 미치는데, MG의 경우 GeneFinder assay는 제조사의 설명서에 분석적 민감도를 10 copies/ μ L로 제시한 반면, Real-Q assay의 probit analysis 분석 결과에 의한 최소검출한계를 28 copies/ μ L로 제시하고 있어, GeneFinder assay보다 높다. 하지만 각 제조사에서 분석적 민감도와 최소검출한계를 구한 방법에 차이가 있어 두 수치를 단순히 비교하는 것은 적절하지 않으며, 제조사에서 제시하

는 분석적 민감도 또는 최소검출한계를 검사실에서 검증 (verification)해서 확인하는 것이 필요하다. 본 연구의 결과에서는 2개의 MG이 Real-Q assay에서는 검출된 반면, GeneFinder assay로는 검출되지 않았다. 그 중 한 검체는 Anyplex assay에서 반응강도가 ‘+ (Ct값 범위 40-50)’로 매우 낮은 농도로 있었을 것으로 추정할 수 있었다. 한편, 검사법 간 차이가 있을 때, 검사자의 오류나 검사법에 따라 검출이 어려운 특정 유전적 변

이주의 가능성도 고려해야 한다.

UU는 성매개감염의 원인균이지만, 상재균으로 분자진단 검사에서 흔히 검출되는 것으로 알려져 있어 판단에 주의를 요한다[11]. 연구자 소속 병원 검사실에서 기존에 사용한 다중 중합효소연쇄반응에서 UU는 PCR 증폭산물의 크기가 130 bp였으며, 한천에 전기영동한 결과가 육안으로 양성 여부를 판정하기에 어려운 약한 강도의 밴드(band)를 보이는 경우가 다수 있어 판독에 어려움이 많았다. 그에 비해, 본 연구에서 평가한 다중 실시간 중합효소연쇄반응 검사법들은 객관적인 Ct값을 제시해주어 판독이 용이하였다. 흥미로운 점은, 다중 실시간 중합효소연쇄반응 검사법으로 양성인 나온 UU의 Ct값들이 두 검사법에서 모두 다른 병원체들(CT, MH)의 Ct값에 비해 유의하게 높았다(data not shown). 즉, UU이 양성인 경우, 낮은 농도로 존재하는 경우가 많은 것을 알 수 있었다. 한편, 의뢰기관별, 환자군별 UU의 양성률을 비교 분석하는 연구가 UU의 임상적 의의를 파악하는 데 도움이 될 것이다.

*Ureaplasma species*는 UU (formerly known as *U. urealyticum* biovar 2)와 *U. parvum* (formerly known as *U. urealyticum* biovar 1)으로 세분할 수 있다. *U. parvum*은 성매개감염에서 어떤 역할을 하는지 아직 명확하지 않고 상재균으로 있는 경우도 많으며, CT와 같이 검출되는 경우가 많은 것으로 보고된 바 있다[12]. 최근 UU와 *U. parvum*을 구분하여 검출할 필요성도 대두되고 있다[8]. 본 연구에서 평가한 두 검사법은 모두 UU를 검출하도록 설계되었으며, *U. parvum*을 검출할 수는 없다.

MH의 경우도 *U. parvum*과 유사하게 성매개감염의 원인균으로서의 증거가 부족한 상황으로 상재균으로 있는 것으로 간주되기도 한다[11]. 본 연구에서 검사하였던 검체 중 UU와 MH의 중복 검출 건수가 3중 양성 2건을 포함하여 6건으로 중복 검출의 양상 중 가장 흔한 것으로 나타났는데, 본 연구는 임상 정보를 배제한 잔여 DNA 검체를 이용하였으므로, 임상적으로 의미 있는 병원균인지는 확인할 수 없었다. 실제 임상 상황에서는 UU와 MH가 양성인 경우, 임상 증상과 치료의 필요성과 효과 등을 고려하여 치료 여부를 결정해야 하겠다.

기존의 국내 보고에 따르면, 검체 종류와 환자군에 따라 다소 차이가 있었지만, 중복감염이 전체 감염의 20-40%에 이르는 것으로 나타났다[8,13]. 본 연구의 연구기간 동안 연구자 소속 병원 검사실의 중복 양성은 전체 양성률의 약 30%로 알려진 비율과 크게 다르지 않았다(data not shown). 본 연구에서 중복 양성 검체는 전체 양성 검체 중 1/3 (16/48)이었다. 다중 중합효소연쇄반응(multiplex PCR) 검사법은 중복감염을 한 번에 검출할 수 있다는 장점이 있어 성매개감염의 진단에 유용하게 이용되고 있다. 하지만, 다중 중합효소연쇄반응 검사법은 한 개의 표적을 증폭하는 단일 중합효소연쇄반응(singleplex PCR)에 비해, 시발제 간 간섭현상 및 증폭 저해 현상으로 증폭 효율이 저하되거나 비특이적 증폭 산물이 형성되는 등의 문제점이 초창

기 다중 중합효소연쇄반응 검사법들에서 제기된 바 있다[14-16]. 본 연구에서 평가한 두 검사법은 2개와 3개의 튜브를 사용하여 1개의 튜브에서 각각 3개와 2개의 병원체를 검출하여 총 6종의 병원체를 검출하는 다중 중합효소연쇄반응 검사법을 택하고 있다. 따라서, 실제 하나의 튜브에서 중복 양성이 검출된 검체는 양성 16 검체 중 6 검체였다(data not shown). 각 튜브의 반응을 종합적으로 하나의 검사 결과로 생각했을 때, 두 검사법 모두 대부분의 2중 이상 양성 검체에서 정확하게 각각의 병원체가 검출되어, 중복 양성을 검출하는 데 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

본 평가에서는 NG와 TV의 양성 균주 수가 매우 적어 정확한 성능을 평가하기에는 한계가 있었다. 본 연구의 연구기간 동안 연구자 소속 병원 검사실의 NG와 TV 양성률은 각각 1.5%, 0.9%로 매우 드물어, 양성 검체를 확보하는 데 어려움이 있었기 때문이다. 두 검사법 비교 시 양성 균주 수가 적게 포함되었을 때 일치율과 Kappa 통계량이 높게 나오는 문제점이 있다. 추후 두 병원체에 대해서는 좀 더 많은 수의 양성 검체를 포함하여 평가를 진행할 필요가 있겠다. 또한, 본 연구에서 검체의 임상 정보와 배양 등 다른 미생물 검사 결과를 포함하지 않은 점도 중요한 제한점이다. 추후 미생물 검사결과와 임상 정보를 종합적으로 검토하는 비교 평가를 하여 두 검사법의 임상적 의의를 밝히는 연구가 필요하겠다.

본 연구에서는 6종의 성매개감염의 원인 병원체를 검출하는 다중 실시간중합효소연쇄반응 검사법인 GeneFinder assay와 Real-Q assay를 비교평가하였다. 결론적으로, 두 검사법 간에 유의한 차이를 발견할 수 없었으며, 두 다중 실시간중합효소연쇄반응검사법 모두 임상검사실에서 성매개감염의 병원체를 검출하는 데 유용하게 쓰일 것으로 기대한다.

REFERENCES

1. WHO. Guidelines for the management of sexually transmitted infections. Geneva; World Health Organization, 2003:1-5.
2. Korea Centers for Disease Control and Prevention and Korean Association of Urogenital Tract Infection and Inflammation, ed. Sexually Transmitted Infections Korean Guidelines. Cheongju and Seoul; Korea Centers for Disease Control and Prevention and Korean Association of Urogenital Tract Infection and Inflammation, 2011:3-41.
3. Workowski KA and Bolan GA; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. MMWR Recomm Rep 2015;64:1-137.
4. Hong SG. Genital infections. In: Korean Society of Infectious Diseases, ed. Infectious Diseases. 2nd ed. Seoul; KoonJa Publishing Inc., 2014:239-53.
5. Lee SJ, Lee HJ, et al. Sexually transmitted infections. In: Korean Association of Urogenital Tract Infection and Inflammation, ed. Urogenital Tract Infection and Inflammation. Seoul; Ilchokak Publishing Co., Ltd., 2013:254-358.
6. Trembizki E, Costa AM, Tabrizi SN, Whitley DM, Twin J.

- Opportunities and pitfalls of molecular testing for detecting sexually transmitted pathogens. Pathology 2015;47:219-26.
7. Koo SH, Park KU, et al. Microbiological test methods. In: Korean Society for Laboratory Medicine, ed. Laboratory Medicine. 5th ed, Seoul; Panmun Education, 2014:517-36.
 8. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, et al. Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. Int J Infect Dis 2013;17: e1134-40.
 9. Kim Y, Kim J, Lee KA. Analytical performance of multiplex real-time PCR for six sexually transmitted pathogens. Clin Lab 2015;61:1749-54.
 10. LeFevre ML; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for Chlamydia and gonorrhea: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med 2014;161:902-10.
 11. Lim DH, Lee SJ, Shim BS, Kim CS, Kim ME, Cho YH. The new Korean guideline for sexually transmitted infections. Korean J Korean J Urogenit Tract Infect Inflamm 2011;6:96-113.
 12. Wei HB, Zou SX, Yang XL, Yang DQ, Chen XD. Development of multiplex real-time quantitative PCR for simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma parvum*. Clin Biochem 2012;45:663-7.
 13. Kim Y, Kim J, Lee KA. Prevalence of sexually transmitted infections among healthy Korean women: implications of multiplex PCR pathogen detection on antibiotic therapy. J Infect Chemother 2014;20:74-6.
 14. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J Clin Lab Anal 2002;16: 47-51.
 15. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. Clin Microbiol Rev 2000;13:559-70.
 16. Gunson RN, Bennett S, Maclean A, Carman WF. Using multiplex real time PCR in order to streamline a routine diagnostic service. J Clin Virol 2008;43:372-5.

=국문초록=

6종의 성매개감염 병원체 검출을 위한 다중 실시간중합효소연쇄반응 검사법의 비교평가

이화여자대학교 의과대학 진단검사의학교실

정혜선, 이미애

배경: 다중 실시간중합효소연쇄반응 검사법은 다양한 성매개감염 병원체를 동시에 검출할 수 있는 민감한 검사법이다. 본 연구에서는 다중 실시간중합효소연쇄반응을 이용하여 6종의 성매개감염 병원체를 검출하는 두 검사법을 비교 평가하였다.

방법: 성매개감염 원인 병원체 PCR 검사를 시행한 후 잔여 DNA 검체를 -70°C에 냉동하였다. *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Mycoplasma hominis* (MH), *Ureaplasma urealyticum* (UU), *Trichomonas vaginalis* (TV)를 GeneFinder STD I (CT/NG/UU)/II (MG/MH/TV) Multiplex Real-time PCR Kits (Infopia, Korea; GeneFinder assay)와 Real-Q CT&NG/MH&TV/MG&UU Kits (BioSewoom, Korea; Real-Q assay)로 검사하였다. 두 검사법의 결과가 불일치할 경우, 다중 실시간중합효소연쇄반응을 이용하여 성매개감염 원인 병원체를 검출하는 다른 시약인 Anyplex II STI-7 Detection (Seegene, Korea)으로 검사하여, 두 개 이상의 검사법에서 양성인 결과를 진양성으로 판단하였다.

결과: 81개 검체 중 GeneFinder assay에서는 45개의 검체에서 총 63개의 병원체(16 CT, 2 NG, 6 MG, 20 MH, 18 UU, 1 TV)가 검출되었고, Real-Q assay에서는 47개의 검체에서 총 66개의 병원체(16 CT, 2 NG, 8 MG, 20 MH, 19 UU, 1 TV)가 검출되었다. 양성 검체와 음성 검체 결과를 정확하게 보고하는 것에 대한 두 검사의 일치율은 93.8%였다(Kappa=0.87). 각 병원체별 일치율은 97.5-100%였다(Kappa>0.8).

결론: GeneFinder assay와 Real-Q assay 간에 유의한 차이를 발견할 수 없었으며, 두 다중 실시간중합효소연쇄반응 검사법 모두 임상 검사실에서 성매개감염의 병원체를 검출하는 데 유용하게 쓰일 것이다. [Ann Clin Microbiol 2017;20:1-6]

교신저자 : 이미애, 07985, 서울시 양천구 안양천로 1071
이화여자대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 02-2650-5222, Fax: 02-2650-5091
E-mail: miae@ewha.ac.kr