

男子尿道炎からの *Mycoplasma genitalium* 検出のためのキットの検討濱砂 良一^{1,2*}, 松本 正広², レ ティ ファン², 藤本 直浩², 松本 哲朗²¹ 国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 泌尿器科² 産業医科大学 医学部 泌尿器科学教室

要 旨 : *Mycoplasma genitalium* は性感染症である男子尿道炎の原因微生物である。我が国では非淋菌性尿道炎患者の15-25%の尿から検出される。世界的にマクロライド耐性, キノロン耐性 *M. genitalium* の出現が, 尿道炎治療を行う上で問題となっている。しかし, わが国では *M. genitalium* を検出するための保険適用を有する検査キットがない。今回, Seegene社の性感染症関連微生物7種同時検出キット (Anyplex™ II STI-7 Detection; *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *M. genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomonas vaginalis* を検出) を用いて, *M. genitalium* の検出に関する検討を行った。本キットの検出限界を検討するため, 保存する *M. genitalium* 17株を用いた。SP4 mycoplasma medium で増殖した *M. genitalium* 培養液から, *M. genitalium* のDNAを抽出し, *M. genitalium* のDNAコピー数を測定した。 *M. genitalium* のDNA抽出液を $10^1 \sim 10^8$ 倍に希釈した希釈液を作成した。それぞれの希釈液を Anyplex™ II STI-7 Detection で反応させ, もっとも希釈した液で *M. genitalium* が検出されたものを検出限界とした。17株中14株で, 希釈限界におけるDNAコピー数は10 genome equivalent (geq)/reaction未満で, 3株で10 geq/reaction以上であった。その中でもっとも高いDNAコピー数は48.4 geq/reactionであり, 約50 geq/reactionがAnyplex™ II STI-7 Detectionにより保証される *M. genitalium* のDNAコピー数と考えられた。また, 保存する尿検体からDNAを抽出し, MgPa geneの一部を増幅させるPCR法とAnyplex™ II STI-7 Detectionとで, *M. genitalium* の検出率を比較した。両方法での陽性一致率は96.4% (27/28), 陰性一致率は98.6% (71/72)であった。両方法との間に1例ずつの不一致があったものの, 陽性, 陰性一致率とも高かった。Seegene社の性感染症関連微生物7種同時検出キット, Anyplex™ II STI-7 Detectionを培養液, 尿検体の面から検証し, *M. genitalium* 検出に関して有用性が高いことが分かった。

キーワード : *Mycoplasma genitalium*, Anyplex™ II STI-7 Detection, 検出限界, 尿検体, 尿道炎。

(2018年1月12日 受付, 2018年2月2日 受理)

はじめに

尿道炎は男性の性感染症のなかで, もっとも頻度の高い疾患である[1]。尿道炎は古典的に, 淋菌の有無により淋菌性尿道炎と非淋菌性尿道炎(non-gonococcal urethritis: NGU)に分類されてきた[1]。NGUには数多くの微生物が関与している可能性が高いが, このなかでもっとも頻度高く分離される微生物が *Chlamydia trachomatis* である。おおよそ50%のNGU症例の尿検体から *C. trachomatis* が検出され, この尿道炎をクラミ

ジア性尿道炎(chlamydial urethritis)と呼んでいる[1]。これら以外の尿道炎, すなわち淋菌も *C. trachomatis* も分離されない尿道炎は非クラミジア性非淋菌性尿道炎(non-chlamydial NGU: NCNGU)と呼ばれるようになった[1]。NCNGU症例の尿検体からは, さまざまな微生物が分離されることが明らかになっており[2], このなかでもっとも研究が進み, その病原性が明らかとなっているものが *Mycoplasma genitalium* である。

M. genitalium は Mollicutes 綱に属する微生物である。Mollicutes 綱には多くの菌種が属し, ヒトを含む脊椎

* 対応著者: 濱砂 良一, 国家公務員共済組合連合会 新小倉病院 泌尿器科, 〒803-8505 北九州市小倉北区金田1丁目3番1号, Tel: 093-571-1031, Fax: 093-591-0553, E-mail: hamaryo@med.uoeh-u.ac.jp

生物, 昆虫, 植物, 下水や土壌の一般環境からも検出される。ヒトからは *Mycoplasma* 属と *Ureaplasma* 属に含まれる種が分離され, その一部はヒトに対して病原性をもつ。このなかでマイコプラズマ肺炎の原因となる *M. pneumoniae* がもっとも知られているが, その極めて近縁の種である *M. genitalium* は性器感染症の原因となる [3]。 *M. genitalium* は 1980 年に Taylor-Robinson と Tully らによりはじめて分離された [4]。その後 Taylor-Robinson が以下の変法コッホの原則 (modified Henle-Koch postulates) を提唱し [5], その病原性に対する研究が行われた。すなわち, 1) 症状のある患者からは症状のないものと比較すると高頻度で *M. genitalium* が検出されること, 2) 何らかの方法で *M. genitalium* の抗体の産生が確認されること, 3) *M. genitalium* に薬剤感受性のある抗菌薬が臨床的に有効であること, 4) *M. genitalium* を動物に感染させた時, *M. genitalium* が再度動物から検出されること, さらにヒトと同様な病態を起こすことであり, 基礎的, 臨床的な研究をもとに, 現在では男性の尿道炎のほか, 子宮頸管炎や骨盤内臓器感染症において, その病原性が確認されている [3]。

しかし, 1980 年に *M. genitalium* の標準株である G37^T と M30 が分離されて以降, 新たな *M. genitalium* 株は分離されなかった。当初の予想に反して, その臨床検体からの *M. genitalium* の培養は極めて困難であったからである。1996 年に Jensen らが Vero 細胞を使用した培養法を開発し [6], 現在までに 50 数株の *M. genitalium* 株が確立しているにすぎない [7-9]。我々の経験では, 臨床検体からの *M. genitalium* の分離培養成功率は約 1% 前後であり, 株の確立までに最低 6 ヶ月を要する [8, 9]。従って, *M. genitalium* の検出には, 培養法以外の方法が必要であり, 現在, 核酸増幅法 (nucleic acid amplification test: NAAT) を用いた検出法が一般的である。1991 年に最初の *M. genitalium* の NAAT が報告された [10, 11]。しかし, その後, *M. genitalium* の検出キットが世界的に広まったわけではない [3]。 *M. genitalium* に対してマクロライド, キノロン系抗菌薬は高い抗菌活性を有していたため, NGU を治療する際, *C. trachomatis* を標的にこれらの抗菌薬による治療を行えば, 同時に *M. genitalium* も治療できていたのである。しかし, 近年, azithromycin (AZM) による治療失敗例が多数報告され, その検体からマクロライド耐性 *M. genitalium* が分離培養された [12]。加えて, マクロライド耐性 *M. genitalium* に有効である moxifloxacin (MFLX) による治療失敗例が報告されるようになり [13], *M. genitalium* の検出が NGU を治療するにあたってひじょうに重要となってきたのである。我が国においても同様にマクロライ

ドの治療失敗例が報告され [9], マクロライド耐性 *M. genitalium* 株は, 世界的に蔓延している。我が国では, 旧三菱化学メディエンス株式会社 (現 株式会社 LSI メディエンス) が開発した multiplex PCR 法 (*M. genitalium*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* を同時検出) が使用可能であるが [14], 残念ながら保険適用がなく, その他の検出法は実験室レベルである。今回, 我々は世界数ヶ国で発売されている Seegene 社の性感染症関連微生物 7 種 (*Neisseria gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *Trichomonas vaginalis*) 同時検出キットを用いて, *M. genitalium* の検出を行い, そのキットの性能および臨床的有用性を検討した。

方 法

検出キット

Seegene 社 (Seoul, Korea) の性感染症関連微生物 7 種同時検出キットを用いた。本製品は韓国 Seegene 社が開発したキット (AnyplexTM II STI-7 Detection) [15, 16] で, エーディア株式会社 (東京) との共同研究にて本研究を行った。Seegene 社製のキットは, real-time PCR と融解曲線解析を組み合わせ, 本キットの試薬で 1 本のチューブを用いて 7 種類の微生物 (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum*, *T. vaginalis*) の検出が可能となる。 *M. genitalium* の検出のための標的遺伝子は *gyrase gene* である。

使用したキット製品は, エーディア株式会社 (東京) より供与を受けた。供与された内容は, AnyplexTM II STI-7 Detection による測定のための測定試薬 AnyplexTM II STI-7 Detection キット (Seegene, Seoul, Korea) および測定機器の CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Bio-rad, Ca, USA) である。

培養液における性感染症関連微生物 7 種同時検出キットの検出限界の検討

培養液における性感染症関連微生物 7 種同時検出キットの検出限界 (測定保証 DNA コピー数) を測定するため, 産業医科大学泌尿器科で保有する *M. genitalium* 17 株を用いた。実験は, 産業医科大学泌尿器科の実験室 (P2) にて行った。用いた株は標準株の G37^T, 日本由来 4 株 (M6282, M6283, M6284, M6287), デンマーク由来 4 株 (M2282, M2300, M2321, M2341), スウェーデン由来 6 株 (M6257, M6280, M6285, M6286, M6328, M6489), フランス由来 2 株 (M6090, M6151) である [7, 8]。これらの株は -80°C にて保存されており融解後,

液体培地である SP4 mycoplasma medium [17] に接種後 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。増殖は、pH の変化により SP4 mycoplasma medium の培地色が赤から黄色になることにより確認した。増殖した *M. genitalium* を含む SP4 mycoplasma medium より、3 種類の DNA 抽出キット、GeneAll Ribospin™ vRD (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Seoul, Korea), QIAamp® DNA Mini Kit (株式会社キアゲン, 東京, 日本), Chelex® 100 Resin (Bio-rad, Ca, USA) により *M. genitalium* の DNA を抽出した。GeneAll Ribospin™ vRD と QIAamp® DNA Mini Kit による DNA 抽出法は、それぞれの製品マニュアルに準じた。Chelex® 100 Resin による DNA 抽出法は、Jensen らの報告 [18] に準じた。*M. genitalium* の DNA コピー数は、MgPa gene の一部を増幅する real-time PCR 法 (MgPa gene PCR 法) [18] により測定した。MgPa gene PCR 法における最終反応容量は、30 µl に調整した。さらに、それぞれの方法で抽出した DNA 抽出液を DNA buffer により 10 倍希釈し、その希釈液を作成し (10¹~10⁸ 倍希釈まで)、それぞれの希釈液を、Anyplex™ II STI-7 Detection の製品マニュアル (Choe らが行った方法 [19] と同様の方法) に準じて検査し、*M. genitalium* の検出の有無を調べた。それぞれの株において、*M. genitalium* が検出された最大希釈液を検出限界とし、希釈していない DNA コピー数より計算して、検出限界である希釈列に *M. genitalium* の DNA が何コピー存在するかを計算した。DNA コピー数は genome equivalent (geq)/reaction として表記した [18]。

尿検体における検討

Takahashi らの臨床研究 [20] に使用され、-80°C に保存された尿検体を用いて、性感染症関連微生物 7 種同時検出キットによる *M. genitalium* の検出の有用性を検討した。検体はすべて保存し微生物の遺伝子研究に使用することに各個人の同意を得ている。さらにすでに個人が特定できないように匿名化されており、保存検体には検体番号のみが記載され保存されている。これらの尿検体からランダムに 100 検体を抽出した。尿検体からは GeneAll Ribospin™ vRD (GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Seoul, Korea) により DNA を抽出した。DNA の抽出法は製品マニュアルに準じた。これらの DNA サンプルを用いて、MgPa gene PCR 法と Anyplex™ II STI-7 Detection の 2 法により *M. genitalium* を検出した結果を比較検討した。

倫理審査

本研究は産業医科大学倫理委員会にて審査され、その実施内容は同委員会にて承認された (第 H25-158 号)。

結 果

性感染症関連微生物 7 種同時検出キットの *M. genitalium* の検出限界

17 株の *M. genitalium* が増殖したそれぞれの培養液から、3 方法により *M. genitalium* の DNA を抽出した。17 株すべてについて、3 方法により抽出した DNA 抽出液から、Anyplex™ II STI-7 Detection により *M. genitalium* は検出可能であった。さらにそれぞれの DNA 抽出液の希釈列について、Anyplex™ II STI-7 Detection により *M. genitalium* を検出した。Table 1 に GeneAll Ribospin™ vRD (Anyplex™ II STI-7 Detection における推奨 DNA 抽出法) にて抽出した 17 株それぞれの *M. genitalium* の DNA コピー数と、希釈列における Anyplex™ II STI-7 Detection による *M. genitalium* の検出の有無を示す。希釈限界における *M. genitalium* の DNA コピー数は、17 株中 14 株では 10 geq/reaction 未満であったが、3 株で 10 geq/reaction 以上であり、M6286 株では 48.4 geq/reaction であった。従って、GeneAll 法により DNA 抽出を行った場合、約 50 geq/reaction が Anyplex™ II STI-7 Detection により保証される *M. genitalium* の DNA コピー数と考えられた。

尿検体からの *M. genitalium* の検出

ランダムに検出した 100 検体中の Anyplex™ II STI-7 Detection による測定では、*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* の陽性率は、それぞれ 17%, 52%, 28%, 24% であった。*M. genitalium* の検出における Anyplex™ II STI-7 Detection と MgPa gene PCR 法との比較を Table 2 に示す。陽性一致率 96.4% (27/28), 陰性一致率 98.6% (71/72) と、両方法との間に 1 例ずつの不一致があったものの、陽性、陰性一致率とも高かった。

考 察

男子尿道炎からの *M. genitalium* の検出頻度は、我が国ではおおよそ 15-25% 程度である [20-22]。約 50% の患者からは *C. trachomatis* が検出され、*N. gonorrhoeae* が約 30% の患者から検出される。しかし、ヨーロッパでは *M. genitalium* の検出率が高く、*C. trachomatis* の分離頻度とほぼ同じでそれぞれ 40% 程度である [3]。し

Table 1. *M. genitalium* DNA copy number and reaction of diluted DNA samples to detect *M. genitalium* by Anyplex™ II STI-7 Detection

Strain name	DNA copy number (geq/reaction)	Diluted DNA samples								DNA number as the detection limit (geq/reaction)
		10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	
G37 ^T	30750000	P	P	P	P	P	P	P	N	3.08
M2282	21150000	P	P	P	P	P	P	P	N	2.12
M2300	17800000	P	P	P	P	P	P	N	N	17.8
M2321	30300000	P	P	P	P	P	P	P	P	< 0.30
M2341	16550000	P	P	P	P	P	P	P	N	1.66
M6257	24900000	P	P	P	P	P	P	P	N	2.49
M6280	10450000	P	P	P	P	P	P	P	N	1.05
M6285	13350000	P	P	P	P	P	P	P	N	1.34
M6286	4835000	P	P	P	P	P	N	N	N	48.4
M6328	10650000	P	P	P	P	P	P	P	N	10.7
M6489	8750000	P	P	P	P	P	P	P	N	0.88
M6090	14400000	P	P	P	P	P	P	P	N	1.44
M6151	6000000	P	P	P	P	P	P	N	N	6.00
M6282	8600000	P	P	P	P	P	P	P	N	0.86
M6283	18500000	P	P	P	P	P	P	P	N	1.85
M6284	14650000	P	P	P	P	P	P	P	N	1.47
M6287	12850000	P	P	P	P	P	P	P	N	1.29

geq: genome equivalent, P: positive reaction, N: negative reaction

Table 2. The comparison to detect *M. genitalium* between by Anyplex™ II STI-7 Detection and MgPa gene PCR

		MgPa gene PCR			Concordant rate
		Positive	Negative	Total	
Anyplex™ II STI-7 Detection	Positive	27	1	28	Positive concordant rate 96.4% (27/28)
	Negative	1	71	72	Negative concordant rate 98.6% (71/72)
	Total	28	72	100	

たがって、ヨーロッパにおいては、我が国より *M. genitalium* の重要性が高く、すでにいくつかの *M. genitalium* の検出キットが発売されている。その多くは multiplex PCR であり、Bio-rad 法 (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium* の同時検出) [23] や、Amplisens 法 (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. genitalium*, *T. vaginalis* の同時検出) [24] が使用されている。Seegene 社の Anyplex™ II STI-7 Detection もすでにヨーロッパでは使用されているキットである。

C. trachomatis に対しては、AZM および doxycycline (DOXY) はほぼ同様に有効であることが示されている [25]。 *M. genitalium* に対しても AZM と DOXY を使用

した多くの randomized control study が行われ、AZM の有効性が高いことが示されてきた [3, 9]。したがって、NGU に対しての治療は、世界的にも AZM の使用が高かった。我が国ではキノロン薬を第一選択薬に使用することがあり [1]、世界的な指針とは異なっている。しかし、2006 年にオーストラリアより、マクロライド無効症例が報告された。Bradshaw らは *M. genitalium* が検出された 34 名 (尿道炎患者 31 名と無症状男性 3 名) を AZM 1 g により単回治療を行った [26]。しかし、9 名 (9/32: 28%, 2 例は drop out) では *M. genitalium* は除菌されず、さらに 3 名に AZM を 3 回追加投与するも無効であった。これらの症例から AZM 耐性株が検出され、

我々はマクロライド耐性がマクロライドの標的部位である23S rRNAのdomain Vのpoint mutationと関連があることを報告した[12]。本変異は、マクロライド耐性*M. pneumoniae*で指摘されている変異と同様である[27]。この遺伝子変異を持つ*M. genitalium*遺伝子は世界各国から報告されており、オーストラリア、デンマーク、我が国の検討ではほぼ50%に達していることより[28-31]、*M. genitalium*の検出の意義は高まったと考えてよい。つまり、AZMに感受性の高い*C. trachomatis*のみをターゲットにしたNGUの治療は困難になったということである。オーストラリアでは*M. genitalium*が検出され、さらにマクロライド耐性遺伝子も検出されるキットが発売されており、マクロライド耐性*M. genitalium*に有効なキノロン薬、特にMFLXを選択する際に有用であると言われている[31]。しかし、近年MFLX治療無効症例が増加しており[13]、さらに治療が困難になると考えられる。我が国ではsitafloxacin (STFX)がマクロライド耐性*M. genitalium*に有効であり、*M. genitalium*検出キットが保険適用となれば、さらにNGUの治療効果は向上すると考えられる。

性感染症関連微生物7種同時検出キット、Anyplex™ II STI-7 Detectionの*M. genitalium*の検出限界は、製品マニュアルによると50 copies/reactionとされており、NAATとしては高いほうではない。しかし、他の検出キットでは、本検討のように複数の分離株を使用しているわけではなく、標準株であるG37^Tのみの検出限界が示されているにすぎない。また、検出限界を示していないキットもある。本検討により、本キットのG37^Tの検出限界は3 geq/reactionと考えられ、他の微生物に対するNAATと比較しても遜色ないものである。臨床検体における検出率も、世界的に標準であると考えられる。尿検体からの検討でもMgPa gene PCR法と比較して検出感度はほぼ同等であると考えてよく、Anyplex™ II STI-7 Detectionは、男性の尿道炎の*M. genitalium*の検出に十分に使用しうるキットと考えられる。

本キットの問題点はmultiplex PCRであるという点である。本キットは7種類の微生物を検出可能である。このなかで*N. gonorrhoeae*、*C. trachomatis*、*M. genitalium*の尿道炎に対する病原性は確立されている。*T. vaginalis*は男子尿道炎を引き起こすことは明らかであるが、無症状の症例が多いこと、男性尿道からの*T. vaginalis*の分離頻度が低いことより臨床上有用であるかは不明である[32]。*U. urealyticum*は尿道炎の原因となりうる病原体であるが[33]、健常男性からも高い頻度で分離されることが知られており、その病原性はいまだ確立されていない[34]。また、*U. parvum*、*M. hominis*は男性の尿

道炎の病原体ではない。*U. parvum*は新生児に色々な疾患を引き起こすとされるが[35]、いまだ明らかとなっておらず、母体膣からのコンタミネーションである可能性もある。*M. hominis*は女性性器の手術後に周術期感染症を起こすことがあるが、尿道炎は起こさない[35, 36]。これら病原性のない病原体を同時に検出した場合、その微生物の病原性に関わらず治療される可能性がある。実際、これらの微生物が検出されたばかりに、患者が治療を求め、不要と考えられる治療が行われていることが報告されている。我が国で病原性のない微生物の検出が、保険適用となる可能性は低いため、今後、検出する微生物を制限したキットの開発が待たれる。理想的には*M. genitalium*のみを検出するキットが必要であると考えられるが、コストや流通の面からの考慮が必要であると考えられる。さらに、男性のみでなく、女性の性感染症への適用も考慮すべきであり、今後も十分な検討が必要である。

結 語

Seegene社の性感染症関連微生物7種同時検出キット、Anyplex™ II STI-7 Detectionの有効性を培養液、尿検体の面から考察し、*M. genitalium*検出に関して有用性が高いことが分かった。

利 益 相 反

本論文に関して、利益相反関係にあるのは、産業医科大学と株式会社エーディアの間に締結された共同研究(*M. genitalium*を含む性感染症検出キット評価に関する研究、第25共17号、第26共19号、第27共10号、第28共17号)である。

引 用 文 献

1. 日本性感染症学会(2016):性感染症診断・治療ガイドライン2016. 日本性感染症学会誌 27(Suppl. 1):4-170
2. You C, Hamasuna R, Ogawa M, Fukuda K, Hachisuga T, Matsumoto T & Taniguchi H (2016): The first report: An analysis of bacterial flora of the first voided urine specimens of patients with male urethritis using the 16S ribosomal RNA gene-based clone library method. Microb Pathog 95: 95-100
3. Taylor-Robinson D & Jensen JS (2011): Mycoplasma genitalium: from Chrysalis to multicolored butterfly.

- Clin Microbiol Rev 24: 498–514
4. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM & Rose DL (1981): A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet* 1(8233): 1288–1291
 5. Taylor-Robinson D (1983): The role of mycoplasmas in non-gonococcal urethritis: a review. *Yale J Biol Med* 56: 537–543
 6. Jensen JS, Hansen HT & Lind K (1996): Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. *J Clin Microbiol* 34: 286–291
 7. Jensen JS, Fernandes P & Unemo M (2014): In vitro activity of the new fluoroketolide solithromycin (CEM-101) against macrolide-resistant and -susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 3151–3156
 8. Hamasuna R, Osada Y & Jensen JS (2007): Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with Vero cells. *J Clin Microbiol* 45: 847–850
 9. Hamasuna R (2013): Identification of treatment strategies for *Mycoplasma genitalium*-related urethritis in male patients by culturing and antimicrobial susceptibility testing. *J Infect Chemother* 19: 1–11
 10. Jensen JS, Uldum SA, Sondergard-Andersen J, Vuust J & Lind K (1991): Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *J Clin Microbiol* 29: 46–50
 11. Palmer HM, Gilroy CB, Furr PM & Taylor-Robinson D (1991): Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol Lett* 61: 199–203
 12. Jensen JS, Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK & Hamasuna R (2008): Azithromycin treatment failure in *Mycoplasma genitalium*-positive patients with non-gonococcal urethritis is associated with induced macrolide resistance. *Clin Infect Dis* 47: 1546–1553
 13. Tagg KA, Jeoffreys NJ, Couldwell DL, Donald JA & Gilbert GL (2013): Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. *J Clin Microbiol* 51: 2245–2249
 14. Yoshida T, Ishiko H, Yasuda M, Takahashi Y, Nomura Y, Kubota Y, Tamaki M, Maeda S & Deguchi T (2005): Polymerase chain reaction-based subtyping of *ureaplasma parvum* and *ureaplasma urealyticum* in first-pass urine samples from men with or without urethritis. *Sex Transm Dis* 32: 454–457
 15. Lee SJ, Park DC, Lee DS, Choe HS & Cho YH (2012): Evaluation of Seeplex[®] STD6 ACE Detection kit for the diagnosis of six bacterial sexually transmitted infections. *J Infect Chemother* 18: 494–500
 16. Bercot B, Amarsy R, Goubard A *et al* (2015): Assessment of coinfection of sexually transmitted pathogen microbes by use of the anyplex II STI-7 molecular kit. *J Clin Microbiol* 53: 991–993
 17. Tully JG, Whitcomb RF, Clark HF & Williamson DL (1977): Pathogenic mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma. *Science* 195(4281): 892–894
 18. Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B & Lidbrink P (2004): Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 42: 683–692
 19. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, Hong SH, Park DC, Lee MK, Kim TH & Cho YH (2013): 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* 17: e1134–e1140
 20. Takahashi S, Hamasuna R, Yasuda M *et al* (2013): Clinical efficacy of sitafloxacin 100 mg twice daily for 7 days for patients with non-gonococcal urethritis. *J Infect Chemother* 19: 941–945
 21. Ito S, Yasuda M, Seike K, Sugawara T, Tsuchiya T, Yokoi S, Nakano M & Deguchi T (2012): Clinical and microbiological outcomes in treatment of men with non-gonococcal urethritis with a 100-mg twice-daily dose regimen of sitafloxacin. *J Infect Chemother* 18: 414–418
 22. Hamasuna R, Takahashi S, Kiyota H, Yasuda M, Hayami H, Arakawa S, Tomono K & Matsumoto T (2011): Effect of gatifloxacin against *Mycoplasma genitalium*-related urethritis: an open clinical trial. *Sex Transm Infect* 87: 389–390
 23. Le Roy C, Le Hen I, Clerc M, Arfel V, Normandin F, Bebear C & de Barbeyrac B (2012): The first performance report for the Bio-Rad Dx CT/NG/MG assay for simultaneous detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* in urogenital samples. *J Microbiol Methods* 89: 193–197
 24. Gaydos CA (2017): *Mycoplasma genitalium*: Accurate

- Diagnosis Is Necessary for Adequate Treatment. *J Infect Dis* 216(Suppl.2): S406–S411
25. Lau CY & Qureshi AK (2002): Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sex Transm Dis* 29: 497–502
 26. Bradshaw CS, Jensen JS, Tabrizi SN, Read TR, Garland SM, Hopkins CA, Moss LM & Fairley CK (2006): Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. *Emerg Infect Dis* 12: 1149–1152
 27. Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R *et al* (2005): Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2302–2306
 28. Kikuchi M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T & Deguchi T (2014): Remarkable increase in fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium* in Japan. *J Antimicrob Chemother* 69: 2376–2382
 29. Uno M, Deguchi T, Komeda H, Yasuda M, Tamaki M, Maeda S, Saito I & Kawada Y (1996): Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in men with gonococcal urethritis. *Int J STD AIDS* 7: 443–444
 30. Murray GL, Bradshaw CS, Bissessor M, Danielewski J, Garland SM, Jensen JS, Fairley CK & Tabrizi SN (2017): Increasing Macrolide and Fluoroquinolone Resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Emerg Infect Dis* 23: 809–812
 31. Tabrizi SN, Tan LY, Walker S *et al* (2016): Multiplex Assay for Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Macrolide Resistance Using PlexZyme and PlexPrime Technology. *PLoS One* 11: e0156740
 32. Schwebke JR & Hook EW 3rd (2003): High rates of *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic: implications for screening and urethritis management. *J Infect Dis* 188: 465–468
 33. Deguchi T, Yoshida T, Miyazawa T, Yasuda M, Tamaki M, Ishiko H & Maeda S (2004): Association of *Ureaplasma urealyticum* (biovar 2) with nongonococcal urethritis. *Sex Transm Dis* 31: 192–195
 34. Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR, Jensen NL, Astete SG, Whittington WL & Totten PA (2011): *Ureaplasma urealyticum* is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetime sexual partners: a case-control study. *J Infect Dis* 204: 1274–1282
 35. Larsen B & Hwang J (2010): *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, and adverse pregnancy outcomes: A fresh look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010; 2010: 521921
 36. Koshiba H, Koshiba A, Daimon Y, Noguchi T, Iwasaku K & Kitawaki J (2011): Hematoma and abscess formation caused by *Mycoplasma hominis* following cesarean section. *Int J Womens Health* 3: 15–18
-

Validation of the Kit for Detecting *Mycoplasma Genitalium* from the Male Urethritis

Ryoichi HAMASUNA^{1,2}, Masahiro MATSUMOTO², Phuong Thi LE², Naohiro FUJIMOTO² and Tetsuro MATSUMOTO²

¹Department of Urology, Federation of National Public Services and Affiliated Personal Mutual Associations, Shin-Kokura Hospital. Kokurakita-ku, Kitakyushu 803-8505, Japan

²Department of Urology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807-8555, Japan

Abstract : *Mycoplasma genitalium* is one of the pathogenic microorganisms in male urethritis as a sexually transmitted infection (STI). *M. genitalium* is detected in the urine specimens of 15–25% male patients with urethritis. The emergence of macrolide- or fluoroquinolone-resistant *M. genitalium* has become a serious problem in the treatment of male urethritis worldwide, but there is no commercial-based detecting kits accepted by the national insurance in Japan. In this study, we tested the validity of a molecular kit for detecting seven microorganisms related to STI (Anyplex™ II STI-7 Detection which detects *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *M. genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Trichomonas vaginalis*) produced by Seegene company in Korea. Seventeen *M. genitalium* strains were used to determine the detection limit of *M. genitalium*. *M. genitalium* DNA samples were extracted from *M. genitalium* strains and the diluted DNA samples were reacted to detect *M. genitalium* by the Anyplex™ II STI-7 Detection. The detection limit was determined as the maximum dilution of DNA samples and the number of *M. genitalium* DNA copies calculated. In this study, the minimum DNA copies to detect *M. genitalium* by the Anyplex™ II STI-7 Detection was determined to be around 50 per reaction. The detection rates of *M. genitalium* in urine specimens were compared between MgPa gene PCR and the Anyplex™ II STI-7 Detection. The positive and negative concordant rates were high as 96.4% (27/28) and 98.6% (71/72), respectively. The validity of the kit for detecting seven microorganisms related to STI (Anyplex™ II STI-7 Detection) was high and thought to be useful for clinical uses.

Key words: *Mycoplasma genitalium*, Anyplex™ II STI-7 Detection, detection limit, urine specimen, urethritis.