

## GenoType® MTBDR *plus* による多剤耐性結核菌同定に関する検討

<sup>1</sup>近松 絹代    <sup>1</sup>水野 和重    <sup>1</sup>青野 昭男    <sup>1</sup>山田 博之  
<sup>1</sup>菅本 鉄広    <sup>2</sup>西山 裕之    <sup>1</sup>御手洗 聡

**要旨：**〔目的〕 Line Probe Assay の一種である GenoType® MTBDR *plus* (Hain Lifescience, Germany) の、RFP および INH の耐性検出能を評価した。〔方法〕 臨床分離多剤耐性結核菌 (MDR-TB) 44 株と、RFP および INH に感受性である結核菌 67 株を対象とし、GenoType® MTBDR *plus* による RFP および INH の耐性検出能を検討した。また、*rpoB* は Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) 81bp, *katG* は codon 315 周辺の 322bp, *inhA* は *inhA* promoter を含む 248bp および *inhA* ORF 379bp の遺伝子領域をダイレクトシーケンスし、変異を解析した。1% 小川培地による比率法感受性検査を評価基準とした。〔結果〕 GenoType® MTBDR *plus* による RFP および INH の耐性検出感度は、それぞれ 97.7% および 65.9% であった。同様に、特異度はそれぞれ 100%、一致率は 99.1% と 86.5% であった。RFP については、GenoType® MTBDR *plus* で *rpoB* の変異を検出した 43 株のうち 42 株 (97.7%) でシーケンスの結果と一致した。INH では、GenoType® MTBDR *plus* にて *katG* MUT1 (S315T1) 変異 24 株 (54.5%)、と *inhA* MUT1 (C15T) 変異 5 株 (11.4%) が検出されたが、シーケンスでは GenoType® MTBDR *plus* で検出した 24 株以外の *katG* 変異株 2 株 (4.5%) を検出した。GenoType® MTBDR *plus* の遺伝子変異検出の感度は、RFP ではシーケンスと同等であり、INH ではシーケンスよりやや劣るものの有意差はなかった。〔考察〕 GenoType® MTBDR *plus* は本邦では INH 耐性の感度が劣るものの、RFP では通常の薬剤感受性検査と同等の精度が確認された。検査時間が約 6 時間と短いため、多剤耐性結核の早期診断と感染管理に有用であると考えられた。

**キーワード：** Line Probe Assay, Rifampicin, Isoniazid, 多剤耐性結核菌, *rpoB*, *katG*, *inhA*

### はじめに

結核は日本国内においては漸減傾向が続いているが、世界的には罹患数が増加している。また、Isoniazid (INH) と Rifampicin (RFP) を中心とする短期化学療法が普及しつつあるにもかかわらず適切な薬剤管理がなされていないため、耐性菌の増加が報告されている<sup>1)</sup>。日本では、耐性結核菌はもともと青年層に多く認められるが、最近では特に青年層において外国籍の患者の割合が増加しており<sup>2)</sup>、日本近隣の耐性結核高蔓延地域からの輸入例も少なくないと考えられる。さらに多剤耐性結核菌による集団感染事例も報告されており<sup>3)</sup>、感染管理上耐性結核

菌の早期診断は重要である。

結核菌は発育が遅いことから、表現形を評価する薬剤感受性検査には多くの時間を要するのが通常である。例えば、標準法である 1% 小川培地比率法で 4~6 週間、液体培地による最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) 測定法で 7~10 日、BACTEC MGIT 960 AST (ベクトン・ディッキンソン) でも 4~12 日と長時間を要する。これに対して、遺伝子変異を検出する方法は核酸増幅法を基礎としているため検査時間が短い。しかし一般検査室でシーケンスを実施するのは困難である。近年、DNA の抽出、増幅、ハイブリダイゼーション、耐性変異検出までをキット化した Solid Phase

<sup>1</sup>結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科、<sup>2</sup>結核予防会国際部

連絡先：御手洗聡、結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンス部細菌検査科、〒204-8533 東京都清瀬市松山3-1-24 (E-mail: mitarai@jata.or.jp)

(Received 12 Nov. 2010/Accepted 1 Mar. 2011)

Reverse Hybridization Assay (Line Probe Assay: LPA) が一般細菌検査室レベルでも使用可能となっている。現在日本で保険適用のあるLPAはジェノスカラー・Rif TB (ニプロ) があり、これは *rpoB* の変異からRFP耐性を判定する。世界的にはもう一つのLPAである GenoType® MTBDR (Hain Lifescience, Germany) が多く利用されており、*rpoB* および *katG* の変異からRFPとINHの耐性を同時に検出するが、INHの耐性検出率がRFPの耐性検出率より劣っていた<sup>4)</sup>。後者に *inhA* promoter の変異検出を追加した GenoType® MTBDR *plus* (Hain Lifescience, Germany) はINH耐性の検出を向上させる目的で開発され、多剤耐性結核菌 (Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: MDR-TB) の迅速な診断が期待できる。今回、標準的薬剤感受性検査と GenoType® MTBDR *plus* 法、および *rpoB*, *katG*, *inhA* の直接DNAシーケンス法による耐性菌検出法を比較し、GenoType® MTBDR *plus* によるRFPとINHに関する耐性の検出力を評価した。

### 対象と方法

#### 結核菌株

2002年度に実施された結核療法研究協議会による耐性結核菌全国調査で同定されたMDR-TB 44株と、RFPおよびINHに感受性である結核菌67株を対象とした。比率法による薬剤感受性検査は1%小川培地を用いて、結核菌検査指針2007に従って実施した<sup>5)</sup>。INHは0.2  $\mu\text{g/ml}$  を耐性基準濃度とした。

#### GenoType® MTBDR *plus*

GenoType® MTBDR *plus* による判定は使用説明書に従って行った。まず、対象結核菌DNAをISOPLANT (ニッポンジーン) で抽出し、ビオチン標識プライマーとヌクレオチドを含むPNM (Primer Nucleotide Mix) を使用して、*rpoB*, *katG*, *inhA* promoter領域をmultiplex PCRにより増幅した。次にストリップ上に固相化された各プローブとPCR産物を専用の振盪インキュベーター (Twin Cubator: Hain Lifescience, Germany) を使って45°Cでハイブリダイズさせた。プローブは野生型と変異型があり、野生型は *rpoB* 8種類、*katG* 1種類、*inhA* promoter 2種類、変異型は *rpoB* 4種類、*katG* 2種類、*inhA* promoter 4種類で構成されている (Fig.)。ハイブリッドを形成したプローブについて発色反応を行い、ストリップ上の発色したバンドのパターンにより *rpoB*, *katG*, *inhA* promoter の変異遺伝子型 (変異の有無) を判定した。

#### *rpoB*, *katG* および *inhA* の塩基配列解析

*rpoB* 領域の増幅についてはWilliamsらの方法<sup>6)</sup>, *katG* および *inhA* 領域の増幅についてはMorlockらの方法<sup>7)</sup> に準拠した。すなわち *rpoB* の Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) を含む305bp, *katG* のcodon 315をはさんだ322bp, さらに *inhA* は *inhA* promoter を含む248bp および *inhA* ORF 810bpのうち379bpをTable 1に示したプライマーを使いPCRにて増幅した。*rpoB* はDNAサンプルにPCR用試薬とプライマー 25 pmol 加え全量を50  $\mu\text{l}$  とし、94°C 5分加温後94°C 30秒, 60°C 30秒, 72°C 90

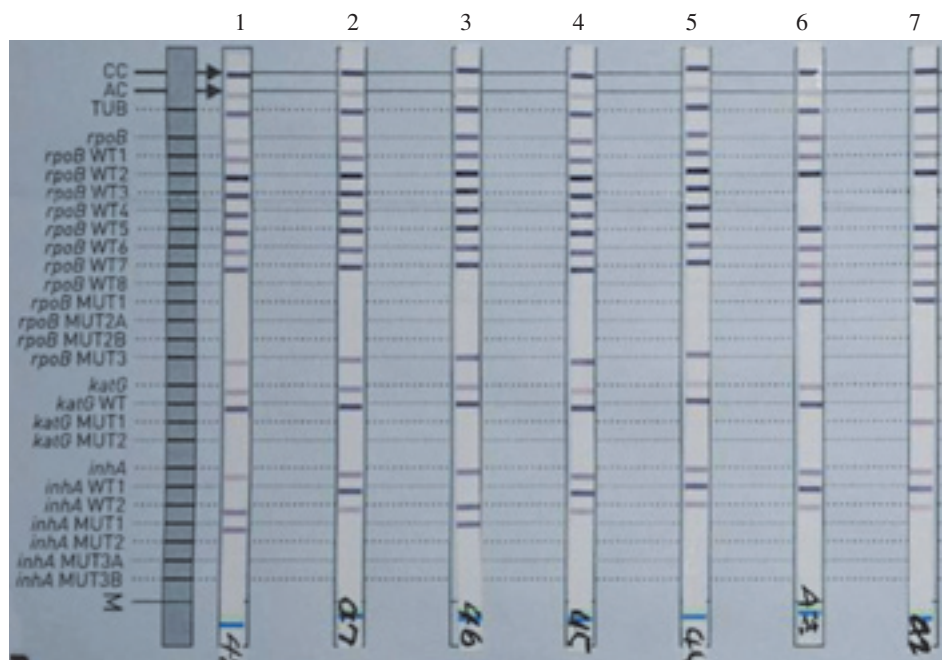


Fig. Hybridization patterns observed with GenoType® MTBDR *plus* assay.

Typical patterns for MDR-TB were obtained: lane 1, 3 = *rpoB* S531L and *inhA* C-15T; lane 2, 4, 5 = *rpoB* S531L; lane 6 = *rpoB* D516V; lane 7 = *rpoB* D516V and *katG* S315T1

**Table 1** Oligonucleotide primers used in PCR and direct sequencing

Target gene	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
<i>rpoB</i>	TbRif-1	CAG ACG TTG ATC AAC ATC CG
	TbRif-2	TAC GGC GTT TCG ATG AAC
<i>katG</i>	KatG-1	TGG CCG CGG CGG TCG ACA TT
	KatG-2	CCA GCA GGG CTC TTC GTC AG
<i>inhA</i> ORF	inhA-1	CCT CGC TGC CCA GAA AGG GA
	inhA-2	ATC CCC CGG TTT CCT CCG GT
<i>inhA</i> promoter	inhA-3	AGG TCG CCG GGG TGG TCA GC
	inhA-4	AGC GCC TTG GCC ATC GAA GCA

秒のサイクルを40回繰り返し72℃ 10分加温後4℃とした。*katG*, *inhA* および *inhA* promoter はDNA サンプルにPCR用試薬とプライマー 7.5 pmol 加え全量を25  $\mu$ l とし、95℃ 5分加温後95℃ 30秒, 60℃ 30秒, 72℃ 30秒のサイクルを35回繰り返し72℃ 5分加温後4℃とした。PCR産物をMagExtractor™ (東洋紡績) で精製後、BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) および ABI3137 automatic sequencer (Applied Biosystems) により、増幅に使用したプライマーにてそれぞれダイレクトシーケンシングを実施した。シーケンスの解析にはGenetyx-WIN ver. 5.2 (GENETYX Co., Japan) を使用した。

## 結 果

[RFP感受性に関するGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>とシーケンスの比較]

RFP感受性結核菌67株についてGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>の変異型検出用プローブはすべて陰性であり、野生型検出用プローブはすべて陽性でRFP感受性と判定された。また、同じ67株の*rpoB* シークエンスはすべて変異を認めなかった。MDR-TB 44株のうちGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>の変異型検出用プローブで検出できた変異は39株(88.6%)であり、野生型検出用プローブの1つ以上が陰性であることによる変異の検出も合わせると43株(97.7%)がRFP耐性と判定された。*rpoB* シークエンスで変異を認めたものは43株(97.7%)であり、RFP耐性検出率はGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>とシーケンスでは同等であった。GenoType® MTBDR<sub>plus</sub>の変異型検出用プローブで検出したものはMUT3 (S513L) が31株(70.5%), MUT1 (D516V) が5株(11.4%), MUT2B (H526D) が2株(4.5%), MUT2A (H526Y) とMUT2B (H526D) の両方が陽性であった株が1株(2.3%)であり、MUT1 (D516V) に陽性であった1株は*rpoB*のシーケンスではD516Aの変異であったが、これ以外はGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>と*rpoB* シークエンスの結果は一致した。変異型検出用プローブ陰性および野生型検出用プローブで陰性だった株

は、WT1 (505–509) 陰性1株(2.3%), WT2 (510–513) 陰性1株(2.3%), WT2, WT3およびWT4の3プローブが陰性(510–519) 2株(4.5%)であり、*rpoB* シークエンスはそれぞれ506–508の欠失, L511PとS512G, L511PとS516Gの変異を認めGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>の結果と一致した。MDR-TBのうち1株についてGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>で変異型検出用プローブ陰性、野生型検出用プローブ全陽性でRFP感受性の判定となり、*rpoB* シークエンスでもRRDRに変異は認められなかった (Table 2)。

[INH感受性に関するGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>とシーケンスの比較]

INH感受性結核菌67株についてGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>の変異型検出用プローブはすべて陰性であり、野生型プローブはすべて陽性でINH感受性の判定であった。また*katG*, *inhA* promoter, *inhA* ORFのシーケンスでは1株のみ*inhA* ORFのS94Aの変異を認めたが、その他の66株は変異を認めなかった。

MDR-TB 44株のうちGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>の変異型検出用プローブ陽性であった29株(65.9%)がINH耐性と判定された。GenoType® MTBDR<sub>plus</sub>の変異型検出用プローブは*katG* MUT1 (S315T1) 陽性が24株(54.5%), *inhA* MUT1 (C15T) 陽性が5株(11.4%)であった。変異型検出用プローブ*katG* MUT2 (S315T2), *inhA* MUT2 (A16G), MUT3A (T8C) およびMUT3B (T8A) が陽性となった株はなかった。また、*katG*と*inhA*の変異型検出用プローブが両方陽性になる株や、野生型検出用プローブが陰性であることのみによる変異の検出はなかった。これに対して、*katG*, *inhA* promoter, *inhA* ORFのシーケンスで変異を認めた株は31株(70.5%)であった。*katG* シークエンスで変異を認めたものはS315Tが24株(54.5%), G285Cが1株(2.3%), Y337Cが1株(2.3%)であった。*inhA* シークエンスで変異を認めたものは*inhA* promoter C-15Tが5株(11.4%)であり、このうち1株は*inhA* ORF T171の変異も同時に認められた。また、MDR-TB 44株のうち1株は*katG*の増幅がGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>およびシーケンスのいずれでも認められなかった (Table 2)。

GenoType® MTBDR*plus*で検出した*katG*, *inhA* promoterの変異はシークエンスの結果と一致した。

〔GenoType® MTBDR*plus*とDNAシークエンスの精度の比較〕

RFPおよびINHに対する感度, 特異度, 一致率をTable 3に示した。RFP感受性に関してGenoType® MTBDR*plus*とDNAシークエンスの感度は同程度であった。INH感受性についてはGenoType® MTBDR*plus*がDNAシークエンスと比較して感度, 一致率がやや劣るものの, 統計的有意差はなかった (Chi-square test:  $P=0.64$ )。

## 考 察

GenoType® MTBDR*plus*の精度について, MDR-TBと感受性結核菌を用いて評価した。今回の検討ではGenoType® MTBDR*plus*のRFPおよびINHの感度はそれぞれ97.7%と65.9%, 一致率は99.1%と86.5%であり, *rpoB*, *katG*, *inhA*

のダイレクトシークエンスによる方法と有意差は認められなかった。日本以外でのGenoType® MTBDR*plus*の評価は, RFP耐性の検出感度が95.5%~100%, INH耐性の検出感度が81.8%~93.1%と報告されている<sup>4) 8) ~10)</sup>。他の報告と今回の結果を比較すると, RFP感受性の診断精度は同等であるが, INH耐性の感度が劣っていた。*rpoB*のRRDR領域内における遺伝子変異は97.7%に認められており, これまでの報告<sup>6) 11) 12)</sup>と同様であった。GenoType® MTBDR*plus*は変異型検出用プローブおよび野生型検出用プローブを用いるとRRDRの変異をすべて検出できるためRFPの感度が良好であったと考えられる。INH耐性の主な変異は*katG* S315Tと*inhA* C-15Tがよく知られている。INH耐性株のうち*katG* S315T+*inhA* C-15Tの変異が占める割合は, ヨーロッパ地域の分離株を検討したHillemannら<sup>4)</sup>の報告では89.3%であり, 同様にCausseら<sup>8)</sup>は82.8%, Brossierら<sup>9)</sup>は84.2%と報告している。これに

**Table 2** GenoType® MTBDR*plus* in comparison with DNA sequencing for detection of RFP and INH resistance in 44 MDR-TB isolates

Probes	GenoType® MTBDR <i>plus</i> Mutations analyzed	DNA sequencing Mutations analyzed	No. (%) of isolates
<i>rpoB</i>			
MUT1	D516V	D511P, D516A D516V	1 ( 2.3) 4 ( 9.1)
MUT2A	H526Y		0 ( 0)
MUT2B	H526D	H526D	2 ( 4.5)
MUT3	S531L	S531L	31 (70.5)
MUT2A, MUT2B	H526Y, H526D	H526Y, H526D	1 ( 2.3)
Missing WT1	505-509	506-508 deletion	1 ( 2.3)
Missing WT2	510-513	L511P, S512G	1 ( 2.3)
Missing WT2, WT3, WT4	510-519	L511P, S516G	2 ( 4.5)
None		None	1 ( 2.3)
<i>katG</i>			
MUT1	S315T1	S315T	24 (54.5)
MUT2	S315T2		0 ( 0)
None		G285C Y337C None	1 ( 2.3) 1 ( 2.3) 17 (38.6)
No amplification		No amplification	1 ( 2.3)
<i>inhA</i>			
MUT1	C15T	C-15T, T17I	5 (11.4)
MUT2	A16G		0 ( 0)
MUT3A	T8C		0 ( 0)
MUT3B	T8A		0 ( 0)
None		None	39 (88.6)

**Table 3** Performances of GenoType® MTBDR*plus* and DNA sequencing

	RFP		INH	
	GenoType® MTBDR <i>plus</i>	DNA sequencing	GenoType® MTBDR <i>plus</i>	DNA sequencing
Sensitivity (%)	97.7	97.7	65.9	70.5
Specificity (%)	100	100	100	98.5
Efficiency (%)	99.1	99.1	86.5	87.4



対して、アジア地域分離株ではHuangら<sup>10)</sup>が69.2%, Parkら<sup>13)</sup>が67.2%, 日本では向川ら<sup>14)</sup>が59.7%, 阿部ら<sup>15)</sup>が47.9%と報告している。今回使用したINH耐性株（日本国内分離株）の*katG* S315T+*inhA* C-15Tの割合はアジア地域での報告と同程度であり（65.9%）、これらの耐性変異を検出するよう設計されているGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>のINHの感度が低い原因と考えられた。

同じように既知の変異領域を解析するシーケンス法もINH耐性に関してGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>と同程度の感度しか示さなかった。2株においてシーケンス法でのみ検出可能な変異が認められたが、有意な増加ではなく、この領域の検索のみでは対象とした結核菌のINH耐性診断は困難であることが示された。近年安藤らが日本国内で分離されたINH耐性結核菌において新たな*fabG1*, *furA*, *furA-katG* operonの変異を報告しており<sup>16)</sup>、これらの変異を検出することで耐性診断率が上昇することが期待されている。

今回の検討からGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>のRFP耐性検出能は十分であると考えられるが、INH耐性検出能は臨床的に不十分と思われた。このためGenoType® MTBDR<sub>plus</sub>で検出可能な*katG*および*inhA*の変異以外の原因で耐性となっている場合、INH感受性菌と誤って判定される。従って、GenoType® MTBDR<sub>plus</sub>でINH感受性の判定となった場合は分離株を用いた標準的薬剤感受性検査を必ず実施すべきである。しかしながら、本邦においてRFP耐性の80%以上がMDR-TBであり<sup>17)</sup>、GenoType® MTBDR<sub>plus</sub>を実施することにより同菌の迅速な推定が可能である。このことにより多剤耐性結核患者と他の結核患者が同じ室内で管理される可能性を最大限回避できると考えられ、これは感染管理上の利点と思われる。

GenoType® MTBDR<sub>plus</sub>はDNA抽出、DNA増幅、ハイブリダイゼーション、遺伝子変異の検出までを約6時間で終了できる。これは通常の薬剤感受性検査と比較すると数週間早く臨床側に結果を提供できる。今回われわれは臨床分離株を用いて検討を行ったが、塗抹陽性の臨床検体（喀痰など）を用いることも可能である。検体提出、塗抹検査、同定、GenoType® MTBDR<sub>plus</sub>による薬剤感受性検査を1～2日で行うことができ迅速検査として有用であると考えられる。

## 謝 辞

今回の検討に使用した菌株は、第13回結核療法研究協議会全国耐性結核菌サーベイにて収集された結核菌を使用しました。結核療法研究協議会に対して深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Report No. 4. WHO/HTM/TB/2008.394. Geneva, World Health Organization, 2008.
- 2) 結核予防会：「結核の統計2009」。結核予防会，東京，2009.
- 3) 佐々木結花，山岸文雄，水谷文雄，他：中高年者を中心に生じた多剤耐性結核菌による集団感染事例。結核。1999；74：549-553.
- 4) Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E: Evaluation of GenoType MTBDR<sub>plus</sub> assay for rifampicin and strains and clinical specimens. J Clin Microbiol. 2007；45：2635-2640.
- 5) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会：結核菌検査指針2007.
- 6) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin-resistance in pathogenic mycobacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1994；38：2380-2386.
- 7) Morlock GP, Metchock B, Sikes D, et al.: *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2003；47：3799-3805.
- 8) Causse M, Ruiz P, Gutierrez B, et al.: M. Evaluation of new GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> for detection of resistance in cultures and direct specimens of *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis. 2008；12：1456-1460.
- 9) Brossier F, Veziris N, Jarlier V, et al.: Performance of MTBDR<sub>plus</sub> for detecting high/low levels of *Mycobacterium tuberculosis* resistance to isoniazid. Int J Tuberc Lung Dis. 2009；13：260-265.
- 10) Huang W-L, Chen H-Y, Kuo Y-M, et al.: Performance assessment of the GenoType MTBDR<sub>plus</sub> test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2009；47：2520-2524.
- 11) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993；341：647-650.
- 12) Matsiota-Bernard P, Vrioni G, Marinis E: Characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Greece. J Clin Microbiol. 1998；36：20-23.
- 13) Park H, Song EJ, Song ES, et al.: Comparison of a conventional antimicrobial susceptibility assay to an oligonucleotide chip system for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006；44：1619-1624.
- 14) 向川 純，遠藤美代子，柳川義勢，他：薬剤耐性結核菌株の薬剤耐性パターンと遺伝子変異の解析。感染症学雑誌。2005；79：388-396.
- 15) Abe C, Kobayashi I, Mitarai S, et al.: Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance isoniazid in Japan.

J Clin Microbiol. 2008 ; 46 : 2263–2268.  
 16) Ando H, Kondo Y, Suetake T, et al.: Identification of *katG* mutation associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother.

2010 ; 54 : 1793–1799.

17) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a nationwide survey, 2002. Int J Tuberc Lung Dis. 2007 ; 11 : 1129–1135.

—————Original Article—————

EVALUATION OF GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> FOR THE DETECTION OF MULTI-DRUG-RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* STRAINS

<sup>1</sup>Kinuyo CHIKAMATSU, <sup>1</sup>Kazue MIZUNO, <sup>1</sup>Akio AONO, <sup>1</sup>Hiroyuki YAMADA,  
<sup>1</sup>Tetsuhiro SUGAMOTO, <sup>2</sup>Hiroyuki NISHIYAMA, and <sup>1</sup>Satoshi MITARAI

**Abstract** [Objective] To evaluate GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> (Hain Lifescience, Germany) for its capacity to detect the resistance of rifampicin (RFP) and isoniazid (INH).

[Method] A total of 44 confirmed multi-drug resistant (MDR) and 67 susceptible *M. tuberculosis* strains were tested for susceptibility to RFP and INH by GenoType® MTBDR<sub>plus</sub>. The core 81bp region of the *rpoB* gene and the 322bp region of the *katG* gene and the *inhA* gene (248bp of which included the promoter and the ORF of the 379bp *inhA*) were directly sequenced for both MDR-TB and susceptible *M. tuberculosis* strains, and the mutations were confirmed. Susceptibility was tested by standard proportion method with 1% Ogawa medium.

[Results] The sensitivities of GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> for RFP and INH resistance were 97.7% and 65.9%, respectively. The specificity for RFP and INH was 100%. The sensitivity of GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> was almost equivalent to the sequencing method for RFP, but that for INH was slightly inferior to the sequencing without significant difference. GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> detected 97.7% of the mutations of *rpoB* compared with the direct sequencing. It also detected 24 *katG* MUT1 (S315T1) (54.5%) and 5 *inhA* MUT1 (C15T) mutations (11.4%), while the direct sequencing detected an additional 2

(4.5%) *katG* mutants.

[Discussion] The accuracy of GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> for the detection of RFP resistance was confirmed to be comparable to that of DST using conventional culture-based methods, while it was less accurate for detection of INH resistance. GenoType® MTBDR<sub>plus</sub> is useful for early diagnosis and infection control for MDR-TB because it has a short turnaround time of approximately 6 hours.

**Key words:** Line probe assay, Rifampicin, Isoniazid, Multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB*, *katG*, *inhA*

<sup>1</sup>Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, <sup>2</sup>International Department, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Satoshi Mitarai, Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, 3-1-24, Matsuyama, Kiyose-shi, Tokyo 204-8533 Japan. (E-mail: mitarai@jata.or.jp)