

Mycobacterium lentiflavum のコバス TaqMan MAI における *Mycobacterium intracellulare* 偽陽性反応 についての遺伝子学的検討

¹富田 元久 ²吉田志緒美 ²露口 一成 ³鈴木 克洋
²岡田 全司 ³林 清二

要旨：〔目的〕臨床分離 *Mycobacterium lentiflavum* 株を対象としたコバス TaqMan MAI における偽陽性反応を検証する。〔材料と方法〕コバス アンプリコア MAV, MIN にて *Mycobacterium intracellulare* 陰性, コバス TaqMan MAI にて陽性と判定された臨床分離 13 株を用い, 10 倍希釈系列を用いてその検出感度を検証した。同時に 16S rDNA シークエンス解析による相同性の確認を行った。〔結果〕16S rDNA の前半部分 (約 600 bp) の塩基配列から, 対象株はすべて *M. lentiflavum* と同定された。これらはコバス TaqMan MAI の *M. intracellulare* 検出用プローブにのみ陽性反応を示した。無作為に抽出した菌株と *M. intracellulare* 標準株を希釈系列して作成した菌液において, コバス TaqMan MAI に感度の差が認められた。*M. intracellulare* 検出用プローブ領域における *M. intracellulare* と *M. lentiflavum* が異なる塩基は 3 カ所あるのみで, その高い相同性により *M. intracellulare* の偽陽性が生じたと推測された。〔考察〕現在わが国には *M. lentiflavum* を正確に同定できる市販キットは存在しない。臨床検体から培養されるコロニーの性状からの両者の鑑別は非常に困難である。コバス TaqMan MAI に対する偽陽性反応の影響によって *M. lentiflavum* が過小評価されている可能性が考えられた。〔結論〕わが国において比較的汎用されている抗酸菌核酸増幅法の 1 つであるコバス TaqMan MAI において *M. lentiflavum* の偽陽性反応が臨床分離株に認められた。*M. lentiflavum* の遺伝子的特徴を踏まえたうえで, 抗酸菌同定検査法の一層の改良・開発が今後望まれる。

キーワード：*Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium intracellulare*, コバス TaqMan MAI, 16S rDNA

はじめに

Mycobacterium lentiflavum は Springer らによりヒトの脊椎椎間板炎病巣や諸種臨床検体から分離された, 遅発性の抗酸菌種である¹⁾。その後, 本菌によるリンパ節炎²⁾³⁾, 中高年齢者での肺感染症が世界各地より相次いで報告されている⁴⁾⁵⁾。わが国でも, まず Iwamoto ら⁶⁾により本菌による慢性肺疾患患者の 1 症例が報告され, その後複数の感染症例が報告されている⁷⁾。環境からの感染が考えられており, 感染源の一つとして飲料水供給システムがある³⁾⁸⁾⁹⁾。従来, 本菌は生化学的性状や市販の遺伝子プローブを用いた方法では同定不能であるため,

その確定診断には 16S rDNA などの塩基配列の解析が必要である¹⁾。

コバス アンプリコア MAV, MIN (以下アンプリコア法: ロシュ・ダイアグノスティックス) は高い感度と特異度をもった同定キットである。*Mycobacterium avium* と *Mycobacterium intracellulare* は遺伝子学的に近い菌種であるにもかかわらず, アンプリコア法の検出用プローブは両菌種を特異的に検出できる。これは抗酸菌特異的プライマーにて増幅させた後, 両菌種の間にみられる微少な塩基配列の違いを識別するのに適した, 各々の検出用プローブで反応させているためである。一方, コバス TaqMan MAI (TaqMan 法: ロシュ・ダイアグノスティ

独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター¹臨床検査科, ²臨床研究センター, ³内科

連絡先: 吉田志緒美, 独立行政法人国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床研究センター, 〒591-8555 大阪府堺市北区長曾根町 1180 (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)
(Received 18 Mar. 2014/Accepted 18 May 2014)

ックス)はアンプリコア法と同様に*M. avium*と*M. intracellulare*を特異的に識別できるが、戸田らは環境から分離された*M. lentiflavum*がTaqMan法の*M. intracellulare*にのみ偽陽性を示すことを報告している¹⁰⁾。彼らはTaqMan法の蛍光標識DNAプローブの設計に問題があるのではないかと考察しているが、詳細な検証は行っていない¹⁰⁾。当センターでは2012年以降アンプリコア法からTaqMan法に変更し、*M. avium*と*M. intracellulare*に対する高い識別能を確認していたが、*M. lentiflavum*の偽陽性反応について検証してこなかった。しかし2012年の1年間で、結核菌群を除いた抗酸菌に占める同定不能Ⅱ群菌の分離頻度が減少していたことが判明した〔2011年：3.6% (15/414) → 2012年：1.5% (6/397)〕。そこで2011年に分離された*M. lentiflavum*に対してアンプリコア法ならびにTaqMan法の反応性をレトロスペクティブに検証した。加えて、希釈系列による*M. intracellulare*と*M. lentiflavum*の検出感度比較を行い、臨床現場における菌種分類の可能性を検討した。さらに、増幅ターゲットとしている16S rDNA領域における3菌種間の塩基配列を比較しTaqMan法の偽陽性反応の原因を探った。

材料と方法

〔供試菌〕

2011年1月から2011年12月にかけてNHO近畿中央胸部疾患センターの外来および病棟から提出された喀痰から分離され、アンプリコア法にて*M. intracellulare*陰性、TaqMan法にて陽性と判定された臨床分離13株を使用した。菌株が分離された患者13名の居住地は大阪府堺市以南(11株)、大阪市(2株)である。年齢構成は53～86歳(平均72.6歳)、また、13名の患者の男女比は男性9名、女性4名であった。また、同期中に分離されアンプリコア法陽性の*M. avium*2株と*M. intracellulare*3株、アンプリコア法、TaqMan法ともに陰性となりDDHマイコバクテリア「極東」(以下DDH法：極東製薬工業)にて同定不能なRunyon分類Ⅱ群菌3株を対照株とした。

これら菌株は-30℃保存されていたため、Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT：日本ベクトン・ディッキンソン)により培養し、陽性を認めた菌液を用いて、まず結核菌群同定試薬キャピリアTB(日本ベクトン・ディッキンソン)を行い、結核菌群の否定を確認した。続いて、小川培地、7H11培地上で複数菌株の混在を否定した後、得られた菌株からTaqMan法による測定を実施した。

〔DNA抽出・PCR〕

小川培地上で発育させた供試13株と対照株を無作為に釣菌し、コロニーの1白金耳よりBoil抽出したDNA 1 ngをPCR反応に使用した。抗酸菌の菌種同定に汎用さ

れている16S rDNAの可変領域を含む前半(約600 bp)の塩基配列分析を行うため、PCR反応はTakara Ex Taq(タカラバイオ)を用いて、94℃30秒(denaturation)、55℃30秒(annealing)、72℃1分(extension)を35サイクル行い、下記のプライマーセットを用いてPCR増幅産物を得た¹¹⁾〔プライマーセット：285F(5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3')、264R(5'-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3')〕。

〔塩基配列解析〕

PCR産物をスピンカラム(SUPREC-02、タカラバイオ)で精製しダイレクトシーケンスに用いた。ダイレクトシーケンスは、BigDye Terminator Ready Reaction Cycle Sequencingキット(Applied Biosystems Japan)を用いて、ABI 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems Japan)で行った。シーケンスプライマーは259R(5'-TTT CAC GAA CAA CGC GAC AA-3')を用いた。

M. lentiflavum、*M. avium*、*M. intracellulare*について得られた塩基配列上で、アンプリコア法で用いるプライマー(Forward, Reverse)と*M. avium*と*M. intracellulare*の検出用プローブが相補する領域を検索し、*M. lentiflavum*に対するマッチングを確認した。プライマーとプローブの配列は以下のとおりである¹²⁾。

Forwardプライマー (KY18)：

5'-CAC ATG CAA GTC GAA CGG AAA GG-3'

Reverseプライマー (KY75)：

5'-GCC CGT ATC GCC CGC ACG CTC ACA -3'

*M. avium*検出用プローブ (KY167)：

5'-CAA GAC GCA TGT CTT CTG GTG-3'

*M. intracellulare*検出用プローブ (KY169)：

5'-TTA GGC GCA TGT CTT TAG GT-3'

〔TaqMan MAI検出感度の検証〕

供試13株のうち無作為に抽出した*M. lentiflavum*1株と*M. intracellulare*標準菌株(ATCC13950)を用いた。測定サンプルの調整は、MGIT陽性培養液を滅菌蒸留水でMcFarland No. 1.0(3×10⁸CFU/mL)に調製した菌液をもとに、4℃に冷却した滅菌蒸留水で10倍希釈した系列を用い、TaqMan法の添付文書に従って最小検出感度を求めた。作成した希釈菌液は3回の反復測定を行い、3回とも同じ結果となる濃度を最終の最小検出感度とした。

結 果

〔塩基配列解析〕

供試13株の16S rDNA塩基配列は、*M. lentiflavum* ATCC 51985^T基準株(アクセッション番号X80769)と100%一致した。*M. avium*2株はATCC 51985^T株と、*M. intracellulare*3株はATCC 13950株と100%の相同性を示した。対照のⅡ群菌株は*M. intermedium*2株、*M. interjectum*1株と

同定された (Table 1)。

Fig. に、アンプリコ法で用いるプライマーとプロープの領域を上記 3 菌種の塩基配列パターン上に示した。Forward プライマー領域 (ポジション 7-29) は 3 菌種とも 100% 相補性が保たれていたが、Reverse プライマー (ポジション 552-575) では *M. lentiflavum* の配列に 4 塩基の違いが認められた。検出用プローブが反応する領域 (ポジション 135-155) での *M. avium* と *M. intracellulare* の塩基配列の違いは 5 塩基、*M. avium* と *M. lentiflavum* との間では 6 塩基、*M. intracellulare* と *M. lentiflavum* との間には 3 塩基認められた。

[TaqMan 法における最小検出感度の検証]

M. lentiflavum は 3×10^4 CFU/mL, *M. intracellulare* は 3×10^2 CFU/mL 菌液濃度の検体に対して陽性反応が認められ、*M. lentiflavum* と *M. intracellulare* の TaqMan 法における最小検出感度の違いが示された (Table 2)。

考 察

今回の供試菌 13 株は 16S rDNA 塩基配列解析の結果、すべて *M. lentiflavum* と同定された。超可変領域を含む

16S rDNA の前半 (約 600 bp) の解析によって同菌と *M. avium*, *M. intracellulare* の識別は可能であり¹⁾, そこに相当する領域を増幅するアンプリコ法のプライマー (KY 18, KY75) は、抗酸菌の菌種同定において感度・特異度が優れていることは明らかである¹²⁾。今回、アンプリコ法の増幅領域内での *M. lentiflavum* と *M. intracellulare* の塩基配列の差異は *M. lentiflavum* の欠損部分のほかに *M. lentiflavum* の塩基配列上の 135-155 のポジションとポジション 552 付近に存在していた (Fig.)。前者はアンプリコ法の検出プローブ部分、後者は Reverse プライマーが菌体の塩基配列を認識する部分に相当する。この Reverse プライマーは 24 mer で設計されており、塩基配列の 3 末端部分に位置する 4 塩基が *M. lentiflavum* ではミスマッチとなってしまいうため PCR 反応が不十分となる。したがって、*M. lentiflavum* は増幅されなかった可能性が高くなり、結果的にアンプリコ法での *M. lentiflavum* がすべて陰性となった要因と思われる (Table 1)。一方、TaqMan 法ではプライマー等の塩基配列が明らかになっていないため詳細は不明であるが、プライマーやプローブの結合する領域の *M. intracellulare* と *M. lentiflavum* の塩

Table 1 Comparison of misidentification Mycobacterial species using COBAS AmpliCor MIN and COBAS TaqMan MAI

Sample ID	COBAS AmpliCor MIN	COBAS TaqMan MAI	16S rDNA sequence
	MIN	MIN	
65	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
79	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
86	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
88	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
89	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
90	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
92	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
93	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
94	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
95	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
96	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
97	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
100	(-)	(+)	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
80	(-)	(-)	<i>Mycobacterium intermedium</i>
91	(-)	(-)	<i>Mycobacterium interjectum</i>
99	(-)	(-)	<i>Mycobacterium intermedium</i>

MIN: *M. intracellulare*

Table 2 Comparison of minimum detection of colony forming unit per mL COBAS TaqMan MAI to detect for random sampling *M. lentiflavum* and *M. intracellulare* reference strain

Sample (CFU/mL)	MIN	Sample (CFU/mL)	MIN
<i>M. lentiflavum</i> 3×10^5	MIN (+)	<i>M. intracellulare</i> 3×10^5	MIN (+)
<i>M. lentiflavum</i> 3×10^4	MIN (+)	<i>M. intracellulare</i> 3×10^4	MIN (+)
<i>M. lentiflavum</i> 3×10^3	(-)	<i>M. intracellulare</i> 3×10^3	MIN (+)
<i>M. lentiflavum</i> 3×10^2	(-)	<i>M. intracellulare</i> 3×10^2	MIN (+)
<i>M. lentiflavum</i> 3×10^1	(-)	<i>M. intracellulare</i> 3×10^1	(-)
<i>M. lentiflavum</i> 3	(-)	<i>M. intracellulare</i> 3	(-)

MIN: *M. intracellulare*

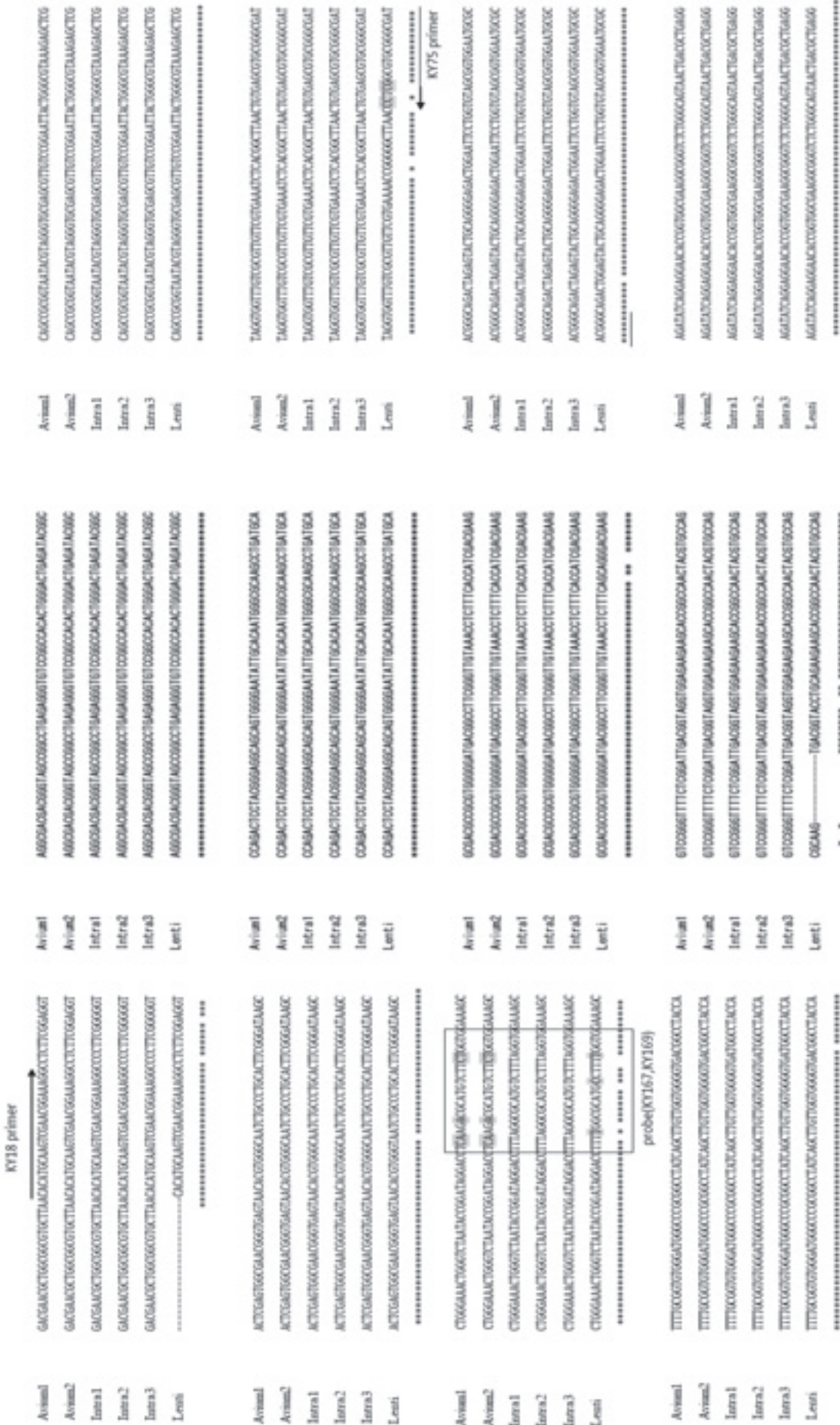


Fig. Nucleotide sequences of the 16S rDNA segments of 3 mycobacterial species. The first and last nucleotides of *M.lentiflavum* correspond to *E.coli* 16S rDNA positions 7 and 690, respectively. Same nucleotides from those in the *M.lentiflavum* sequence are shown by asterisks (*); dashes (-) indicate deletions. For comparison, nucleotides differentiating the proposed *M.lentiflavum* species from *M.intracellulare* are indicated by spaces, variable nucleotide positions within probe and primer are gray color characters.

Avium: *M.avium*, Intra: *M.intracellulare*, Lenti: *M.lentiflavum*

基配列に違いが少ないと推測される。リアルタイムPCRを原理とするTaqMan法で増幅される産物は概ね150 bpと従来のPCR法より小さく、アンプリコア法の増幅領域より狭くなる。したがってTaqMan法のプライマーはアンプリコア法のプライマー設計から変更することが必要となると思われる。アンプリコア法のReverseプライマーと同じ領域を認識するTaqMan-Reverseプライマーを設計したならば、ポジション400-550の領域内で*M. avium*と*M. intracellulare*を認識する必要があるが、この部分には塩基配列の違いがほとんどないためTaqMan法には不適であろう。一方、TaqMan-Forwardプライマーをアンプリコア法と同じ領域(ポジション7-29)に設計すればTaqMan-Reverseプライマーを180付近のポジションに設定でき、*M. avium*と*M. intracellulare*を認識できるポジション135-155を含むことから、これらの識別は可能となる。しかし、TaqMan-Reverseプライマーでは*M. lentiflavum*に対して相補性が向上し、*M. avium*, *M. intracellulare*と同様に増幅が可能となったと推測する。

検出用プローブはマイクロ磁性粒子を固相したアンプリコア法と5'末端に消光物質(クエンチャー)、3'末端側に蛍光色素(レポーター)で修飾されたTaqMan法の違いはあるが、同じく20~30 merの長さの短いオリゴヌクレオチドで、相補的な配列を特異的に認識する特徴がある¹²⁾。特に*M. avium*と*M. intracellulare*検出用プローブは各々の菌種に対する配列の特異性が非常に高く、高いホモロジーを有するこれらの配列間であっても5塩基の違いなら認識することが可能であると言われている¹²⁾。しかし、同プローブの領域では*M. avium*と*M. lentiflavum*に6カ所の塩基配列が異なるため識別できていたにもかかわらず、*M. intracellulare*と*M. lentiflavum*では3カ所しかなかった。このことからTaqMan法では*M. lentiflavum*と*M. intracellulare*を識別できなかったと推察される。今回の*M. lentiflavum*の偽陽性反応は情報公開が少ない中での検討であるため、明確な結論を示すことができないが、これらの菌種間の遺伝子的特徴を論ずることにより、今後の検査法の改良ならびに新規抗酸菌同定法の開発の一助になることを期待する。

TaqMan法最小検出感度の検討では、*M. lentiflavum*と*M. intracellulare*の間で100倍の違いが認められた(Table 2)。おそらく、プローブの相補性が*M. intracellulare*を対象として設計されているため、3塩基異なる*M. lentiflavum*では同プローブとの相補効率が劣り、感度が低下したのではないかと考えられた。シークエンス解析が日常的でない臨床の現場において、今回行った希釈判定法を用いれば少なくとも*M. lentiflavum*と*M. intracellulare*の識別は可能ではないかと考えられるが、検体を用いたTaqMan法での菌濃度による反応の違いを今回検討でき

ていないため、あくまでも培養菌を用いた場合にのみ運用が見込まれるという結果でしかない。しかも菌株数が少ないため、今後追試を行う必要があると考える。

*M. lentiflavum*はRunyon分類のⅡ群菌に属する遅発育菌であり、典型的なコロニーは暗所内培養でオレンジ色か黄色に着色している。非光発色性Ⅲ群菌の*M. avium*, *M. intracellulare*の特徴であるクリーム色コロニーと同菌種は、本来、性状の観察をもって鑑別は可能である。しかしながら、臨床の現場では着色性を有した*M. avium*や*M. intracellulare*は決して珍しくなく、マニュアル検査であるコロニー観察は熟練性が要求されることもあり、実際にはこれらの識別を行うことは非常に困難である。特にMGITなど液体培地からの菌液に対してTaqMan法で直接同定することは、コロニー観察という手順を省いてしまうため注意を要する。液体培養での*M. lentiflavum*の発育速度は遅い傾向があるという報告²⁾があるが症例数が少ないため、今後のデータの蓄積が求められる。

結核菌群を除く抗酸菌中に占める*M. lentiflavum*の割合については、いくつかの論文で述べられている。オランダのvan Ingenらは2240株の臨床分離菌を検査した結果、*M. lentiflavum*は11株(0.5%)であったとし、*M. intracellulare*の201株(9.0%)に比べてまれな菌種と位置付けられている¹³⁾。BuijtselsらはZambiaの213患者から排菌された抗酸菌を調べた結果、38の*M. lentiflavum*症例から55菌株が得られたと報告している⁴⁾。わが国では長野らの報告によると、全国から集計した636株の抗酸菌を検討した結果*M. lentiflavum*は14株(2.2%)であったとしている¹⁴⁾。隔年ではあるが、当センターの*M. lentiflavum*株数と抗酸菌株の割合は15/494(3.0%:2005年)、12/489(2.5%:2006年)、13/414(3.1%:2011年)であった。当センターにおいてアンプリコア法を含む市販キットにて同定できないⅡ群菌(*M. lentiflavum*を含む)の推移は、16株(2005年)、16株(2006年)、15株(2011年)であり、*M. lentiflavum*は高い割合を占めていた。一方、同時期に分離された*M. intracellulare*は順に112株(22.7%)、109株(22.3%)、113株(27.3%)であり大きな変動はなかった。しかしながら、TaqMan法を運用し始めた2012年では抗酸菌397株のうちⅡ群菌の割合は6株(1.5%)と減少し、*M. intracellulare*は110株(27.7%)と微増した。これら6株は16S rDNA解析で*M. lentiflavum*とは同定されなかったため、*M. intracellulare*と同定された株の中に*M. lentiflavum*が含まれている可能性が考えられた(データ未掲載)。偽陽性となった株に対してclarithromycinを含めた薬剤感受性検査が実施され、患者に*M. avium* complexの治療が施されていた可能性が充分推測される。

*M. intracellulare*の病原性は高い傾向があるが、*M. lentiflavum*のそれとは異なることが既存のデータから示され

ている¹⁾⁸⁾¹⁵⁾。Springerら(ドイツ)は、*M. lentiflavum*の基準株としたATCC 51985^T株は脊椎椎間板炎病巣から分離され、その病原的意義を認めているが、同時にATCC 51986株、ATCC 51987株、ATCC 51988株をはじめとしてその他の供試18株は検体から偶発的に、あるいは汚染された気管支鏡から繰り返し分離され、病原的意義はないだろうと述べている¹⁾。Tortoliら(イタリア)によるレトロスペクティブな検討では、臨床材料からの本菌の検出例のうち臨床的な意義が確認されたのは約10%程度であったという¹⁵⁾。Marshallら(オーストラリア)は4名の*M. lentiflavum*症患者から得られた菌株と、13カ所の飲料水供給装置から分離された株の遺伝子型が近似なことから、水道水からの感染の可能性を述べている³⁾。また、環境からの分離では、韓国ではLeeらが84カ所の供給施設を調査したところ、26%の施設から非結核性抗酸菌(NTM)が分離され、そのうち*M. lentiflavum*は65%を占めていたという¹⁶⁾。Torvinenらはフィンランドの水道水供給施設の80%にNTMが分離され、そのうち*M. lentiflavum*の分離頻度は38%の第2位であったとしている⁹⁾。同じくフィンランドのTsitkoらは飲料水供給施設内のバイオフィームからの分離株と臨床分離株との比較で、環境由来株5株中4株はATCC 51988株と同一の16S rDNA塩基配列を示したのに対して、病原的意義のあると思われる臨床分離株では6株すべてがATCC 51985^T株と同一の16S rDNA塩基配列を示したという⁸⁾。わが国では、戸田らはATCC株で見られるSmooth型コロニーではなくRough型コロニーを形成する菌株が環境から分離されたとし¹⁰⁾、彼らは採痰ブースを起点とする*M. lentiflavum*によるPseudo-outbreakも経験している¹⁷⁾。今回の検討では、すべての菌株はヒトに対する病原的意義のあったとされるATCC 51985^T株と同一のSmooth型コロニー形状と16S rDNA塩基配列を有していた。これらの結果は菌株数が少ないため限定的であるが、わが国と諸外国との間で*M. lentiflavum*の地域特異性の存在が示唆される結果となった。しかしながら、当センターは戸田らの所属する医療機関と同じ大阪府堺市を所在地とするため、*M. lentiflavum*の地域特異性を明らかにするのは困難である。今後、異なる地域からの臨床分離株・環境分離株でのTaqMan法に関するデータが蓄積されれば、今後開発が期待される新しい遺伝子プローブによる本菌の迅速同定法の信頼性を高めるうえで重要な知見となるであろう。また、地域特異性・臨床的意義などとの関連性が明確になると期待される。

今回、わが国で比較的汎用されている抗酸菌核酸増幅法のコバスTaqMan MAIにおいて*M. lentiflavum*の偽陽性反応が臨床分離株に認められることが明らかとなった。*M. lentiflavum*の遺伝子の特徴を踏まえたうえで、今後、

抗酸菌同定検査法の一層の改良・開発を期待したい。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関して特になし。

文 献

- 1) Springer B, Wu WK, Bodmer T, et al.: Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1100-1107.
- 2) Piersimoni C, Goteri G, Nista D, et al.: *Mycobacterium lentiflavum* as an emerging causative agent of cervical lymphadenitis. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3894-3897.
- 3) Marshall HM, Carter R, Torbey MJ, et al.: *Mycobacterium lentiflavum* in drinking water supplies, Australia. Emerg Infect Dis. 2011; 17: 395-402.
- 4) Buijtel PCAM, Petit PLC, Verbrugh HA, et al.: Isolation of nontuberculous mycobacteria in Zambia: eight case reports. J Clin Microbiol. 2005; 43: 6020-6026.
- 5) Molteni C, Gazzola L, Cesari M, et al.: *Mycobacterium lentiflavum* infection in immunocompetent patient. Emerg Infect Dis. 2005; 11: 119-122.
- 6) Iwamoto T, Sonobe S, Hayashi K, et al.: A chronic pulmonary disease caused by *Mycobacterium lentiflavum* in a patient with a history of pulmonary tuberculosis. Clin Microbiol Newsl. 2003; 25: 79.
- 7) 岩本朋忠, 中永和枝, 石井則久, 他: *Mycobacterium lentiflavum* の菌種内塩基配列変異に関する研究. 結核. 2008; 83: 417-422.
- 8) Tsitko I, Rakhila R, Priha O, et al.: Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. FEMS Microbiol Lett. 2006; 256: 236-243.
- 9) Torvinen E, Suomalainen S, Lehtola MJ, et al.: Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 1973-1981.
- 10) 戸田宏文, 山口逸弘, 鹿住祐子, 他: 環境由来*Mycobacterium lentiflavum*に対するコバスTaqMan MAI偽陽性反応の検討. 感染症学雑誌. 2013; 87: 215-217.
- 11) Edwards U, Rogall T, Blocker H, et al.: Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Res. 1989; 17: 7843-7853.
- 12) Emler S, Feldmann K, Giacuzzo V, et al.: Multicenter evaluation of a pathogenic mycobacterium screening probe. J Clin Microbiol. 2001; 39: 2687-2689.
- 13) van Ingen J, van der Laan T, Dekhuijzen R, et al.: In vitro drug susceptibility of 2275 clinical non-tuberculous Mycobacterium isolates of 49 species in the Netherlands. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35: 169-173.
- 14) 長野 誠, 市村禎宏, 伊藤伸子, 他: 16S rRNA 遺伝子およびITS-1領域をターゲットとしたInvader法による23

- 菌種の抗酸菌の同定—臨床分離株を用いたDDH法との比較検討. 結核. 2008 ; 83 : 487-496.
- 15) Tortoli E, Bartoloni A, Erba ML, et al.: Human infections due to *Mycobacterium lentiflavum*. J Clin Microbiol. 2002 ; 40 : 728-729.
- 16) Lee E-B, Lee M-Y, Han S-H, et al.: Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. J Microbiol Biotechnol. 2008 ; 18 : 1207-1215.
- 17) 戸田宏文, 山口逸弘, 鹿住祐子, 他: 採痰ブース内水道水を介した *Mycobacterium lentiflavum* による Pseudo-Outbreak の分子疫学的解析. 環境感染誌. 2013 ; 28 : 319-324.

————— Original Article —————

GENETIC ANALYSIS REVEALS MISIDENTIFICATION OF
MYCOBACTERIUM LENTIFLAVUM AS *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE*
BY THE COBAS TaqMan MAI TEST

¹Motohisa TOMITA, ²Shiomi YOSHIDA, ²Kazunari TSUYUGUCHI, ³Katsuhiro SUZUKI,
²Masaji OKADA, and ³Seiji HAYASHI

Abstract [Objective] To evaluate COBAS TaqMan MAI test misidentification of *Mycobacterium lentiflavum* as *Mycobacterium intracellulare*.

[Materials and Methods] Preliminary comparative analysis identified 13 clinical isolates used in this study as COBAS Amplicor MAV and MIN-negative but COBAS TaqMan MAI-positive. The COBAS TaqMan MAI test limit of detection and reproducibility were evaluated by tenfold dilution series from 3×10^8 CFU/mL. Isolate 16S rDNA nucleotide sequences were compared with *Mycobacterium avium* and *M.intracellulare*.

[Results] Discrepancies were observed between isolates identified as *M.lentiflavum* by 16S rDNA sequencing and as *M.intracellulare* by the COBAS TaqMan MAI test. The false-positive results were verified by sequence comparison of a randomly sampled clinical isolate and the *M.intracellulare* reference strain. Sequence analysis of *M.lentiflavum* and *M.intracellulare* 16S rDNA amplification products showed at least 3 mismatches between species. The high identity in the sequence was found for *M.intracellulare* by COBAS TaqMan

MAI.

[Conclusion] In Japan, commercially available nucleic acid probe- and amplification-based tests cannot identify *M.lentiflavum*. Correct identification, though challenging, is possible using standard cultivation procedures for colony growth. Misleading results using the COBAS TaqMan MAI kit may lead to erroneous diagnoses.

Key words : *Mycobacterium lentiflavum*, *Mycobacterium intracellulare*, COBAS TaqMan, 16S rDNA

¹Department of Clinical Laboratory, ²Clinical Research Center, ³Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center

Correspondence to: Shiomi Yoshida, Clinical Research Center, National Hospital Organization Kinki-chuo Chest Medical Center, 1180 Nagasone-cho, Kita-ku, Sakai-shi, Osaka 591-8555 Japan. (E-mail: dustin@kch.hosp.go.jp)