

GenoType® MTBDR_{sl}による結核菌の fluoroquinolone, aminoglycoside および ethambutol 感受性検査に関する精度評価

近松 絹代 青野 昭男 山田 博之 御手洗 聡

要旨：〔目的〕 Line Probe Assay (LPA) の一種である GenoType® MTBDR_{sl} (Hain Lifescience, Germany) の, fluoroquinolone (FQ), aminoglycoside (AG) および ethambutol (EB) の耐性検出能を評価した。〔方法〕 臨床分離超多剤耐性結核菌 (XDR-TB) 13 株, 多剤耐性結核菌 (非超多剤) (MDR-TB) 29 株, 全薬剤感受性結核菌 4 株および薬剤感受性検査外部精度保証プログラムで使用した結核菌 30 株合計 76 株を対象とし GenoType® MTBDR_{sl} による FQ, AG および EB の耐性検査精度を検討した。また, *gyrA*, *rrs* および *embB* 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_{sl} による FQ, kanamycin (KM), amikacin (AMK), capreomycin (CPM) および EB の耐性検出感度は, それぞれ 82.4%, 57.1%, 100%, 83.3% および 55.8% であった。同様に, 特異度は FQ が 97.6%, KM, AMK, CPM, および EB がそれぞれ 100%, 一致率はそれぞれ 90.8%, 80.3%, 100%, 93.3% および 75.0% であった。国内で分離された FQ 耐性結核菌 20 株のうち GenoType® MTBDR_{sl} で耐性を検出したものは MUT3A (D94A) が 7 株 (35.0%), MUT3C (D94G) が 6 株 (30.0%), MUT1 (A90V) が 2 株 (10.0%), MUT1 と MUT3C 両方とも陽性が 1 株 (5.0%) であった。同様に KM 耐性結核菌 18 株のうち GenoType® MTBDR_{sl} で耐性を検出したものは MUT1 (A1401G) が 10 株 (55.6%) であった。EB 耐性結核菌 34 株のうち GenoType® MTBDR_{sl} で耐性を検出したものは MUT1B (M306V) が 9 株 (26.5%), MUT1A (M306I) が 2 株 (5.9%), 野生型プローブ WT1 (codon 306) のバンドの消失のみによるものが 8 株 (23.5%) であった。*embB* のシーケンスは GenoType® MTBDR_{sl} で検出した 19 株以外に D328Y を 2 株, D354A, G406D, G406S の変異をそれぞれ 1 株ずつ検出した。日本国内分離株に関する GenoType® MTBDR_{sl} の遺伝子変異検出感度は, FQ, KM, AMK, CPM ではシーケンスとほぼ同等であり, EB ではシーケンスよりもやや劣るものの有意差はなかった。〔考察〕 GenoType® MTBDR_{sl} は国内分離については KM および EB 耐性の感度が劣るものの, FQ では約 80% の耐性検出感度が確認された。GenoType® MTBDR_{sl} は操作が簡便で, 検査時間も約 6 時間と短いため, 超多剤耐性結核の早期診断に有用であると考えられた。

キーワード： Line Probe Assay, Fluoroquinolone, Aminoglycoside, Ethambutol, *gyrA*, *rrs*, *embB*, 多剤耐性結核菌, 超多剤耐性結核菌

はじめに

多剤耐性結核菌 (Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: MDR-TB) および超多剤耐性結核菌 (Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: XDR-TB)

は不適切な治療によって生じることから, 治療開始時には適切な検体からの薬剤感受性検査が必要である。国内の全国調査で MDR-TB 中 XDR-TB の割合は 28.3~28.6% であり^{1,2)}, 二次薬についても迅速な薬剤感受性検査は治療, 感染管理上重要である。しかし薬剤感受性検査の結

果を得るには菌の発育を認めてから液体培地を使用する方法で4~12日、1%小川培地を使用する標準法は4~6週間かかる。そのため、迅速診断法として薬剤耐性に関連する遺伝子変異を検出する方法が用いられている。しかしシーケンス法は一般検査室では実施が難しいため簡便で迅速なSolid Phase Reverse Hybridization Assay (Line Probe Assay: LPA) がよく使用されている。現在日本で唯一保険適用のあるLPAであるジェノスカラー・RifTB (ニプロ) は *rpoB* 変異が集中している Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR) 領域の変異から rifampicin (RFP) 耐性を判定する。また、世界的に多く利用されているLPAである GenoType® MTBDR_{plus} (Hain Lifescience, Germany) は、*rpoB*, *katG* および *inhA* promoter の変異から RFP と isoniazid (INH) の耐性を同時に検出する。しかし、二次抗結核薬と ethambutol (EB) の薬剤感受性検査のためのLPAはこれまでなかった。GenoType® MTBDR_{sl} (Hain Lifescience, Germany) は fluoroquinolone (FQ), aminoglycoside (AG) および EB 耐性に関する *gyrA*, *rrs* および *embB* 遺伝子変異を検出するLPAである。今回、標準的薬剤感受性検査と GenoType® MTBDR_{sl} 法、*gyrA/rrs/embB* のDNAダイレクトシーケンス法による耐性菌検出法を比較し、GenoType® MTBDR_{sl} による FQ, AG および EB に関する耐性の診断精度を評価した。

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 XDR-TB 13株, MDR-TB 29株, 2010年に結核予防会複十字病院で分離された抗結核薬全剤感受性である結核菌4株および Supra-national Reference Laboratory Network (SRLN 29施設) で実施された薬剤感受性検査外部精度評価プログラムで使用した結核菌30株を対象とした。

〔薬剤感受性検査〕

比率法による薬剤感受性検査は1%小川培地または Löwenstein-Jensen 培地を用いて、結核菌検査指針2007に従って結核研究所にて2名で実施した。毎年パネルテストにより精度保証を行っている。国内で分離された結核菌は levofloxacin (LVFX), kanamycin (KM) および EB, 薬剤感受性検査外部精度評価プログラムで使用した結核菌は ofloxacin (OFLX), KM, amikacin (AMK), capreomycin (CPM) および EB について薬剤感受性検査を実施した。

〔GenoType® MTBDR_{sl}〕

GenoType® MTBDR_{sl} による判定は使用説明書に従って行った。GenoType® MTBDR_{sl} は PCR にて増幅した各遺伝子をプローブが固相化されたストリップにハイブリ

ダイズさせた後、酵素標識ストレプトアビジンを添加してビオチン-アビジン結合を行い洗浄後基質を添加し、酵素反応により各遺伝子が結合し発色したプローブの位置から各遺伝子内の変異を検出する。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 *gyrA*, *rrs*, *embB* 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 (TwinCubator: 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 *gyrA* 3種類, *rrs* 2種類, *embB* 1種類, 変異型は *gyrA* 6種類, *rrs* 2種類, *embB* は2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 *gyrA*, *rrs*, *embB* の変異遺伝子型 (変異の有無) を判定した。

〔*gyrA*, *rrs* および *embB* の塩基配列解析〕

gyrA, *rrs* および *embB* の増幅およびダイレクトシーケンスについては Sekiguchi ら³⁾ のプライマー (Table 1) を使用した。すなわち *gyrA* は Fluoroquinolone Resistance Determining Region (QRDR) を含む 398 bp, *rrs* は 1329 bp を増幅後 nucleotide 1401, 1484 を含む領域, *embB* は 2748 bp を増幅後 codon 306 を含む領域をシーケンスした。DNA サンプル 1 μ l に EX Taq HS (タカラバイオ) 0.25 μ l, プライマー 10 pmol, buffer, dNTPs を加え全量 50 μ l とし, 98°C 10秒, 62°C 30秒, 72°C 1~2分のサイクルを30回繰り返した。PCR 産物を MagExtractor™ (東洋紡績) で精製後, BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) および ABI 3137 automatic sequencer (Applied Biosystems) により, それぞれの領域についてダイレクトシーケンスを実施した。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

〔FQ 感受性に関する GenoType® MTBDR_{sl} とシーケンスの比較〕

FQ 感受性結核菌42株のうち41株 (97.6%) は GenoType® MTBDR_{sl} で FQ 感受性と判定され, *gyrA* シーケンスでも変異は認められなかった。1株 (2.4%) は野生型プローブ WT1 (codon 85-90) が消失し FQ 耐性と判定された。また, *gyrA* では G88C の変異を認め GenoType® MTBDR_{sl} の結果と一致した。FQ 耐性の34株のうち28株 (82.4%) は GenoType® MTBDR_{sl} で FQ 耐性と判定され, *gyrA* に変異を認めたものは28株 (82.4%) であった。被験 FQ 耐性結核菌のうち国内で分離された結核菌は20

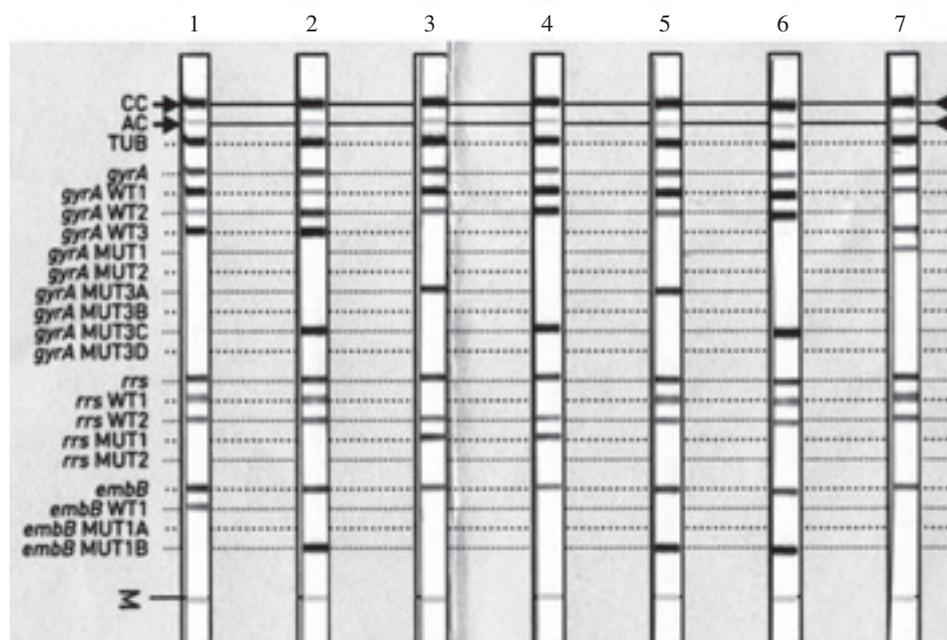


Fig. Hybridization patterns observed in GenoType® MTBDRsl assay. CC, conjugate control; AC, amplification control; TUB, *M.tuberculosis* complex-specific control; *gyrA*, control for *gyrA* amplification; *gyrA* WT1 to WT3, *gyrA* wild-type probes located in regions from codons 85 to 97; *gyrA* MUT1 to MUT3D, *gyrA* mutant probes testing mutations for codons A90V, S91P, D94A, D94N/Y, D94G, and D94H; *rrs*, control for *rrs* amplification; *rrs* WT1 and WT2, *rrs* wild-type probes located in regions for nucleotides 1401 and 1402 and nucleotide 1484; *rrs* MUT1 and MUT2, *rrs* mutant probes testing mutations for A1401G and G1484T; *embB*, amplification control for *embB*; *embB* WT1, *embB* wild-type probe located in codon 306; *embB* MUT1A and MUT1B, mutant probes testing mutations M306I and M306V. Typical hybridization patterns were obtained and are shown in the figure as follows: lane 1=Representative patterns of a pan-susceptible strain; lane 2=*gyrA* mixtures of strain, *gyrA* WT and *gyrA* MUT3C (D94G), *embB* MUT1B (M306V); lane 3=*gyrA* MUT3A (D94A), *rrs* MUT1 (A90V), *embB* WT1 disappearing (306); lane 4=*gyrA* MUT3C (D94G), *rrs* MUT1 (A1401G), *embB* WT1 disappearing (306); lane 5=*gyrA* MUT3A (D94A), *embB* MUT1B (M306V); lane 6=*gyrA* MUT3C (D94G), *embB* MUT1B (M306V); lane 7=*gyrA* MUT1 (A90V), *embB* WT1 (306) disappearing.

Table 1 Oligonucleotide primers used in PCR and direct sequencing

Target gene	Primer name	Nucleotide sequence (5'-3')
PCR primers		
<i>gyrA</i>	PR15 (forward)	GAT GAC AGA CAC GAC GTT GC
	PR16 (reverse)	GGG CTT CGG TGT ACC TCA T
<i>rrs</i>	PR13 (forward)	AAA CCT CTT TCA CCA TCG AC
	PR14 (reverse)	GTA TCC ATT GAT GCT CGC AA
<i>embB</i>	PR7 (forward)	CCG ACC ACG CTG AAA CTG CTG GCG AT
	PR8 (reverse)	GCC TGG TGC ATA CCG AGC AGC ATA G
Sequencing primers		
<i>gyrA</i>	PR15	GAT GAC AGA CAC GAC GTT GC
<i>rrs</i>	PR31	GTT CGG ATC GGG GTC TGC AA
<i>embB</i>	PR23	ACG CTG AAA CTG CTG GCG AT

株であり、内訳をTable 2に示した。FQ耐性検出率は80.0%であった。

[AG感受性に関するGenoType® MTBDRslと*rrs*シーケンスの比較]

KM感受性結核菌41株すべてGenoType® MTBDRslはAG感受性の判定であった。また、*rrs*にも変異は認め

られなかった。KM耐性結核菌35株のうちGenoType® MTBDRslの変異型プローブが陽性であった20株(57.1%)がAG耐性と判定された。AMK感受性結核菌20株すべてGenoType® MTBDRslはAG感受性の判定であった。AMK耐性結核菌10株(100%)すべてGenoType® MTBDRslはAG耐性の判定であった。CPM感受性結核菌18株す

Table 2 GenoType® MTBDR_{sl} in comparison with DNA sequencing for the detection of LVFX, KM and EB resistances in clinical *M. tuberculosis* isolates in Japan

	DST	GenoType® MTBDR _{sl}		DNA sequencing	No.(%) of isolates		
		Probes	Mutations analyzed	Mutations analyzed	XDR-TB (13)	MDR-TB (29)	S-TB (4)
<i>gyrA</i>	LVFX ^r	MUT1 (+)	A90V	A90V	1 (7.7)	1 (3.4)	
	LVFX ^r	MUT1 (+), MUT3C (+), WT2 (+), WT3 (+)	A90V*, D94G*	G88A*, A90V*, D94G*	1 (7.7)		
	LVFX ^r	MUT3A (+)	D94A	D94A	5 (38.5)	2 (6.9)	
	LVFX ^r	MUT3C (+)	D94G	D94G	3 (23.1)	2 (6.9)	
	LVFX ^r	MUT3C (+), WT3 (+)	D94G*	G88A*, D94G*	1 (7.7)		
	LVFX ^r	None		None	2 (15.4)	2 (6.9)	
	LVFX ^s	Missing WT1	85-90	G88C		1 (3.4)	
	LVFX ^s	None		None		21 (72.4)	4 (100)
<i>rrs</i>	KM ^r	MUT1 (+)	A1401G	A1401G	10 (76.9)		
	KM ^r	None		None	3 (23.1)	5 (17.2)	
	KM ^s	None		None		24 (82.8)	4 (100)
<i>embB</i>	EB ^r	MUT1A (+)	M306I (ATG → ATA)	M306I (ATG → ATA)		2 (6.9)	
	EB ^r	MUT1B (+)	M306V	M306V	1 (7.7)	7 (24.1)	
	EB ^r	MUT1B (+)	M306V	M306V, E378A		1 (3.4)	
	EB ^r	Missing WT1	306	M306I (ATG → ATC)	7 (53.8)	1 (3.4)	
	EB ^r	None		D328Y	2 (15.4)		
	EB ^r	None		D354A		1 (3.4)	
	EB ^r	None		G406D		1 (3.4)	
	EB ^r	None		G406S		1 (3.4)	
	EB ^r	None		None	2 (15.4)	8 (27.6)	
	EB ^s	None		E378A			1 (25.0)
	EB ^s	None		None	1 (7.7)	7 (24.1)	3 (75.0)

*Wild type and mutation type

DST: Drug Susceptibility Testing, XDR-TB: Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

MDR-TB: Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, S-TB: Susceptible *Mycobacterium tuberculosis*

べてGenoType® MTBDR_{sl}はAG感受性の判定であった。CPM耐性結核菌12株のうち10株(83.3%)がGenoType® MTBDR_{sl}でAG耐性と判定された。KM, AMK, およびCPMのいずれかが耐性の36株のうち*rrs*に変異を認めたものは計20株(55.6%)であった。

被験KM耐性結核菌のうち国内で分離された結核菌は18株であり、内訳をTable 2に示した。KMの耐性検出率は55.6%であった。GenoType® MTBDR_{sl}の結果は*rrs*シーケンスの結果と一致した。

[EB感受性に関するGenoType® MTBDR_{sl}とシーケンスの比較]

EB感受性結核菌33株すべてGenoType® MTBDR_{sl}はEB感受性の判定であった。一方、*embB*には6株(18.2%)に変異が認められ耐性の判定となった。内訳はE378Aが1株(国内分離株), V282Aが5株(外部精度評価プログラム株)であった。EB耐性結核菌43株のうち24株(55.8%)がGenoType® MTBDR_{sl}でEB耐性と判定された。*embB*シーケンスは32株(74.4%)に変異が認められた。被験EB耐性結核菌のうち国内で分離された結核菌は34株であり、内訳をTable 2に示した。EB耐性検出率は55.9%であった。GenoType® MTBDR_{sl}で検出した*embB*の変異は*embB*シーケンスの結果と一致したが、

*embB*のシーケンスではこれらの変異以外にD328Yが2株, D354A, G406D, G406Sをそれぞれ1株ずつ検出した。

[GenoType® MTBDR_{sl}とDNAシーケンスの精度の比較]

FQ, KM, AMK, CPMおよびEBに対する感度, 特異度, 一致率をTable 3に示した。FQ, KM, AMKおよびCPMの感受性についてはGenoType® MTBDR_{sl}とDNAシーケンスの感度, 特異度, 一致率は同じであった。EB感受性についてはGenoType® MTBDR_{sl}がDNAシーケンスと比較して感度は劣るものの, 統計的有意差はなかった(χ^2 test: P=0.07)。特異度については, 国内分離株では両方法に有意差は認められなかったものの, 全菌株ではGenoType® MTBDR_{sl}がDNAシーケンスと比較して良好であった(p=0.03)。

考 察

GenoType® MTBDR_{sl}の精度について国内で検出されたXDR-TB, MDR-TB, 感受性結核菌およびSRLNの薬剤感受性検査外部精度評価プログラムで使用した結核菌を用いて評価した。今回の検討ではGenoType® MTBDR_{sl}のFQ, KM, AMKおよびCPMの感度はそれぞれ82.4

Table 3 Total performances of GenoType® MTBDRsl and DNA sequencing

		Sensitivity (%)	Specificity (%)	Efficiency (%)
FQ (76)	MTBDRsl	82.4 (80.0)	97.6 (96.2)	90.8 (89.1)
	Sequencing	82.4 (80.0)	97.6 (96.2)	90.8 (89.1)
KM (76)	MTBDRsl	57.1 (55.6)	100 (100)	80.3 (82.6)
	Sequencing	57.1 (55.6)	100 (100)	80.3 (82.6)
AMK (30)	MTBDRsl	100	100	100
	Sequencing	100	100	100
CPM (30)	MTBDRsl	83.3	100	93.3
	Sequencing	83.3	100	93.3
EB (76)	MTBDRsl	55.8 (55.9)	100* (100)	75.0 (67.4)
	Sequencing	74.4 (70.6)	81.8*(91.7)	77.6 (76.1)

() : 46 strains isolated in Japan

* : Chi-square test, $p=0.03$

%, 57.1%, 100%, 83.3%, 特異度はそれぞれ97.6%, 100%, 100%, 100%, 一致率はそれぞれ90.8%, 80.3%, 100%, 93.3%であり, *gyrA*および*rrs*のダイレクトシーケンスによる方法との間に有意差は認められなかった。GenoType® MTBDRslのEBの感度, 特異度および一致率はそれぞれ55.8%, 100%, 75.0%であり, *embB*のダイレクトシーケンスによる方法と感度および一致率は有意差を認めなかったが, 特異度はGenoType® MTBDRslがダイレクトシーケンスより優れていた。また日本国内の臨床分離株に関するGenoType® MTBDRslの精度はダイレクトシーケンスと同等であった。他の研究での臨床分離株に対するGenoType® MTBDRslの耐性の検出感度はFQが75.6~90.6%, KMが43.2~100%, EBが56.2~64.2%と報告されており^{4)~7)}今回の結果はこれらと同等であった。

GenoType® MTBDRslによる*gyrA*のQRDRにおける遺伝子変異は80.0%に認められ, これまでの報告^{8)~10)}と同様であった。GenoType® MTBDRslの変異型検出用プローブおよび野生型検出用プローブは*gyrA*のQRDRの一部(70%)で設計されているため, この領域以外の変異は検出することができない。Anら⁹⁾は*gyrB*にのみ変異が認められた株および*gyrA*と*gyrB*どちらにも変異が認められなかった株はそれぞれ4.6%および17.4%と報告している。今回検討に用いたFQ耐性株も*gyrB*の変異または*gyrA*と*gyrB*以外の遺伝子変異がある可能性が考えられた。

GenoType® MTBDRslによるKMの検出感度は十分ではなかったがGenoType® MTBDRslと*rrs*シーケンスの結果は同じであったことからGenoType® MTBDRslは*rrs*遺伝子変異の検出感度は良好であったと考えられた。KMの遺伝子変異による耐性検出感度は他の報告^{7)10)~12)}では43.2~86.5%とばらつきが見られた。本邦の株を使用しているSuzukiら¹¹⁾はKM耐性株における*rrs*遺伝子

の変異は67.4%であるとし, われわれの報告同様に十分な耐性検出感度ではなかったと報告している。Zaunbrecherら¹³⁾はKM耐性およびAMK感受性株について*eis*遺伝子promoter領域のシーケンスを行い79%の株に変異があったと報告している。Huangら⁷⁾とCampbellら¹⁰⁾はKM耐性株の*rrs*遺伝子の変異はそれぞれ43.2%, 57.7%であるが*rrs*遺伝子および*eis*遺伝子promoterの変異は70.3%, 86.5%と報告している。GenoType® MTBDRslはAG耐性を*rrs*遺伝子の変異のみを検出することで行っているため*rrs*遺伝子と*eis*遺伝子promoterの変異が関係するKM耐性の検出感度が低いと考えられた。

GenoType® MTBDRslのEBの検出感度は十分ではなかった。EB耐性に関係していると言われている*embB* codon 306の変異は47.6%~68.5%の株で認められるとの報告¹⁰⁾¹⁴⁾がある。今回検討したGenoType® MTBDRslおよびDNAシーケンスのどちらでも*embB* codon 306の変異は55.9%であった。DNAシーケンスではEB耐性のhot spotである*embB* codon 306-497の変異のうちcodon 306以外の変異を5株(14.7%)検出した。Plinkeら¹⁵⁾は*embB* codon 306に変異のないEB耐性株の91.2%に*embCAB*の変異があり, 特に*embB* codon 406および497はhot spotであると述べている。今回の検討でも*embB* codon 406に変異がある2株を検出した。GenoType® MTBDRslに*embB* codon 406および497の変異を検出する野生型プローブまたは変異型プローブを追加することによりEB耐性検出感度の向上が見られる可能性が示唆される。今回EB感受性にもかかわらず*embB*に変異がある3株(*embB* E378A, V282A)を検出したが, *embB* codon 378に変異を認めるEB感受性結核菌の報告³⁾もあることから, *embB* codon 378はEB耐性に関係がない可能性が考えられた。

今回評価した遺伝子変異以外にefflux pump活性の増加による薬剤耐性メカニズムが結核菌において報告さ

れている。efflux pump inhibitorによる結核菌の最少発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) の低下^{16)~18)}やefflux pump遺伝子の過剰発現が観察されており¹⁸⁾, われわれが使用した菌株についてもefflux pump活性の増加による耐性が含まれている可能性も考えられた。

われわれは以前に*rpoB*, *katG*, *inhA* 遺伝子変異を検出するLPAであるGenoType® MTBDR*plus*を使ってMDR-TBの検索を行った¹⁹⁾が, GenoType® MTBDR*sl*と組み合わせることでXDR-TBの迅速検出が可能である。今回用いた国内のXDR-TB 13株のうち両法によりXDR-TBと判定しえた株は8株 (61.5%)であった。GenoType® MTBDR*sl*は現在一般的に用いられているDNAシーケンス法と検出感度は同等でありDNA抽出・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, 通常の薬剤感受性検査と比較すると数週間早く臨床に結果を提供できることから, 超多剤耐性結核の早期診断に有用であると考えられた。

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調査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) Tuberculosis Research Committee (Ryoken): Drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Japan: a nationwide survey, 2002. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 1129–1135.
- 2) 豊田恵美子, 川辺芳子, 四元秀毅, 他: 多剤および超多剤耐性結核の全国調査 (2006年). *結核.* 2008; 83: 773–777.
- 3) Sekiguchi JI, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, et al.: Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 179–192.
- 4) Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Richter E: Feasibility of the GenoType MTBDR*sl* Assay for fluoroquinolone, amikacin-capreomycin, and ethambutol resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1767–1772.
- 5) Brossier F, Veziris N, Aubry A, et al.: Detection by GenoType MTBDR*sl* test of complex mechanisms of resistance to second-line drug and ethambutol in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 1683–1689.
- 6) Keit VS, Lan NTN, An DD, et al.: Evaluation of the MTBDR*sl* test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: 2934–2939.
- 7) Huang W-L, Chi T-L, Wu M-H, et al.: performance assessment of the GenoType MTBDR*sl* test and DNA sequencing

for detection of second-line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2011; 49: 2502–2508.

- 8) Shi R, Zhang J, Li C, et al.: Emergence of ofloxacin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from China as determined by *gyrA* mutation analysis using denaturing high-pressure liquid chromatography and DNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2006; 44: 4566–4568.
- 9) An DD, Duyen NTH, Lan NTN, et al.: Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 4835–4839.
- 10) Campbell PJ, Morlock GP, Sikes RD, et al.: Molecular detection of mutation associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 2032–2041.
- 11) Suzuki Y, Katsukawa C, Tamaru A, et al.: Detection of Kanamycin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by identifying mutations in the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1220–1225.
- 12) Jugheli L, Bzekalava N, Rijk P, et al.: High level of Cross-resistance between kanamycin, amikacin, and capreomycin among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Georgia and a close relation with mutations in the *rrs* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 5064–5068.
- 13) Zaunbrecher MA, Sikes RD, Metchock B, et al.: Overexpression of the chromosomally encoded aminoglycoside acetyltransferase *eis* confers kanamycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 20004–20009.
- 14) Lee H, Myoung H-J, Bang H-E, et al.: Mutation in the *embB* locus among Korean clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to ethambutol. *Yonsei Med J.* 2002; 43: 59–64.
- 15) Plinke C, Cox HS, Zarkua N, et al.: *embCAB* sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without *embB306* mutation. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1359–1367.
- 16) Escribano I, Rodriguez JC, Llorca B, et al.: Importance of efflux pump systems in the resistance of *Mycobacterium tuberculosis* to Fluoroquinolones and Linezolid. *Chemotherapy.* 2007; 53: 397–401.
- 17) Singh M, Jadaun GPS, Ramdas, et al.: Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J Med Res.* 2011; 133: 535–540.
- 18) Machado D, Couto I, Perdigo J, et al.: Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE.* 2012; 7: e34538.
- 19) 近松絹代, 水野和重, 青野昭男, 他: GenoType® MTBDR*plus*による多剤耐性結核菌同定に関する検討. *結核.* 2011; 86: 697–702.

Original Article

EVALUATION OF GenoType® MTBDRsl FOR TESTING RESISTANCE OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLATES TO FLUOROQUINOLONE, AMINOGLYCOSIDE, AND ETHAMBUTOL

Kinuyo CHIKAMATSU, Akio AONO, Hiroyuki YAMADA, and Satoshi MITARAI

Abstract [Objective] To evaluate the ability of GenoType® MTBDRsl (Hain Lifescience, Germany) in detecting resistance to fluoroquinolone (FQ), aminoglycoside (AG), and ethambutol (EB).

[Method] We evaluated the resistance of 76 *Mycobacterium tuberculosis* samples, namely, 13 extensively drug-resistant (XDR), 29 multi-drug resistant (MDR), and 4 susceptible clinical isolates from Japan, and 30 strains from Supra-national Reference Laboratory Network, to FQ, AG, and EB by using GenoType® MTBDRsl. The *gyrA*, *rrs*, and *embB* were directly sequenced for all the strains, and the mutations were confirmed. The susceptibility testing result obtained using the standard proportion method with 1% Ogawa medium was considered as the gold standard.

[Results] The sensitivities of GenoType® MTBDRsl for resistance to FQ, kanamycin (KM), amikacin (AMK), capreomycin (CPM), and EB were 82.4%, 57.1%, 100%, 83.3%, and 55.8%, respectively. The specificity for FQ was 97.6%, and that for KM, AMK, CPM, and EB were 100%. The mutant strains detected by GenoType® MTBDRsl were as follows: in 20 Japanese FQ resistant isolates, 7 *gyrA* MUT3A (D94A) (35.0%), 6 MUT3C (D94G) (30.0%), 2 MUT1 (A90V) (10.0%), and 1 MUT1 with MUT3C (5.0%); in 18 KM resistant isolates, 10 *rrs* MUT1 (A1401G) (55.6%); and in 34 EB resistant isolates, 9 *embB* MUT1B (M306V) (26.5%), 2 MUT1A (M306I) (5.9%), and 8 WT1 deficits (covering codon 306; 23.5%). Direct sequencing showed additional substitutions in *embB* (2 D328Y, 1 D354A, 1 G406D, and 1

G406S). The sensitivity of GenoType® MTBDRsl was similar to that by sequencing method for resistance to FQ and AG, but that for EB was slightly less than by sequencing method, but the difference was not significant.

[Discussion] The sensitivity of GenoType® MTBDRsl for the detection of FQ resistance was approximately 80% to that by standard drug sensitivity test results by using conventional proportion methods, while it was relatively less accurate for the diagnosis of resistance to KM and EB in Japanese isolates. Thus, GenoType® MTBDRsl is useful for the early diagnosis and infection control of XDR-TB, because of a short turn-around time of approximately 6 h.

Key words: Line Probe Assay, Fluoroquinolone, Aminoglycoside, Ethambutol, *gyrA*, *rrs*, *embB*, Multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*, Extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association

Correspondence to: Kinuyo Chikamatsu, 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: chikamatsu@jata.or.jp)