

塗抹陰性・MGIT法陽性検体での結核菌群核酸増幅迅速診断におけるコバス®TaqMan法とLAMP法の有用性の比較検討

¹吉多 仁子 ¹小野原健一 ¹田澤 友美 ²釣永 雄希
²黒川 雅史 ²韓 由紀 ²田村 嘉孝 ²永井 崇之
²橋本 章司 ²川瀬 一郎

要旨：〔目的〕塗抹陰性・MGIT法陽性検体での結核菌群核酸増幅迅速診断におけるコバス®TaqMan法（TaqMan法）とLoop-Mediated Isothermal Amplification（LAMP法）との有用性の比較検討をしたので報告する。〔期間・方法〕2012年5月～7月の2カ月間にMGIT法を実施した690検体のうち、結核菌陽性は70検体であった。対象は治療開始後1週間以内に採取された48検体（喀痰43検体、胃液2検体、胸水2検体、膿汁1検体）を用いた。前処理後の検体を1000 rpm、1分間遠心し、上清は100 μ l TaqMan法、沈渣の60 μ lをLAMP法に用いた。〔結果〕塗抹陰性25検体ではTaqMan法陽性が16検体（64%）、LAMP法陽性が20検体（80%）であり、塗抹陽性23検体では全例が2法ともに陽性（100%）であった。〔考察〕塗抹陰性検体ではLAMP法のほうがTaqMan法よりも陽性率が高く、喀痰内の成分が共沈剤の役目になり沈渣中により多くの菌が分布したことも一因と考えられた。沈渣を用いたLAMP法は、TaqMan法よりも迅速診断法としての有用性が高いと考えられた。

キーワード：結核迅速診断，塗抹陰性検体，核酸増幅法，LAMP法，コバス®TaqMan法

序 文

結核は世界では人口の約3分の1に感染し、毎年約170万人の生命を奪うと推計され、未だ開発途上国を中心に蔓延しており¹⁾²⁾、その迅速診断の確立が望まれている。

栄研化学（株）から新しい核酸増幅法Loop-Mediated Isothermal Amplification（LAMP法）が迅速、簡易、精密な核酸増幅法として開発された。LAMP法は標的病原体由来の核酸の6つの領域に対し4種類のプライマーを設定し、鎖置換反応を利用して一定温度で反応させる方法である。サンプルとなる核酸、プライマー、鎖置換型DNA合成酵素、基質等を混合し、一定温度（約65℃）での保温で反応し、1ステップで検出できる。この方法は増幅効率がよく、DNAを15分間から1時間で 10^9 ～

10^{10} 倍に増幅でき、またきわめて特異性も高く、増幅産物の有無によって検体中の標的核酸配列の有無を確認することが可能である^{3)~5)}。Loopamp®PURE DNA抽出キットとLoopamp®結核菌群検出試薬キットを用いることで、従来の核酸増幅検査に比べより簡易かつ迅速な（約1時間）診断・報告が可能となる⁵⁾。

早期診断と早期治療開始は医療の基本であり、特に結核では早期診断が個々の患者の治療はもちろんのこと、集団発生や基礎疾患を有するcompromised hostが集中する病院感染を防ぐためきわめて重要である⁶⁾。

結核の診断における塗抹検査は安価であり、迅速性に優れ最も重要な検査とされているが、喀痰1 ml中 10^4 個以上の菌量が必要である。また最も感度が高い培養検査は判定に数週間を要し迅速検査としては不適である。このため本邦では結核診断に直接検体からの核酸増幅法が

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター¹臨床検査科、²感染症内科

連絡先：吉多仁子，大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター臨床検査科，〒583-8588 大阪府羽曳野市はびきの3-7-1 (E-mail: yoshidahi@opho.jp)

(Received 14 Jun. 2013/Accepted 23 Aug. 2013)

広く行われている⁹⁾。われわれが以前報告したリアルタイムPCR法を用いたコバス®TaqMan (TaqMan法, ロシユ・ダイアグノスティックス)法での塗抹陽性検体の感度は100%であったが, 塗抹陰性検体の感度はやや劣り68.4%であり, 培養陽性の結果が判明するまでに陰性患者の診断が遅れる例がみられた⁸⁾。そこで今回は, 結核と診断された患者の治療開始後1週間以内に採取された検体を用い, 同一検体から, TaqMan法とLAMP法の2法の迅速診断としての有用性について比較した。現在のLAMP法の保険適応は喀痰のみに限定されているが, 今回は喀痰以外の検体についても対象とした。TaqMan法の添付文書に記載されている判定の偽陰性化の要因についても検証した。また, LAMP法については若干の検討も行ったので併せて報告する。

対象と方法

I. TaqMan法とLAMP法の比較

〔対象〕

期間は2012年5月～7月の2カ月間で, 当院診療科からMGIT法の依頼があった690検体のうちMGIT法で結核菌陽性を示したのは70検体であった。このうち治療開始後1週間以内に採取され, 検査後の残量が本報の検討に利用可能である重複のない48検体(喀痰43検体, 胃液2検体, 胸水2検体, 膿汁1検体)を用いた。

同期間で当院診療科の依頼を受けTaqMan法で結核菌群(結核菌)を測定したのは160検体(喀痰39検体, 胸水32検体, 気管支・肺胞洗浄液等75検体, 胃液7検体, 組織5検体, 尿2検体)であった。

〔方法〕

(1) 対象の前処理

採痰容器に採取された喀痰と胃液はタンパク分解酵素セミアルカリプロテアーゼのプレソルブ(日水製薬)を等量加え攪拌・溶解し, 3000×G, 15分間遠心後の沈渣0.5～1 mlを15 ml滅菌試験管に採取した。ニチビー法(CC-E法, 日本ビーシー製造)⁹⁾はCC-E液を等量とCC-E助剤1滴を加え攪拌, 8分間静置後pH 6.8Mリン酸緩衝液を15 ml滅菌試験管のトップリングに加え3000×G, 15分間遠心した。上清を捨てリン酸緩衝液1 mlに浮遊させ検体とした。

胸水は3000×G, 15分間遠心後の沈渣0.5～1 mlを15 ml滅菌試験管に採取し, 膿汁は0.5～1 mlを15 ml滅菌試験管に採取し, それぞれCC-E法を行った。

(2) TaqMan法

TaqMan法は前処理検体を1000 rpm, 1分間遠心し, 上清の100 μlを用いた。核酸抽出にアンプリコア®マイコバクテリア検体処理試薬セットII(前処理試薬, ロシユ・ダイアグノスティックス)の溶菌試薬「RL」と中和試

薬「RN」にタックマンマイコ用検体前処理試薬添加セット「SOL-M」(SOL-M, 島津製作所)の溶菌試薬「RL」用添加剤SOL-L, 中和試薬「RL」用添加剤SOL-Mをそれぞれ添付文書どおりに添加し用いた。上清検体を13000×G, 5分間遠心後, チップで上清除去しSOL-Mを添加したRL 100 μlを添加し, 攪拌・スピンドウン後, 60℃ 10分間加熱した。スピンドウンの後RN 100 μlを添加, 攪拌・スピンドウンした上清50 μlをコバス®TaqMan MTB試薬を用いコバス®TaqMan 48 (TaqMan 48, ロシユ・ダイアグノスティックス)にて測定した。

(3) LAMP法

LAMP法は前処理済み検体を1000 rpm, 1分間遠心した沈渣60 μlを, Loopamp® PURE DNA抽出キット(PURE法, 栄研化学)で核酸を抽出し, Loopamp®結核菌群検出試薬キット(LAMP試薬, 栄研化学)を用い結核菌を検出した。

PURE法は以下の手順で行った。検体と陰性コントロール60 μlを検体処理チューブに添加し, 3～5回転倒混和し, 内溶液をチューブの底に振り落とした後, ヒートブロックで90℃ 5分間加熱し, 2分間室温で静置した。3～5回の転倒混和後, 検体処理チューブを吸着剤チューブに装着し, 直ちに上下10回, 左右10回激しく振り, 十分に混和したことを確認後, 水平に静置した。滴下注入キャップを吸着剤チューブの滴下側にねじり固定後, 内容物を滴下注入キャップ側に軽く振り落とし中央部を押し出した溶液をDNA溶液として用いた。

LAMP試薬が蓋に固層化された反応チューブは, 試薬の劣化を防ぐためアルミパックに保存されており, 陰性・陽性コントロールと測定検体数分を取り出して用いた。検体と陰性コントロールのDNA溶液を反応チューブに直接滴下し蓋を閉め, 陽性コントロールは攪拌・スピンドウン後30 μlを反応チューブに滴下し, 蓋を閉め反応チューブをスピンドウンした。反応チューブを転倒させ, 反応液を蓋に移動し, 反応液チューブ用ラック上で2分間倒立, 静置した。反応チューブを5回転倒混和・スピンドウンして, リアルタイム濁度測定装置Loopamp EXIA®(栄研化学)で測定した。

II. LAMP法の検討

(1) 感度の検討

対象は, TaqMan法とLAMP法の比較の検討で用いた塗抹陰性検体の中から喀痰の4検体の上清を用いLAMP法で測定した。

(2) 特異度の検討

対象はI. TaqMan法とLAMP法の比較の対象で用いていない, 2012年7月に提出された検体のうちMGIT法陽性, 非結核性抗酸菌と同定された検体の前処理済み検体の沈渣をLAMP法で測定した。検体の内訳は喀痰8検

体と胸水 1 検体の合計 9 検体で、菌種の内訳は *Mycobacterium kansasii* 2 株, *Mycobacterium avium* 2 株, *Mycobacterium intracellulare* 5 株であった。

結 果

1. 対象検体

検体の塗抹結果は、塗抹陰性が 25 検体 (喀痰が 21 検体, 胃液 1 検体, 膿汁 1 検体, 胸水 2 検体), 塗抹陽性検体が 23 検体 (喀痰 22 検体, 胃液 1 検体) であった。塗抹陽性 23 検体中, (1+) が 15 検体, (2+) は 4 検体, (3+) は 4 検体であった。喀痰のグレード P1 以上の膿性が確認される検体は塗抹陰性で 4 検体 (約 19%), 塗抹陽性 (1+) で 2 検体 (約 13%) であったが, 塗抹 (2+) 以上の 8 検体中で 5 検体 (約 63%) を占めていた。なお, この期間の MGIT 法で結核菌陽性 44 例のうち塗抹陰性は 24 例, 陽性は 20 例で, 上記と同様であった。

2. 結核菌の TaqMan 法

TaqMan 法で結核菌群を測定した 160 検体のうち 9 検体 (喀痰 7 検体, 気管支洗浄液 1 検体, 胃液 1 検体) が陽性 (陽性率 5.6%) で, 2 検体 (喀痰 1, 膿汁 1 検体) で増幅阻害 (増幅阻害率 1.25%) を認めた。

I. TaqMan 法と LAMP 法の比較

(1) 陽性率

結果を Table 1-1~4 に示した。塗抹陰性 25 検体での TaqMan 法の陽性は 16 検体 (陽性率 64%) であり, 9 検体が陰性 (喀痰 5 検体, 胃液 1 検体, 膿汁 1 検体, 胸水 2 検体) であった。塗抹陽性検体では 23 検体 (喀痰 22 検体, 胃液 1 検体) の全例が陽性 (陽性率 100%) であった。なお, すべての検体で増幅阻害は認められなかった。

塗抹陰性 25 検体での LAMP 法では 20 検体が陽性 (陽性率 80%) で, 陰性は 5 検体 (喀痰 2 検体, 胃液 1 検体, 胸水 2 検体) であった。塗抹陽性検体は LAMP 法も全例 23 検体が陽性 (陽性率 100%) であった (Table 1-1~4)。

なお, 2 法の一致率は塗抹陰性検体が 76%, 塗抹陽性検体は 100% であった。

(2) 検出時間

TaqMan 法の陽性検出サイクル数は塗抹陰性検体で 42.1 サイクル, 塗抹陽性 (1+) 検体で 35.1 サイクル, (2+) 検体で 32.7 サイクル, (3+) 検体で 32.0 サイクルであった。LAMP 法での陽性検出時間 Tt 値は塗抹陰性検体で 17.42 分, 塗抹陽性 (1+) 検体で 13.11 分, (2+) 検体で 12.10 分, (3+) 検体で 11.47 分であった。

Table 1-1 Result of smear negative by three methods

No. of case	Materials	Grade	TaqMan		LAMP		MGIT days to detection
			MTB	Ct	MTB	Tt	
1	Sputum	A	—	—	+	25.48	23
2	Sputum	A	—	—	+	17.54	13
3	Sputum	A	—	—	+	16.06	18
4	Sputum	A	+	42.6	+	15.30	21
5	Sputum	A	+	36.5	+	20.42	38
6	Sputum	A	+	40.0	+	14.54	39
7	Sputum	A	+	47.1	+	26.06	37
8	Sputum	M1	—	—	—	—	19
9	Sputum	M1	—	—	+	15.18	26
10	Sputum	M1	+	40.4	+	17.42	12
11	Sputum	M1	+	38.0	+	13.30	11
12	Sputum	M1	+	42.6	+	16.18	27
13	Sputum	M1	+	43.8	+	14.06	16
14	Sputum	M1	+	42.9	+	17.48	37
15	Sputum	M2	+	41.4	+	12.24	15
16	Sputum	M2	+	38.6	—	—	36
17	Sputum	M2	+	46.8	+	21.06	19
18	Sputum	P1	+	44.5	+	16.12	27
19	Sputum	P2	+	44.3	+	15.54	23
20	Sputum	P3	+	40.0	+	14.42	15
21	Sputum	P3	+	43.3	+	26.36	19
22	Pus		—	—	+	15.42	14
23	Gastric aspiration		—	—	—	—	22
24	Pleura effusion		—	—	—	—	22
25	Pleura effusion		—	—	—	—	22
Mean				42.1		17.42	22.8

Grade = Classification of Miller & Jones A = aspirated sputum

MTB = *Mycobacterium tuberculosis* MGIT = *Mycobacterium* growth indicator tube

Ct = positive cycle time Tt = positive time

Table 1-2 Result of smear positive 1+ by three methods

No. of case	Materials	Grade	TaqMan		LAMP		MGIT days to detection
			MTB	Ct	MTB	Tt	
1	Sputum	A	+	34.1	+	10.54	7
2	Sputum	A	+	31.3	+	14.42	16
3	Sputum	A	+	31.7	+	11.48	7
4	Sputum	A	+	33.8	+	10.42	10
5	Sputum	A	+	37.8	+	15.48	24
6	Sputum	M1	+	37.8	+	15.48	10
7	Sputum	M1	+	40.1	+	15.12	12
8	Sputum	M1	+	34.2	+	13.18	12
9	Sputum	M1	+	38.1	+	12.24	7
10	Sputum	M1	+	39.2	+	10.42	14
11	Sputum	M2	+	23.8	+	12.12	16
12	Sputum	M2	+	38.3	+	20.12	9
13	Sputum	P3	+	32.5	+	10.24	10
14	Sputum	P3	+	37.8	+	12.36	35
15	Gastric aspiration		+	37.3	+	10.42	9
Mean				35.1		13.11	13.2

Table 1-3 Result of smear positive 2+ by three methods

No. of case	Materials	Grade	TaqMan		LAMP		MGIT days to detection
			MTB	Ct	MTB	Tt	
1	Sputum	A	+	32.8	+	12.12	24
2	Sputum	P1	+	30.3	+	10.48	13
3	Sputum	P1	+	34.5	+	13.36	6
4	Sputum	P3	+	33.3	+	11.36	18
Mean				32.7		12.10	15.3

Table 1-4 Result of smear positive 3+ by three methods

No. of case	Materials	Grade	TaqMan		LAMP		MGIT days to detection
			MTB	Ct	MTB	Tt	
1	Sputum	M1	+	36.1	+	12.00	11
2	Sputum	M2	+	29.5	+	10.42	17
3	Sputum	P1	+	30.3	+	12.00	7
4	Sputum	P2	+	29.5	+	15.12	6
Mean				32.0		11.47	10.3

II. LAMP法の検討

(1) 感度の検討

結果をTable 2に示した。塗抹陰性喀痰のTable 1-1から沈渣を用いたLAMP法が陽性であったNo. 1, 3, 14, 21の上清を用いた。この4検体のTaqMan法の結果はNo. 14, 21の2検体が陽性で、2検体の検出は40サイクルを超えて検出した。検体の上清を用いたLAMP法の結果はNo. 1, 21が陰性、No. 3, 14が陽性であった。この2検体の沈渣の陽性検出時間は20分以内であったが、陰性となったNo. 1, 21の2検体の沈渣の陽性検出時間は20分以上であった (Table 2)。

(2) 特異度の検討

非結核性抗酸菌 *Mycobacterium kansasii* 2 検体, *Mycobacterium avium* 2 検体, *Mycobacterium intracellulare* 5 検体の9検体はすべてLAMP法が陰性となり、特異度は100%であった。

bacterium avium 2 検体, *Mycobacterium intracellulare* 5 検体の9検体はすべてLAMP法が陰性となり、特異度は100%であった。

考 察

I. TaqMan法とLAMP法の比較

(1) 陽性率

塗抹陽性検体では全例が2法ともに陽性であり、塗抹陰性検体ではLAMP法 (80%) のほうがTaqMan法 (64%) より陽性率が高かった。

今回の検討でLAMP法より感度が劣ったTaqMan法では、判定が偽陰性化する検体として、①血液が大量に混入している検体、②唾液が多く混入している検体、③塗

Table 2 Result of both LAMP and TaqMan

	No. of case	1		3		14		21	
		MTB	Tt/Ct	MTB	Tt/Ct	MTB	Tt/Ct	MTB	Tt/Ct
LAMP	Sediment	+	25.48	+	16.06	+	17.48	+	26.36
	Upper	-		+	18.36	+	19.48	-	
TaqMan	Upper	-		-		+	42.9	+	43.3

抹陰性、もしくは弱陽性で菌量の少ない検体、④不適切な検体前処理により、核酸抽出が不十分な検体、⑤N-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム法 (NALC) により検体を処理せず、集菌が不十分な検体などが添付文書に記されている。

上記①の血液が大量に混入した検体の場合はPCR反応の増幅阻害が起こると考えられている。当院では、このような検体に対しCC-E法の前処理を最低2回行い、血液成分を除去して検査精度の向上を図っている。

上記②の唾液が多く混入し良質でない検体では、肉眼的評価のMiller & Jones分類も同時に主治医へ報告し、主治医に検体不良のため偽陰性の可能性を伝えている。

今回扱った検体すべてが活動性肺結核患者由来の喀痰であったが、肉眼的に膿性部分が含まれると判定されたのは約4分の1の検体であった。一般菌の検査では患者から膿性痰を得ることが望まれるが、相原によるとMiller & Jones分類で唾液と判定された検体の部分間にも糸くずに似た微細な気管支痰が含まれていることが多いと記している¹⁰⁾。以上より結核患者由来の喀痰では、膿性でなく唾液が多い検体であっても偽陰性になるとは限らず、積極的に検査を行うべきであると考えられた。

上記③の塗抹陰性、もしくは弱陽性で菌量の少ない検体は、II.のLAMP法の感度の検討で考察を行った。

上記④の不適切な検体前処理による核酸抽出が不十分な可能性については、当院では前処理にSOL-Mを添加し、増幅阻害率は1.3%と低く、可能性は低いと推定された。

また、SOL-Mを用いることで、核酸抽出操作の所要時間を約30分間短縮することが可能で、消耗品の節約、作業の簡便化が可能となり、臨床検査上有用な添加剤であると考えられた。LAMP法のPURE法による抽出の検討はII.で行った。

上記⑤にNALC法により検体を処理せず、集菌が不十分な検体とある。当院では、喀痰膨潤剤加2% NaOHと長期安定型NALC溶液からなり処理時間の短縮と処理能の増強とを図るCC-E法を用いており⁹⁾、対象期間中の結核性抗酸菌を含めたCC-E法によるMGIT法陽性率は19.7% (136/690検体)と高く、雑菌率は5.1% (35/690検体)と低く、NALC-NaOH法と比べ遜色ないと推定された。

(2) 検出時間

LAMP法の核酸抽出においてPURE法の操作時間が検体の数により左右されるが、5検体程度では約30分で可能である。機器の測定で、陽性検体はグラフの曲線が大きく上昇し、40分間の反応終了を待たずに結果が陽性であることが肉眼で確認できる。陽性検出時間Tt値は機器が陽性と判定した測定終了後に算出される時間で、Tt値の平均が塗抹陰性検体で17.42分、塗抹陽性(1+)検体で13.11分、(2+)検体で12.10分、(3+)検体は11.47分となり、菌量と検出時間が相関しなかった理由として(2+)検体と(3+)検体の検体数が少ないことが考えられた。

しかし、TaqMan法の核酸抽出は、前処理試薬にSOL-Mを添加する方法では約1時間を要し、検査開始から報告まで3時間30分を要した。

TaqMan法では塗抹から推定できる菌量に相関して陽性検出サイクル数が短くなり、LAMP法は塗抹陰性から陽性(2+)検体までは検出時間が短縮し、菌量との相関がみられ、(2+)検体と(3+)検体の差は若干のみ認められた。

TaqMan法では1サイクルで温度を95℃20秒間、61℃40秒間、70℃20秒間と温度を変化させて増幅を行うが、LAMP法では一定の温度67℃で反応可能で、特別な機器を要しないことから、TaqMan法に比べ迅速性かつ簡便性に優れると考えられた。

II. LAMP法の検討

(1) 感度の検討

上記③の塗抹陰性もしくは弱陽性で菌量の少ない検体について検討するために、喀痰塗抹が陰性で沈渣のLAMP法が陽性であった4検体の上清を用いてLAMP法を実施したが、4例の上清のLAMP法の感度はTaqMan法とはほぼ同等であった⁹⁾。

清水も、核酸抽出操作における前処理検体中の上清と沈渣で菌体分布についてPCR法で比較検討し、菌体は沈渣側に多く含まれていると報告している¹¹⁾。

以上により、塗抹陰性検体で沈渣を用いたLAMP法の陽性率が高かった理由として、前処理による集菌後1000rpm、1分間の遠心で喀痰内の成分が共沈剤として作用し、結核菌が沈渣側に移行したことが考えられた。

TaqMan法では1つのプライマーが1カ所で反応を起

こすため、喀痰中の成分で増幅阻害が起こりやすく、喀痰中の大きい成分を遠沈し、上清を検査に用いている。一方、LAMP法はPURE法との組み合わせにより喀痰内のLAMP法を阻害する成分が取り除かれるため、喀痰そのものを検体に用いることが可能である。よって集菌後の沈渣の利用も可能であり、この点もLAMP法のメリットと考えられた。

ま と め

塗抹陰性検体ではLAMP法のほうがTaqMan法よりも陽性率が高く、喀痰内の成分が共沈剤の役目になり沈渣中により多くの菌が分布したことも一因と考えられた。沈渣を用いたLAMP法は、TaqMan法よりも迅速診断法として有用性が高いと考えられた。

利益相反：本論文の研究内容、結論、意義あるいは意見について他者との利益相反（conflict of interest）はありません。

文 献

- 1) WHO: Gold tuberculosis control: surveillance, planning, financing, WHO Report 2010.
- 2) <http://www.who.int/tb/country/en/index.html>/ アクセス日 2013/04/18.
- 3) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. 2000 Oxford University Press. *Nucleic Acids Research*, 2000; 28: e63.
- 4) 牛久保宏: LAMPの原理. *ウイルス*. 2004; 54: 107-112.
- 5) 御手洗聡: LAMPを使った結核迅速診断キット. *複十字*. 2011; 339: 11-13.
- 6) 長谷川直樹: 院内感染対策. *臨床と微生物*. 2012; 39: 165-169.
- 7) 小松 方, 相原雅典: 誰にでもわかる遺伝子検査. *検査と技術*. 2002; 30: 1024-1028.
- 8) 吉多仁子, 松本智成: 結核菌検出におけるコバスTaqMan法とコバスアンプリコア法の比較検討. *日本臨床微生物学会雑誌*. 2012; 18: 252-258.
- 9) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編: 結核菌検査指針2007. 結核予防会.
- 10) 相原雅典: Miller & Jones分間類とGeckler分間類による喀痰の品質管理法の有用性. *日本臨床微生物学会雑誌*. 2012; 4: 99.
- 11) 清水紀臣, 蓮見章太: 抗酸菌遺伝子検査における検体前処理操作の問題点. *日本臨床微生物学会雑誌*. 2012; 4: 14.

Original Article

COMPARATIVE STUDY OF THE EFFICACY OF THE COBAS® TaqMan AND LAMP ASSAY FOR THE RAPID DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

¹Hiroko YOSHIDA, ¹Kenichi ONOHARA, ¹Tomomi TAZAWA, ²Yuki TSURINAGA,
²Masashi KUROKAWA, ²Yuki HAN, ²Yoshitaka TAMURA, ²Takayuki NAGAI,
²Shoji HASHIMOTO, and ²Ichirou KAWASE

Abstract [Objective] The COBAS® TaqMan real-time polymerase chain reaction (PCR) assay (TaqMan assay) is a well-accepted and widely distributed molecular-based diagnostic test for tuberculosis. In the present study, we evaluated the efficacy of the LAMP assay (loopamp® MTBC detection kit) as an alternative molecular-based diagnostic kit for tuberculosis, through comparison with the TaqMan assay.

[Study Period and Methods] This study was conducted over a period of approximately 2 months, between May and July 2012. We collected 48 samples (43 sputum, 2 gastric fluid, 2 pleural fluid, and 1 pus fluid samples) from patients who had been diagnosed with tuberculosis through the culture method, but had not received any treatment for more than one week. All samples were processed using the CC-E pre-treatment reagent (Japan BCG) prior to performing the TaqMan and LAMP assay. For the TaqMan assay, 100 μ L of supernatant was used after centrifugation at 1,000 rpm for 1 minute, whereas 60 μ L of the precipitate in the same sample was used for the LAMP assay.

[Results] In total, 23 out of 48 samples were identified as positive for tuberculosis according to smear microscopy tests, among which 15, 4, and 4 samples had smear test scores of 1+, 2+, and 3+, respectively. All the samples that tested positive in the smear test, regardless of the score, also tested positive in both the TaqMan and TB-LAMP assays (100%). Of

the 25 smear-negative samples, we noted that 16 tested positive by the TaqMan assay (64%), whereas 20 tested positive by the LAMP assay (80%).

[Discussion] Compared with the TaqMan assay, the LAMP assay showed a higher positive rate among the smear-negative samples. We believe that this is because substances in the samples acted as co-precipitating agents, resulting in the presence of a larger number of bacteria in the precipitates than in the supernatants. Thus, the findings indicate that the application of the LAMP method to precipitates obtained following CC-E pre-treatments may lead to prompt diagnosis of tuberculosis, with a level of sensitivity comparable to that of culture tests.

Key words: Rapid diagnosis of tuberculosis, Smear negative, Molecular-based diagnostic test, LAMP, TaqMan

¹Division of Laboratory, ²Division of Infectious Disease, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Disease, Osaka Prefectural Hospital Organization

Correspondence to: Hiroko Yoshida, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Disease, 3-7-1, Habikino, Habikino-shi, Osaka 583-8588 Japan.
(E-mail: yoshidahi@opho.jp)