

TRCReady® MTBによる*Mycobacterium tuberculosis* complex と TRCReady® MACによる*Mycobacterium avium* および*Mycobacterium intracellulare*の同定精度評価

近松 絹代 五十嵐ゆり子 青野 昭男 山田 博之
高木 明子 御手洗 聡

要旨：〔目的〕 Transcription Reverse-transcription Concerted reaction (TRC) 法を原理としたTRCReady® MTBおよびTRCReady® MAC (東ソー) による*Mycobacterium tuberculosis* complex (結核菌群), *M. avium*および*M. intracellulare*の検査精度を評価すること。〔方法〕 *Mycobacterium*属基準株のうち, 結核菌群4種および非結核性抗酸菌 (Non-tuberculosis *Mycobacterium*: NTM) 147種の計151種を対象とし, 自動遺伝子検査装置 TRCReady®-80 (東ソー) を用いてTRCReady® MTBとTRCReady® MAC (東ソー) による結核菌群, *M. avium*および*M. intracellulare*の同定精度を評価した。〔結果〕 結核菌群4種, *M. avium*および*M. intracellulare*の基準株はそれぞれ正しく陽性判定された。同定特異性 (一致率) はTRCReady® MTBで100%, TRCReady® MACでは稀少NTM6種 (*M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. vulneris*および*M. yongonense*) が*M. intracellulare*と誤同定されたため, 同定特異性は96.0% (145/151) であった。〔考察〕 TRCReady® MTBおよびTRCReady® MACの結核菌群, *M. avium*および*M. intracellulare*に関する同定特異性は優れていた。NTM6種が*M. intracellulare*に誤同定されたが日本国内ではこれらのNTMは分離報告がほとんどない。しかしながら, 近年稀少抗酸菌種の分離が増加していることからTRCReady® MACによって*M. intracellulare*と同定された場合, 分離菌のコロニー性状などに注意する必要があると考えられた。

キーワード：TRCReady, *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, 抗酸菌同定

はじめに

結核の感染対策上, *Mycobacterium tuberculosis* complex (結核菌群) の診断には迅速性が求められる。抗酸菌の迅速検査のため, 一般に塗抹検査と核酸増幅検査が行われているが, 塗抹検査が抗酸菌陽性となっても, それだけで結核菌群か非結核性抗酸菌 (Non-tuberculosis *Mycobacterium*: NTM) かを区別することはできない。2014年の結核の罹患率は15.4 (10万人対) である¹⁾が, 同年の肺NTM症の罹患率が*M. avium-intracellulare* complex (MAC), *M. kansasii*および*M. abscessus*だけで14.2 (10万人対) と報告されており, そのうちMACが88.8%を占めている²⁾こ

とから, 各々の疾患の有病期間を考慮すると, 臨床検査的には結核菌群以外の抗酸菌を検出する確率のほうがかきわめて高いと考えられ, 特に分離頻度の高いMACの正確な同定鑑別が必要であると考えられる。

体外診断用の核酸増幅試薬は検体中の結核菌群またはMACを数時間以内で検出できることから, 現在多くの検査室で使用されている。結核菌群の検出試薬であるTRCReady® MTB (東ソー) と*M. avium*および*M. intracellulare*の鑑別検出試薬であるTRCReady® MAC (東ソー) は, Transcription Reverse-transcription Concerted reaction (TRC) 法を原理とした核酸増幅検査キットであり, 等温反応による連続的なRNA増幅法とインターカレータ

一性蛍光色素標識されたDNAプローブとの組み合わせでRNAを増幅、検出する。また、自動遺伝子検査装置 TRCReady®-80 (東ソー) を使用することで、核酸の精製、増幅、検出までを自動で行うことができる。他の核酸増幅検査試薬による菌種誤同定の報告が複数ある³⁾⁴⁾ことから、*Mycobacterium*属基準株151種を使用してTRCReady® MTBおよびTRCReady® MACの同定精度を評価した。

方 法

(1) 基準株の準備

評価対象菌種として、結核菌群4種 (*M.tuberculosis*, *M.africanum*, *M.bovis* および *M.microti*) およびNTM 147種 (いずれも基準株で3亜種を含む) の計151種を用いた (Table 1)。

2%小川培地 (極東製薬工業) に発育した基準株をマ

イコブロス (極東製薬工業) にO.D 0.05になるように接種し、菌種ごとに定められた温度 (25~37℃) でO.D 0.10~0.12になるまで2~20日間培養し、試験日まで-80℃で保存 (81~141日) した。培養菌液5 μ lにTRCR抗酸菌溶菌試薬 (東ソー) を200 μ l添加後、80℃で10分間加熱し、溶菌および殺菌した。TRCR核酸精製キット (東ソー) に含まれる変性試薬500 μ lに、前述の溶菌済み検体を全量加えた。この工程まではBSL 3実験室内で行い、以後は一般実験室内で実験を行った。

(2) TRCReady® MTBによる結核菌群とTRCReady® MACによる*M.avium*および*M.intracellulare*の同定特異性評価

TRCReady®-80にTRCR核酸精製キット、TRCR検出試薬用チップセット、TRCReady® MTBおよび溶菌済み検体入り変性試薬をセットし、151種の抗酸菌について核酸精製、増幅および検出を行った (Fig.)。TRCReady®

Table 1 List of *Mycobacterium* type strains used for specificity testing of TRCReady® MTB and TRCReady® MAC

Species	Strains	Species	Strains
<i>M.tuberculosis</i> complex		<i>M.cookii</i>	ATCC49103
<i>M.tuberculosis</i> H37Rv	ATCC27294	<i>M.cosmeticum</i>	JCM14739
<i>M.africanum</i>	ATCC25420	<i>M.crocinum</i>	JCM16369
<i>M.bovis</i>	ATCC19210	<i>M.diernhoferi</i>	ATCC19340
<i>M.microti</i>	ATCC19422	<i>M.doricum</i>	JCM12405
Non-tuberculosis <i>Mycobacterium</i>		<i>M.duvalii</i>	ATCC43910
<i>M.abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	ATCC19977	<i>M.elephantis</i>	JCM12406
<i>M.abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	JCM15297	<i>M.engbaekii</i>	ATCC27353
<i>M.agri</i>	ATCC27406	<i>M.europaeum</i>	DSM 45397
<i>M.aichiense</i>	ATCC27280	<i>M.fallax</i>	ATCC35219
<i>M.algericum</i>	DSM 45454	<i>M.farcinogenes</i>	ATCC35753
<i>M.aromaticivorans</i>	JCM16368	<i>M.flavescens</i>	ATCC14474
<i>M.arosiense</i>	DSM 45069	<i>M.florentinum</i>	JCM14740
<i>M.arupense</i>	DSM 44942	<i>M.fluoranthenvivorans</i>	JCM14741
<i>M.asiaticum</i>	ATCC25276	<i>M.fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	ATCC35931
<i>M.aubagnense</i>	JCM15296	<i>M.fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	ATCC06841
<i>M.aurum</i>	ATCC23366	<i>M.fragae</i>	DSM45731
<i>M.austroafricanum</i>	ATCC33464	<i>M.frederiksbergense</i>	DSM 44346
<i>M.avium</i> subsp. <i>avium</i>	ATCC25291	<i>M.gadium</i>	ATCC27726
<i>M.avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC19698	<i>M.gastri</i>	ATCC15754
<i>M.avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	ATCC49884	<i>M.genavense</i>	ATCC51234
<i>M.bacteremicum</i>	DSM 45578	<i>M.gilvum</i>	ATCC43909
<i>M.boenickei</i>	JCM15653	<i>M.goodii</i>	ATCC700504
<i>M.bohemicum</i>	JCM12402	<i>M.gordonae</i>	ATCC14470
<i>M.branderi</i>	ATCC51789	<i>M.haemophilum</i>	ATCC29548
<i>M.brisbanense</i>	JCM15654	<i>M.hassiacum</i>	JCM12690
<i>M.brumae</i>	ATCC51384	<i>M.heckeshornense</i>	DSMZ44428
<i>M.canariense</i>	JCM15298	<i>M.heidelbergense</i>	ATCC51253
<i>M.celatum</i>	ATCC51131	<i>M.hiberniae</i>	ATCC49874
<i>M.chelonae</i>	ATCC35752	<i>M.hodleri</i>	JCM12141
<i>M.chimaera</i>	JCM14737	<i>M.holsaticum</i>	JCM12374
<i>M.chitae</i>	ATCC19627	<i>M.houstonense</i>	JCM15656
<i>M.chloropenolicum</i>	ATCC49826	<i>M.immunogenum</i>	DSM 45595
<i>M.chubuense</i>	ATCC27278	<i>M.insubricum</i>	JCM16366
<i>M.colombiense</i>	JCM16228	<i>M.interjectum</i>	ATCC51457
<i>M.conceptionense</i>	JCM15299	<i>M.intermedium</i>	ATCC51848
<i>M.confluentis</i>	ATCC49920	<i>M.intracellulare</i>	ATCC13950
<i>M.conspicuum</i>	ATCC700090	<i>M.iranicum</i>	JCM17461
		<i>M.kansasii</i>	ATCC12478

MTBの評価を終了した後、同じ核酸抽出検体を用いTRCReady® MACの評価を同様に実施した。

結 果

(1) TRCReady® MTBによる結核菌群の同定特異性

結核菌群4種は全て結核菌群陽性となり、正しく同定された。NTM 147種のうち139種は正しく陰性（非検出）と判定された。しかし、*M.bohemicum* (JCM12402), *M.heidelbergense* (ATCC51253), *M.lacus* (JCM15657), *M.malmoense* (ATCC29571), *M.marinum* (ATCC927), *M.parascrofulaceum* (JCM13015), *M.parmense* (JCM14742) および *M.saskatchewanense* (JCM13016) は内部コントロールが陰性であったため判定保留となった。これらのNTM 8種の検体（菌液）で増幅過程の阻害が考えられたため、菌原液を100倍希釈した菌液を作製して再測定を行ったところ、全て結核菌群陰性かつ内部コントロ

ル陽性となり、結核菌群陰性の判定となった。よってTRCReady® MTBの同定特異性（陽性陰性一致率）は100%であった。

(2) TRCReady® MACによる *M.avium* および *M.intracellulare* の同定特異性

M.avium の subspecies である *M.avium* subsp. *avium* (ATCC 25291), *M.avium* subsp. *paratuberculosis* (ATCC 19698) および *M.avium* subsp. *silvaticum* (ATCC49884) は *M.avium* として、*M.intracellulare* (ATCC13950) は *M.intracellulare* として正しく同定された。その他のNTM 143種中136種と結核菌群4種は陰性と判定された。しかし、*M.bohemicum* (JCM12402) はTRCReady® MTBの場合と同様に内部コントロールが陰性であったため判定保留となった。*M.arosiense* (DSM45069), *M.chimaera* (JCM14737), *M.colombiense* (JCM16228), *M.marseillense* (JCM17324), *M.vulneris* (JCM18115) および *M.yongonense*

Table 1 —Continued

Species	Strains	Species	Strains
<i>M.komossense</i>	ATCC33013	<i>M.poriferae</i>	ATCC35087
<i>M.koreense</i>	DSM 45576	<i>M.pseudoshottsii</i>	JCM15466
<i>M.kubicae</i>	ATCC700732	<i>M.psychrotolerans</i>	JCM13323
<i>M.kumamotonense</i>	JCM13453	<i>M.pulveris</i>	ATCC35154
<i>M.kyorinense</i>	JCM15038	<i>M.pyrenivorans</i>	JCM15927
<i>M.lacus</i>	JCM15657	<i>M.rhodesiae</i>	ATCC27024
<i>M.lentiflavum</i>	ATCC51985	<i>M.riyadhense</i>	DSM 45176
<i>M.litorale</i>	JCM17423	<i>M.rufum</i>	JCM16372
<i>M.llatzerense</i>	JCM16229	<i>M.rutilum</i>	JCM16371
<i>M.longobardum</i>	DSM 45394	<i>M.salmoniphilum</i>	DSM 43276
<i>M.mageritense</i>	ATCC700351	<i>M.saskatchewanense</i>	JCM13016
<i>M.malmoense</i>	ATCC29571	<i>M.scrofulaceum</i>	ATCC19981
<i>M.mantenui</i>	JCM18113	<i>M.senegalense</i>	ATCC35796
<i>M.marinum</i>	ATCC927	<i>M.senuense</i>	JCM16017
<i>M.marseillense</i>	JCM17324	<i>M.seoulense</i>	JCM16018
<i>M.minnesotense</i>	JCM17932	<i>M.septicum</i>	ATCC700731
<i>M.monacense</i>	JCM15658	<i>M.setense</i>	JCM15660
<i>M.montefiorensis</i>	ATCC BAA-256	<i>M.sherrisii</i>	DSM 45441
<i>M.moriokaense</i>	ATCC43059	<i>M.shimoidei</i>	ATCC27962
<i>M.mucogenicum</i>	ATCC49650	<i>M.shinjukuense</i>	JCM14233
<i>M.murale</i>	JCM13392	<i>M.shottsii</i>	JCM12657
<i>M.nebraskense</i>	DSM 44803	<i>M.simiae</i>	ATCC25275
<i>M.neoaurum</i>	ATCC25795	<i>M.smegmatis</i>	ATCC19420
<i>M.nonchromogenicum</i>	ATCC19530	<i>M.stomatepieae</i>	JCM17783
<i>M.noviomagense</i>	JCM16367	<i>M.szulgai</i>	ATCC35799
<i>M.novocastrense</i>	JCM18114	<i>M.terrae</i>	ATCC15755
<i>M.pallens</i>	JCM16370	<i>M.thermoresistibile</i>	ATCC19527
<i>M.palustre</i>	DSM 44572	<i>M.tokaiense</i>	ATCC27282
<i>M.paraffinicum</i>	ATCC12670	<i>M.triplex</i>	ATCC700071
<i>M.parafortuitum</i>	ATCC19686	<i>M.triviale</i>	ATCC23292
<i>M.parakoreense</i>	DSM 45575	<i>M.tusciae</i>	JCM12692
<i>M.parascrofulaceum</i>	JCM13015	<i>M.ulcerans</i>	ATCC19423
<i>M.paraseoulense</i>	JCM16952	<i>M.vacciae</i>	ATCC15483
<i>M.parmense</i>	JCM14742	<i>M.vanbaalenii</i>	JCM13017
<i>M.peregrinum</i>	ATCC14467	<i>M.vulneris</i>	JCM18115
<i>M.phlei</i>	ATCC11758	<i>M.wolinskyi</i>	ATCC700010
<i>M.phocaicum</i>	JCM15301	<i>M.xenopi</i>	ATCC19250
<i>M.porcinum</i>	ATCC33776	<i>M.yongonense</i>	DSM 45126

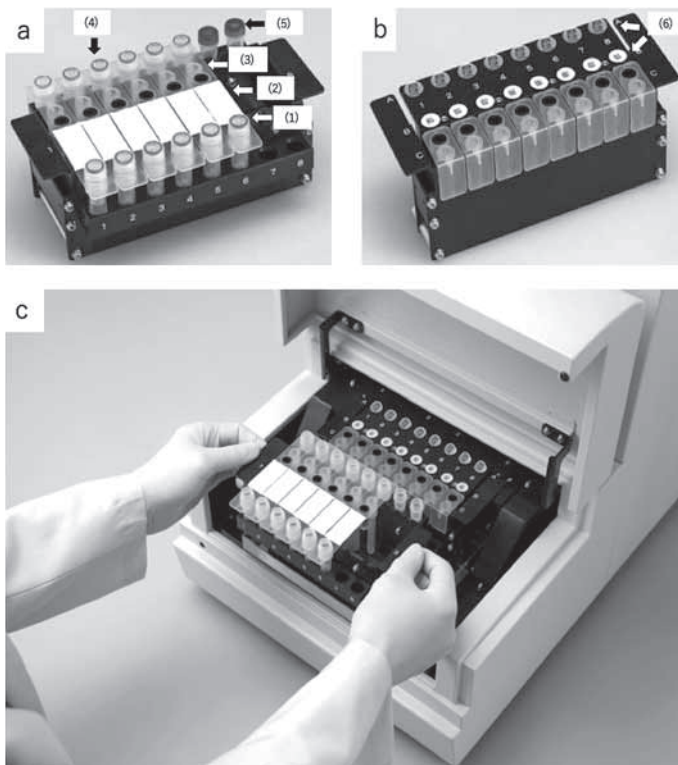


Fig. (a) The set of solutions is for purifying nucleic acid from sample, and contains internal quality controls (5). Nucleic acid is released from pretreated sample by denaturant (1). The nucleic acid adheres to immobilized silica inside tip (3) and is recovered (4) by eluent (2). (b) Amplification of the extracted and purified nucleic acid starts after mixing with TRCReady[®] MTB or TRCReady[®] MAC reagents (6). (c) The reagents and samples are set in TRCReady[®]-80.

Table 2 *Mycobacterium* type strains which showed indeterminate or false positive results to *M. intracellulare* by TRCReady[®] MAC

Species	Identification	No dilution			1/100 diluted (re-testing)		
		<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	IC	<i>M. avium</i>	<i>M. intracellulare</i>	IC
<i>M. bohemicum</i>	JCM12402	FNE	FNE	—	—	—	+
<i>M. arosiense</i>	DSM 45069	—	+	+	—	+	+
<i>M. chimaera</i>	JCM14737	—	+	+	—	+	+
<i>M. colombiense</i>	JCM16228	—	+	+	—	+	+
<i>M. marseillense</i>	JCM17324	—	+	+	—	+	+
<i>M. vulneris</i>	JCM18115	—	+	+	—	+	+
<i>M. yongonense</i>	DSM 45126	—	+	+	—	+	+

IC: Internal control, FNE: false negative

(DSM45126) の6種は *M. intracellulare* と誤同定された。

上記の判定保留1種および *M. intracellulare* と誤同定された6種について、結核菌群の場合と同様に100倍希釈した菌液を作製し再測定を行った。前者は *M. avium* も *M. intracellulare* も陰性となり、かつ内部コントロールも陽性で正しく判定（非検出）されたが、後者6種は再検でも *M. intracellulare* と判定（誤同定）された（Table 2）。よってTRCReady[®] MACの同定特異性は96.0%（145/151）となった。

考 察

抗酸菌基準株を用いて、TRCReady[®] MTBおよびTRCReady[®] MACの結核菌群、*M. avium*および*M. intracellulare*の同定精度を評価した。

TRCReady[®] MTBでは、結核菌群4種は全て結核菌群

と同定された。TRCを原理とした先行試薬TRCRapid[®] M.TBは *M. marinum* および *M. shinjukuense* が結核菌群に偽陽性となる報告があるが⁵⁾⁶⁾、TRCReady[®] MTBでは認められなかった。TRCReady[®] MTBのプライマー設計が変更されたためと考えられた。TRCReady[®] MTBおよびTRCReady[®] MACは16S rRNA配列を利用しているため、この配列が同一である結核菌群を種レベルまで鑑別することはできないが、近年本邦でヒトから分離される結核菌群は *M. tuberculosis sensu stricto* あるいは *M. bovis* BCG にほぼ限定されると考えられる⁷⁾⁸⁾。TRCReady[®] MTBは両者を鑑別することはできないため、乳幼児のBCGワクチン接種後の骨炎や、膀胱癌でのBCG治療後の尿からの結核菌群検出など、同定された結核菌群がBCGであることが疑われる場合は、マルチプレックスPCRなど他⁸⁾⁹⁾の方法で両者の鑑別が必要である。

TRCReady® MACは*M. avium* 3亜種および*M. intracellulare*を全て正しく同定した。臨床分離*M. avium*のほとんどは*M. avium* subsp. *hominissuis*である¹⁰⁾が種として登録されていない。そのためTRCReady® MACで*M. avium*と判定された臨床分離株2株についてIS901, IS1311, IS900およびDT1を用いたマルチプレックスPCRによる*M. avium*亜種鑑別を行い*M. avium* subsp. *hominissuis*であることを確認した(データ無し)。

TRCReady® MACでNTM 6種が*M. intracellulare*に誤同定された。これらの菌種と*M. intracellulare*の16S rRNAの塩基配列を比較する(一致塩基数/比較塩基数)と、一致率は*M. arosiense* 99.7% (1484/1489), *M. chimaera* 99.9% (1448/1449), *M. colombiense* 99.5% (1482/1489), *M. marseillense* 99.8% (1437/1440), *M. vulneris* 99.4% (1462/1471), *M. yongonense* 99.4% (1480/1489)であり、高い相同性が認められた。また、抗酸菌同定に一般に利用される16S rRNA hypervariable region A¹¹⁾ (139塩基, *E. coli* positions 129 to 267)を*M. intracellulare*と比較すると、*M. arosiense*, *M. chimaera*, *M. colombiense*, *M. marseillense*, *M. vulneris*および*M. yongonense*はそれぞれ2, 0, 2, 2, 1および2塩基の違い(一致率98.6%以上)であった。TRCReady® MACのプライマー情報は公開されていないため、実際の増幅領域で相同性を比較することはできないが、TRCReady® MACがこれら6種を*M. intracellulare*と誤って同定した原因として、増幅標的配列の強い類似性が考えられた。われわれは国内で承認されている他のMAC同定用核酸増幅試薬について評価を行っていないが、16S rRNAまたは16S rDNAをターゲットとしている試薬はこれら6種において同様の誤同定の可能性があると考えられた。日本国内では患者喀痰から汚染された滅菌水供給装置に由来すると考えられる*M. chimaera*の分離(4例)が報告されているが¹²⁾、われわれの知るかぎり他5種の分離報告はない。しかしながら、近年の稀少抗酸菌種の分離増加を考えると、今後もこれらのNTMが臨床的に分離されないとは限らない。よってこの誤同定を認識したうえでTRCReady® MACを用いるべきと考えられた。*M. intracellulare*とこれらNTM 6種を一般検査室で鑑別しようとする場合、*M. arosiense*と*M. vulneris*はRunyon II (scotochromogen)であり^{13) 14)}比較的容易に鑑別可能と考えられる。一方、他4種は*M. intracellulare*と同じRunyon III (nonphotochromogen)である。*M. marseillense*は45°Cで発育可能であり¹⁵⁾、*M. colombiense*はウレアーゼ試験陽性である¹⁶⁾ので、それでも比較的容易に鑑別可能と思われる。Line probe assayであるINNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics, 国内未承認)を利用すれば、*M. intracellulare*は*M. intracellulare*-1に、*M. chimaera*は*M. intracellulare*-2のProbeに反応することから鑑別が可能である^{16) 17)}。

*M. yongonense*はpH 5.5のMiddlebrook7H9培地でも発育可能とされており、鑑別に有用である。また、脂質のMatrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) プロファイルにおいて*m/z* 1965.7に特徴的なピークが認められるが、*M. intracellulare*, *M. chimaera*および*M. colombiense*には認められなかったと報告されている¹⁸⁾。*M. intracellulare*は喀痰、気管支吸引液、気管支洗浄液および胃液などの呼吸器関連検体からの分離が多いが、*M. arosiense*, *M. colombiense*および*M. vulneris*はそれぞれ骨髄病変、血液およびリンパ節とイヌ咬傷後創傷から分離されたと報告されている^{13) 14) 16)}。これらの事実から、TRCReady® MACで*M. intracellulare*と判定され、コロニーに発色が認められた場合や呼吸器関連以外の検体の場合は*M. intracellulare*以外のNTMを疑い*rpoB*遺伝子、*hsp65*遺伝子および16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS)等のシーケンスを行う必要があると考えられた。

TRCReady® MTBおよびTRCReady® MACで、複数の種において菌濃度が高いために増幅阻害が発生したと考えられた。今回菌液はO.D 0.10~0.12に調製したが、これはほぼ $10^7\sim 10^8$ CFU/mlに相当する。TRC法はrRNAをターゲットとしているため単純比較はできないが、NALC-NaOH処理後の臨床検体を使用する場合は、検体200 μ lを使用するように添付文書に記載されているので、計算上は濃度がおおよそ 10^6 CFU/ml以上となる検体の場合は増幅阻害が起こる可能性が考えられた。抗酸菌検査ガイド2016¹⁹⁾の蛍光法による塗抹陽性度(3+)は 3.3×10^5 /ml以上に相当するため²⁰⁾、かなりの菌数を含む検体でなければ増幅阻害は起こらないと考えられたが、培養液から同定を試みる場合は注意が必要と考えられた。

結論として、TRCReady® MTBとTRCReady® MACの同定特異性はそれぞれ100%および96.0%となり、体外診断試薬としてきわめて高精度と考えられた。今回評価対象としなかったが、核酸精製、増幅、検出および判定までが自動化されたことにより、検出系の安定性(再現性)の向上や交差汚染の減少、微生物検査室の業務低減も期待できるものと考えられた。

著者のCOI (conflict of interest) 開示: 本論文発表内容に関して特に申告なし。

文 献

- 1) 厚生労働省: 平成26年結核登録者情報調査年報集計結果(概況). <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou03/14.html> (2016年3月25日閲覧)
- 2) Namkoong H, Kurashima A, Morimoto K, et al.: Epidemiology of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease,

- Japan. Emerg Infect Dis. 2016 ; 22 : 1116-1117.
- 3) 富田元久, 吉田志緒美, 露口一成, 他: *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. 結核. 2014 ; 89 : 703-709.
 - 4) Tortoli E, Pecorari M, Fabio G, et al.: Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. J Clin Microbiol. 2010 ; 48 : 307-310.
 - 5) Tanaka H, Hirose H, Kato Y, et al.: Clinical evaluation of TRCRapid M.TB for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and nonrespiratory specimens. J Clin Microbiol. 2010 ; 48 : 1536-1541.
 - 6) 青野昭男, 鹿住祐子, 前田伸司, 他: 結核菌群用同定キットで陽性を示した非結核性抗酸菌について. 結核. 2010 ; 85 : 461-464.
 - 7) Ueyama M, Chikamatsu K, Aono A, et al.: Sub-speciation of *Mycobacterium tuberculosis* complex from tuberculosis patients in Japan. Tuberculosis. 2014 ; 94 : 15-19.
 - 8) Chikamatsu K, Aono A, Yamada H, et al.: Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex. BMC Infect Dis. 2014 ; 14 : 54.
 - 9) Kasai H, Ezaki T, Harayama S: Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences. J Clin Microbiol. 2000 ; 38 : 301-308.
 - 10) Ichikawa K, Yagi T, Moriyama M, et al.: Characterization of *Mycobacterium avium* clinical isolates in Japan using subspecies-specific insertion sequences, and identification of a new insertion sequence, ISMav6. J Med Microbiol. 2009 ; 58 : 945-950.
 - 11) Springer B, Stockman L, Teschner K, et al.: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. J Clin Microbiol. 1996 ; 34 : 296-303.
 - 12) 吉田志緒美, 東 桃代, 露口一成, 他: 滅菌水供給装置の汚染が原因と考えられた*Mycobacterium chimaera*の疑似アウトブレイク. 結核. 2016 ; 91 : 310 (第91回総会抄録).
 - 13) Bang D, Herlin T, Stegger M, et al.: *Mycobacterium arosiense* sp. nov., a slowly growing, scotochromogenic species causing osteomyelitis in an immunocompromised child. Int J Syst Evol Microbiol. 2008 ; 58 : 2398-2402.
 - 14) van Ingen J, Boeree MJ, Kösters K, et al.: Proposal to elevate *Mycobacterium avium* complex ITS sequevar MAC-Q to *Mycobacterium vulneris* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 ; 59 : 2277-2282.
 - 15) Ben Salah I, Cayrou C, Raoult D, et al.: *Mycobacterium marseillense* sp. nov., *Mycobacterium timonense* sp. nov. and *Mycobacterium bouchedurhonense* sp. nov., members of the *Mycobacterium avium* complex. Int J Syst Evol Microbiol. 2009 ; 59 : 2803-2808.
 - 16) Murcia MI, Tortoli E, Menendez MC, et al.: *Mycobacterium colombiense* sp. nov., a novel member of the *Mycobacterium avium* complex and description of MAC-X as a new ITS genetic variant. Int J Syst Evol Microbiol. 2006 ; 56 : 2049-2054.
 - 17) Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, et al.: Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2004 ; 54 : 1277-1285.
 - 18) Kim BJ, Math RK, Jeon CO, et al.: *Mycobacterium yongonense* sp. nov., a slow-growing non-chromogenic species closely related to *Mycobacterium intracellulare*. Int J Syst Evol Microbiol. 2013 ; 63 : 192-199.
 - 19) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会: 「抗酸菌検査ガイド2016」, 南江堂, 東京, 2016, 33-38.
 - 20) Chikamatsu K, Aono A, Kato T, et al.: COBAS® TaqMan® MTB, smear positivity grade and MGIT culture; correlation analyses of three methods for bacillary quantification. J Infect Chemother. 2016 ; 22 : 19-23.

Original Article

SPECIFICITY EVALUATION OF TRCReady® MTB AND TRCReady® MAC FOR IDENTIFYING *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* COMPLEX, *MYCOBACTERIUM AVIUM* AND *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE*

Kinuyo CHIKAMATSU, Yuriko IGARASHI, Akio AONO, Hiroyuki YAMADA,
Akiko TAKAKI, and Satoshi MITARAI

Abstract [Objective] To evaluate the specificity of TRCReady® MTB and TRCReady® MAC (Tosoh Bioscience, Japan) for identifying *M.tuberculosis* complex (MTC), *M.avium* and *M.intracellulare*.

[Method] We tested TRCReady® MTB and TRCReady® MAC using TRCReady®-80 (Tosoh Bioscience, Japan), which is an automated nucleic amplification test instrument, with 151 *Mycobacterium* species (4 MTC and 147 Non-tuberculosis *Mycobacterium* (NTM) type strains).

[Results] The specificity of TRCReady® MTB was 100%, however, TRCReady® MAC misidentified a total of six NTMs, *M.arosiense*, *M.chimaera*, *M.colombiense*, *M.marseillense*, *M.vulneris* and *M.yongonense*, as *M.intracellulare*. Then, the specificity for TRCReady® MAC was 96.0% (145/151).

[Discussion] TRCReady® MTB and TRCReady® MAC are highly specific for identifying MTC, *M.avium* and *M.intracellulare*. Six NTM species which have been rarely

isolated in Japan showed false-positive results as *M.intracellulare*. However, when a sample was identified as *M.intracellulare*, the phenotypic characteristics like colony morphology would be carefully examined.

Key words : TRCReady, *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *Mycobacterium* species identification

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)