

Line Probe Assay (LiPA)によるリファンピシン耐性結核菌群の喀痰からの直接検出

¹樋口 武史 ²伏脇 猛司 ²田中奈加子 ³三宅 正剛
³小倉 剛 ⁴吉多 仁子 ⁵高嶋 哲也 ⁶中川 勝
⁶前倉 亮治 ⁶平賀 通 ⁷末竹 寿紀

要旨：〔目的〕リファンピシン (RFP) 耐性結核菌群検出試薬「フィノス LiPA・Rif TB」(以下, LiPA) を用い, 喀痰から直接結核菌群の検出ならびに RFP 感受性判定についての可能性を評価した。〔方法〕喀痰 130 例を収集し, 「LiPA」ならびに「アンプリコア マイコバクテリウム ツベルクローシス」(以下, アンプリコア) にて結核菌群の遺伝子検出を行った。また, 培養陽性となったものに関しては RFP 感受性試験を行い, 「LiPA」での判定結果と比較した。〔結果〕結核菌群 84 例中 82 例は「LiPA」で陽性となり, 喀痰から結核菌群が検出された。非結核性抗酸菌ならびに陰性 46 例はすべて陰性であった。検出感度は「アンプリコア」と同等の成績であった。培養陽性 42 例の RFP 感受性試験の判定結果では, RFP 耐性菌 22 例はすべて「LiPA」で変異型と判定された。RFP 感受性菌 20 例では 19 例が野生型であったが, 1 例は野生型と変異型の混在を示した。〔結論〕「フィノス LiPA・Rif TB」を喀痰に用いることで RFP 耐性結核患者を早期に発見できれば临床上非常に有用と考えられる。

キーワード：結核菌, *rpoB* 遺伝子, リファンピシン耐性, ラインプローブアッセイ, 喀痰

はじめに

結核菌の薬剤感受性試験は, 1% 小川培地や Middlebrook 7H10 寒天培地が使用されてきたが, 最近ではその迅速性から液体培地が使用されてきている。しかしながら, いずれも薬剤含有培地での培養によるものであり, 結果が得られるまでに数日から数週間の時間を要している。

近年, 遺伝子学的手法により結核菌の薬剤耐性に関与する遺伝子がイソニアジド (INH)^{1)~3)}, リファンピシン (RFP)^{4)~9)}, ピラジナミド^{10)~12)}, ストレプトマイシン (SM)^{13)~15)}, エタンプトール^{16) 17)}, カナマイシン^{18) 19)}, フルオロキノロン²⁰⁾などで明らかにされてきている。なかでも RFP 耐性については, 耐性菌の約 95% が RNA ポリメラーゼの β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子に変異がみられ, その変異は 23 個のアミノ酸 (69 bp) からなる領域 (ホットスポット領域) に集中している。

「INNO-LiPA Rif TB」(INNOGENETICS 社, ベルギー) は, リバースハイブリダイゼーション法に基づいた line probe assay (LiPA) により, 結核菌群の鑑別に加え *rpoB* 遺伝子のホットスポット領域の変異を検出するキット^{21)~25)}であり, 本邦には「フィノス LiPA・Rif TB」(ニプロ株式会社, 大阪)として導入されている。検出に要する時間は遺伝子の増幅を含め約 5 時間であり, 迅速に RFP に対する感受性が判定できる。

一般に RFP 耐性の頻度は INH 耐性や SM 耐性より低い²⁶⁾, RFP 耐性菌はしばしば INH 耐性を伴い^{27) 28)}, それゆえ患者の適切な治療と結核対策のために, 迅速で信頼性の高い結核菌群の検出および薬剤感受性試験法の開発が望まれている。そのため, 「フィノス LiPA・Rif TB」を喀痰に用いることで RFP 耐性結核患者を早期に発見できれば临床上有用であると考えられる。

「フィノス LiPA・Rif TB」は培養分離菌株を検査の対象としているが, 今回, 3 施設より喀痰 130 例を収集し,

¹京都大学医学部附属病院検査部, ²結核予防会大阪府支部大阪病院診断検査部, ³内科, ⁴大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター検査部, ⁵結核内科, ⁶国立病院機構刀根山病院内科, ⁷ニプロ株式会社総合研究所

連絡先: 樋口武史, 京都大学医学部附属病院検査部, 〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町 54
(E-mail: higuchit@kuhp.kyoto-u.ac.jp)

(Received 28 Jun. 2004 / Accepted 27 Aug. 2004)

喀痰から直接の結核菌群の検出ならびに RFP 感受性判定についての可能性を評価した。

材料と方法

(1) 検体

2003年1月から2003年10月までの間に結核予防会大阪府支部大阪病院, 大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター, 国立病院機構刀根山病院の各施設で確定診断された患者から喀痰130例(結核84例, 非結核性抗酸菌10例, 陰性36例)を収集した。喀痰はスプータザイム(極東製薬工業, 東京)で均一化したものをN-アセチルL-システイン水酸化ナトリウム処理後, 均一化検体を3等分し, 結核菌群遺伝子の検出ならびに培養検査に供した。

(2) 結核菌群遺伝子の検出

喀痰からの結核菌群遺伝子の検出は, 「フィノス LiPA・Rif TB」および「アンプリコア マイコバクテリウム ツベルクローシス」²⁹⁾(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社, 東京)にて行った。また, 培養陽性となったものについても同様に結核菌群遺伝子の検出を行った。

(3) 培養

前処理した喀痰の一部を「Mycobacteria growth indicator tube (MGIT)/BACTEC MGIT 960 システム」³⁰⁾(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京)により培養を行った。培養陽性検体については「BACTEC MGIT 960 AST 結核菌薬剤感受性検査用ミジットシリーズ」(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京)により RFP に対する感受性を判定した。

(4) *rpoB* 遺伝子の増幅

喀痰から *rpoB* 遺伝子を増幅するにあたっては以下の方法を用いた。

まず, 均一化検体を 12,000 rpm で 15 分間遠心し, 上清を捨て, Tris-EDTA (TE) buffer を 100 μ l 加えた。再度 12,000 rpm で 15 分間遠心し, 上清を捨て, TE buffer を 50 μ l 加え, よく混和した後, 95°C で 30 分間加熱, 次いで 30 分間凍結した。

次いで, *rpoB* 遺伝子を増幅するために, outer primer を用いて一度増幅した後, 再度 inner primer で増幅する nested-PCR を行った。すなわち, 「結核菌群 *rpoB* 遺伝子増幅試薬(喀痰用)」(ニプロ株式会社)を用いて, 上記の処理をしたサンプル 5 μ l から *rpoB* 遺伝子の増幅を行った。さらにその増幅産物 1 μ l を使用し, 「結核菌群 *rpoB* 遺伝子増幅試薬」(ニプロ株式会社)を用いて, 再度 *rpoB* 遺伝子の増幅を行い, LiPA の検体とした。

(5) Line Probe Assay

「フィノス LiPA・Rif TB」は, 結核菌群特異的プロ

ブ TB および 9 種の *rpoB* 遺伝子プローブ (S1~S5, R2, R4a, R4b, R5) が固定されたストリップに増幅した DNA をハイブリダイズさせ, 変異の有無を検出する。すなわち, ビオチン化して増幅した *rpoB* 遺伝子をストリップ上のプローブにハイブリダイズさせる。塩基配列が一致したプローブに増幅 DNA が結合する。ストリップを洗浄した後, アルカリフォスターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ, 基質を加えることで発色をみる。

プローブ S1~S5 は野生型の塩基配列に対応し, 野生型の結核菌群の場合にはプローブ S1~S5 の 5 種すべてに発色のみられ, RFP 感受性と判定する。変異が存在する場合, 変異部位に相当するプローブでの発色はみられず, RFP 耐性と判定する。加えて高頻度に見られる変異を確認するために 4 種の R プローブ (R2: Asp-516-Val, R4a: His-526-Tyr, R4b: His-526-Asp, R5: Ser-531-Leu) が用意されており, これらの変異型の結核菌群では該当する R プローブが発色する²⁵⁾ (Fig. (a))。

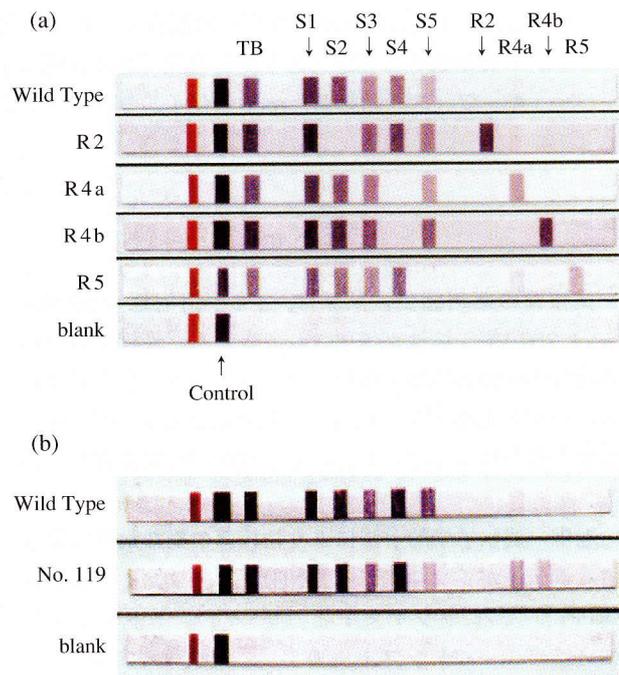


Fig. Representative hybridization patterns obtained with line probe strips.

(a) The control line (Control) provides an internal control for the color development reaction. The TB line (TB) is a specific probe for *M. tuberculosis* complex. The S and R probes are described in "Materials and Methods".

(b) LiPA profile of RFP-resistant *M. tuberculosis* (No. 119). Probe S5 does not disappear completely, and probe R4a and R4b show false positive reaction.

Table 1 Identification of *M. tuberculosis* complex from sputum

Sputum (n)	LiPA Reaction with TB probe		Amplicor	
	Positive	Negative	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i> (84)	82	2 ^b	82	2 ^c
MOTT ^a (10)	0	10	0	10
Negative sample (36)	0	36	0	36
Total (130)	82	48	82	48

^aMycobacteria other than *M. tuberculosis*^bSample No. 101 and 130^cSample No. 21 and 130**Table 2** Comparison of the results of the line probe assay with the *in vitro* susceptibility test

Susceptibility (n)	LiPA profile	
	Wild type	Mutation
RFP-sensitive (20)	19	1 ^a
RFP-resistant (22)	0	22
Total (42)	19	23

^aSample No. 78**Table 3** Discrepant results between line probe assay, Amplicor and *in vitro* susceptibility test

Sample	Sputum (Pre-cultivation)		Cultivation	Post-cultivation		
	LiPA	Amplicor		LiPA	Amplicor	Susceptibility
21	WT	—	+	WT	+	Sensitive
78	WT + R5	+	+	WT	+	Sensitive
101	—	+	—			
130	—	—	+	WT	+	Sensitive

結 果

収集した喀痰130例の「フィノス LiPA・Rif TB」(以下, LiPA)ならびに「アンプリコア マイコバクテリウム ツベルクローシス」(以下, アンプリコア)による結核菌群の検出結果をTable 1に示した。結核菌群84例のうち, 陽性を示したのは両者ともに82例であり, 2例は陰性であった。また, 非結核性抗酸菌10例および陰性36例はすべて陰性であった。LiPAで陰性となった2例(No. 101, 130; Table 3)のうち, 一方(No. 101)はアンプリコアでは陽性であった。もう一方(No. 130)はアンプリコアでも陰性であったが, 培養陽性であった。アンプリコアで陰性となった2例(No. 21, 130; Table 3)のうち, 一方(No. 21)は, LiPAで陽性と検出されていた。

LiPAでのRFP感受性の判定結果を評価するために, 結核菌群として同定された82例のうち培養陽性となった42例について培養によるRFP感受性試験の結果と比較した(Table 2)。RFP耐性菌22例はLiPAですべて変異型であると判定され, RFP感受性菌20例では19例が野

生型と判定された。1例は培養前のLiPAでは野生型と変異型(R5)が混在している結果を示したが(No. 78; Table 3), 培養菌株では野生型のみで, 変異型(R5)の発色はみられなかった。

また, 喀痰130例のうち, 培養陽性となり分離菌株が得られたものは結核菌群43例, 非結核性抗酸菌5例の計48例存在し, LiPAによる結核菌群の同定ならびにRFP感受性の判定はすべて一致した。さらに, 喀痰と培養菌株でのLiPAの結果を比較すると, ほぼ一致する結果が得られた(Table 4)。培養後, 結核菌群陽性となった43例中42例は喀痰から直接陽性と判定され, 喀痰から検出されなかったのは1例(No. 130; Table 4)のみであった(Table 4 (a))。RFP感受性判定に関してもほぼ一致しており, 喀痰と培養菌株で結果が異なったのは42例中1例のみであり(Table 4 (b)), 喀痰中に野生型と変異型の混在を示したもの(No. 78; Table 3)であった。

考 察

RFPの作用機構はRNAポリメラーゼのβサブユニッ

Table 4 Comparison of the results of the line probe assay from sputum and from cultivated strain

(a) Detection of *M. tuberculosis* by LiPA

Post-cultivation (Strain)	Pre-cultivation (Sputum)	
	Positive	Negative
Positive	42	1 ^a
Negative	0	5
Total	42	6

^aSample No. 130

(b) Genotype of *rpoB* by LiPA

Post-cultivation (Strain)	Pre-cultivation (Sputum)	
	Wild Type	Mutation
Wild Type	20	1 ^a
Mutation	0	21
Total	20	22

^aSample No. 78

トに薬剤が結合することにより RNA の伸長と転写に影響を与えるものと考えられている。RFP 耐性結核菌の約 95% は β サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子の約 69 塩基対からなるホットスポット領域に変異を持つが、感受性株には変異がみられないことが報告されている。

今回、確定診断がなされた患者から収集した喀痰 130 例から直接検出を行い、RFP 感受性判定の可能性を検討した。喀痰 130 例のうち、培養陽性となったのは 48 例(結核 42 例、非結核性抗酸菌 6 例)であった。液体培地を使用したにもかかわらず培養陽性数が少ないのは、耐性菌の中には培養されにくい場合があることや、施設間の検体の保存や輸送状態が必ずしも良くなかったことなどが原因と思われる。

喀痰 130 例中 128 例は LiPA で正しく判定され、アンプリコアでの検出感度と同等であることが示された (Table 1)。また、LiPA で喀痰から直接 RFP 感受性判定をした結果と培養菌株から判定した結果では、42 例中 41 例は正しく判定された。結果が異なった 1 例 (No. 78) は、LiPA では野生型と変異型の混在を示したが、培養による薬剤感受性試験では感受性であった。これに関しては、培養後の LiPA の結果は野生型を示していた。喀痰中には野生型と変異型が混在していたものの、野生型に比べて変異型は発育速度が遅いことがあり、培養することにより旺盛に発育した野生型に変異型が隠されてしまったためと考えられる。

また、RFP 耐性結核菌群のうち 1 例の LiPA の結果では偽陽性のみられるものがあつた (No. 119, Fig. (b))。この検体ではプローブ S5 が同時に試験した野生型のものよりも明らかに発色が弱く、かつプローブ R4a, R4b

での弱発色がみられた。これに関しては、再試験を行っても同様の結果であり、*rpoB* 遺伝子の塩基配列中で 533 番目の T の欠損 (533 cTg \rightarrow c-g) があることが判明した。また、培養陽性であり、RFP 耐性であった (Table 4)。このような発色パターンは 533 番目のアミノ酸部位に変異がある場合によくみられることが知られており²¹⁾、DNA の二次構造による非特異結合のために弱発色するものと考えられている。今回認められた欠損変異はこれまでのところ他に報告例はなく、稀な変異株であると考えられるが、このような場合があることを念頭において判定する必要がある。

LiPA に関しては、これまで培養菌株を検体とした報告は数多くなされておられ、本邦でも阿部らがその有用性を報告している²⁵⁾が、喀痰からの直接検出を行った報告例^{27)31~33)}は少ない。今回、「フィノス LiPA・Rif TB」を喀痰に用いるにあたって、培養菌株からでは 1 回の増幅で十分なところ、DNA を十分量増幅するために PCR を 2 度行う nested-PCR にて増幅し検出を行った。そのため、結果を得るのに 1~2 日要するが、培養を待たずに RFP 感受性の判定を喀痰の段階で行うことができ、RFP 耐性結核患者を早期に発見することができると思われる。

文 献

- 1) Zhang Y, Heym B, Allen B, et al.: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992; 358: 591-593.
- 2) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, et al.: *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 1994; 263: 227-230.
- 3) Goto M, Oka S, Tachikawa N, et al.: *katG* sequence deletion is not major cause of isoniazid resistance in Japanese and Yemeni *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mol Cellular Probes*. 1995; 9: 433-439.
- 4) Jin D, Gross CA: Characterization of the pleiotropic phenotypes of rifampin-resistant *rpoB* mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1989; 171: 5229-5231.
- 5) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of rifampicin-resistant mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*. 1993; 341: 647-650.
- 6) Williams DL, Waguespack C, Eisenach K, et al.: Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994; 38: 2380-2386.
- 7) Suzuki Y, Katsukawa C, Inoue K, et al.: Mutations in *rpoB* gene of rifampicin resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Jpn Assoc Infect Dis*. 1995; 69: 413-419.
- 8) Taniguchi H, Aramaki H, Nikaido Y, et al.: Rifampicin resistance and mutation of the *rpoB* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett*. 1996; 144: 103-108.

- 9) Ohno H, Koga H, Kohno S, et al.: Relationship between rifampin MICs and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 1053–1056.
- 10) Scorpio A, Zhang Y: Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the anti-tuberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. *Nat Med.* 1996; 2: 662–667.
- 11) Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, et al.: Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 636–641.
- 12) Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, et al.: Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung Dis.* 1998; 78: 117–122.
- 13) Finken M, Kirschner P, Meier A, et al.: Molecular basis of streptomycin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: alterations of the ribosomal S12 gene and point mutations within a functional 16S ribosomal RNA pseudoknot. *Mol Microbiol.* 1993; 9: 1239–1246.
- 14) Katsukawa C, Tamaru A, Miyata Y, et al.: Characterization of the *rpsL* and *rrs* genes of streptomycin-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Japan. *J Appl Microbiol.* 1997; 83: 634–640.
- 15) Nair J, Rouse DA, Bai G-H, et al.: The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 1993; 10: 521–527.
- 16) Belanger AE, Besra GS, Ford ME, et al.: The *embAB* genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 11919–11924.
- 17) Sreevatsan S, Stochbauer KE, Pan X, et al.: Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of *embB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 1677–1681.
- 18) Taniguchi H, Chang B, Abe C, et al.: Molecular analysis of kanamycin and viomycin resistance in *Mycobacterium smegmatis* by use of the conjugation system. *J Bacteriol.* 1997; 179: 4795–4801.
- 19) 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.
- 20) Cambau E, Sougakoff W, Besson M, et al.: Selection of a *gyrA* mutant of *Myconacterium tuberculosis* resistant to fluoroquinolones during treatment with ofloxacin. *J Infect Dis.* 1994; 170: 479–483.
- 21) Rossau R, Traore H, de Beenhouwer H, et al.: Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the stimulation detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 2093–2098.
- 22) Hirano K, Abe C, Takahashi M: Mutations in the *rpoB* gene of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated mostly in Asian countries and their rapid detection by line probe assay. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 2663–2666.
- 23) Cooksey RC, Morlock GP, Glichman S, et al.: Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1281–1283.
- 24) Liu Y-C, Huang T-S, Huang W-K: Line probe assay for rapid detection of mutations in the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Formos Med Assoc.* 1999; 98: 582–585.
- 25) 阿部千代治, 尾形英雄, 河田兼光, 他: Line Probe Assay (LiPA) によるリファンピシン耐性結核菌の検出. *結核.* 2000; 75: 575–581.
- 26) Laszlo A, Rahman M, Espinal M, et al.: Quality assurance programme for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in the WHO/IUATLD Supranational Reference Laboratory Network: five rounds of proficiency testing, 1994–1998. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002; 6: 748–756.
- 27) Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, et al.: Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 1969–1973.
- 28) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, et al.: Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet.* 1994; 344: 293–298.
- 29) 青木正和, 片山 透, 山岸文雄, 他: PCR法を利用した抗酸菌 DNA 検出キット (アンプリコア™マイコバクテリウム) による臨床検体からの抗酸菌迅速検出. *結核.* 1994; 69: 593–605.
- 30) Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al.: Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 748–752.
- 31) Gamboa F, Cardona PJ, Manterola JM, et al.: Evaluation of a commercial probe assay for detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* directly from respiratory and nonrespiratory clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17: 189–192.
- 32) Marttila HJ, Soini H, Vyshnevskaya E, et al.: Line probe assay in the rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* directly from Clinical specimens. *Scand J Infect Dis.* 1999; 31: 269–273.
- 33) Johansen IS, Lundgren B, Sosnovskaja A, et al.: Direct detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens in low- and high-incidence countries by line probe assay. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4454–4456.

DIRECT DETECTION OF RIFAMPICIN RESISTANT *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN SPUTUM BY LINE PROBE ASSAY (LiPA)

¹Takeshi HIGUCHI, ²Takeshi FUSHIWAKI, ²Nakako TANAKA, ³Seigo MIYAKE,
³Takeshi OGURA, ⁴Hiroko YOSHIDA, ⁵Tetsuya TAKASHIMA, ⁶Masaru NAKAGAWA,
⁶Ryoji MAEKURA, ⁶Toru HIRAGA, and ⁷Toshinori SUETAKE

Abstract [Objectives] To examine the direct detection of rifampicin (RFP) -resistant *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by Line Probe Assay (LiPA).

[Materials and methods] We collected 130 sputa and analyzed both by LiPA and the Amplicor *M. tuberculosis* assay. For culture-positive samples, RFP resistance testing was performed and compared with the results by LiPA.

[Results] Eighty two out of 84 *M. tuberculosis* samples were detected by LiPA and all of 10 *Mycobacteria* other than *M. tuberculosis* (MOTT) samples and 36 negative samples were negative by LiPA. The detection rate is same as Amplicor. For culture-positive samples, LiPA showed mutation pattern for all of 22 RFP-resistant strains and wild type pattern for 19 of 20 RFP-sensitive strains. The one remaining showed mixed pattern of wild type and mutation pattern.

[Conclusion] The use of LiPA for sputum could enable early detection of RFP-resistant tuberculosis and seems to be useful for the control of tuberculosis.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, *rpoB* gene, Rifampicin resistance, Line probe assay, Sputum

¹Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital, ²Department of Clinical Laboratory, and ³Internal Medicine, Osaka Hospital Anti-Tuberculosis Association Osaka Branch, ⁴Department of Clinical Laboratory, and ⁵Internal Medicine, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Diseases, ⁶Department of Internal Medicine, National Hospital Organization Toneyama National Hospital, ⁷Nipro Corporation

Correspondence to: Takeshi Higuchi, Department of Clinical Laboratory, Kyoto University Hospital, 54 Shogoinawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8507 Japan.
(E-mail: higuchit@kuhp.kyoto-u.ac.jp)