

## SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA による *Mycobacterium* 属同定の精度評価

<sup>1</sup>近松 絹代 <sup>1</sup>青野 昭男 <sup>1</sup>山田 博之 <sup>1,2</sup>加藤 朋子  
<sup>1,2</sup>御手洗 聡

**要旨：**〔目的〕PCR法と核酸クロマトグラフィー法を組み合わせた抗酸菌同定キット SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA の精度を評価した。〔方法〕type strain または ATCC reference strain 15 株 (*M. tuberculosis* H37Rv 1 株, 非結核性抗酸菌 14 株), 臨床分離非結核性抗酸菌 48 株, 抗酸菌塗抹陽性喀痰 17 検体を対象とし, SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA と他の同定法を比較した。〔結果〕SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA と参照検査法の一一致率は type/reference strain では 80.0%, 臨床分離株で 91.7%, 臨床検体では 88.2% であった。type strain と reference strain では *M. celatum*, *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* および *M. marinum*, 臨床分離株では *M. intermedium*, *M. marinum* および *M. szulgai* で同定結果が一致しなかった。〔考察〕SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA は操作が簡便であり, 検査時間は約 90 分と短いため一般検査室での抗酸菌同定に有用であると考えられた。しかしながら, 複数の菌種で誤同定が認められた。特に *M. marinum* の同定には注意が必要と考えられた。

**キーワード：**核酸クロマトグラフィー法, 抗酸菌同定

### はじめに

本邦では非結核性抗酸菌 (NTM) 症の正確な全国調査は行われていない。しかし肺 NTM 症は近年増加傾向にある<sup>1)</sup>と考えられる。肺抗酸菌感染症と診断されたうち約 3 割は肺 NTM 症とする報告や<sup>2)</sup>, NTM による皮膚感染症<sup>3)</sup>, 髄膜炎<sup>4)</sup>なども報告されている。しかし, 結核菌同定のための診断試薬は多数あるものの, 複数菌種の NTM を同時に同定できる体外診断試薬はほとんどない。

現在, 結核菌群および 5 菌種以上の非結核性抗酸菌を同定できるキットのうち多くの検査室で使われている DDH マイコバクテリア (極東製薬工業) は基準株 DNA とのゲノムの相同性をみるマイクロプレートハイブリダイゼーション法であり, 特別な器材を必要としないものの, 1 mg 以上の菌量を確保するため固形培地に発育した抗酸菌が必要であり, 検査時間も長く作業が煩雑である。INNO-LiPA MYCOBACTERIA (LiPA: Innogenetics, Belgium) や GenoType Mycobacterium CM/AS (GT-CM/AS:

Hain Lifescience, Germany) は基本的にラインプローブアッセイであり, 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) 領域または 23S rRNA 遺伝子をターゲットとし PCR 法で増幅した DNA をプローブで検出する。また, 近年開発された質量分析装置である MALDI-TOF MS などは, 同定時間が短く検査コストも低いとされている。しかしながら, これらの同定キット・技術はいずれも検体の前処理や検出工程が複雑である。SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA (以下 SPEED-OLIGO: Vircell, Spain) は DNA の ITS 領域を PCR 法で増幅後, 核酸クロマトグラフィー法で迅速・簡易に *Mycobacterium* 属 13 菌種 (当該 13 菌種以外は *Mycobacterium* 属と同定) として検出するキットであり, 特にラインプローブアッセイに伴う長時間のハイブリダイゼーション, 洗浄および発色等の煩雑な工程が含まれないため, 簡便な体外診断試薬である。今回, このキットについて type/reference strain, 臨床分離株および臨床検体を用いて同定精度を評価した。

<sup>1</sup>結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科, <sup>2</sup>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系基礎抗酸菌症学

連絡先: 近松絹代, 結核予防会結核研究所抗酸菌部細菌科, 〒204-8533 東京都清瀬市松山 3-1-24

(E-mail: chikamatsu@jata.or.jp)

(Received 28 Sep. 2013/Accepted 11 Nov. 2013)

## 対象と方法

〔対象菌株および検体〕

type strainあるいはATCC reference strain 15株 (*M. tuberculosis* H37Rv 1株, 非結核性抗酸菌 14株), 日本国内で分離された非結核性抗酸菌 48株 (結核研究所で-80℃で保存していた23株および結核予防会複十字病院で

培養後陽性となった21株) および抗酸菌塗抹陽性 (±, 1+, 2+および3+) 喀痰 17検体 (NALC-NaOH 処理後) とした (Table 1, 2)。

〔同定方法〕

臨床分離株の同定にはDDHマイコバクテリアを使用した。DDHマイコバクテリアで同定できなかった菌株は16S rRNA 遺伝子<sup>5)</sup>および*hsp65* 遺伝子<sup>6)</sup>をダイレクト

**Table 1** List of type strains and reference strains, and the results of identification by SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA

Test samples	SPEED-OLIGO
Type strains or reference strains	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv (ATCC27294)	<i>M. tuberculosis</i> complex
<i>M. abscessus</i> (ATCC23006)	<i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> complex
<i>M. chelonae</i> (ATCC35752)	<i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> complex
<i>M. gordonae</i> (ATCC14470)	<i>M. gordonae</i>
<i>M. kansasii</i> (ATCC12478)	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> complex
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> (ATCC25291)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex
<i>M. intracellulare</i> (ATCC13950)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex
<i>M. scrofulaceum</i> (ATCC19981)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex
<i>M. peregrinum</i> (ATCC14467)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. asiaticum</i> (ATCC25276)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. xenopi</i> (ATCC19250)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. fortuitum</i> Type I (ATCC6841)	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> (ATCC11440)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. celatum</i> (ATCC51130)	<i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> complex
<i>M. marinum</i> (ATCC927)	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> complex

**Table 2** The identification of SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA on clinical isolates and clinical samples

Test samples	SPEED-OLIGO
Clinical isolates (2% Ogawa medium or MGIT)	
<i>M. abscessus</i> (7)	<i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> complex
<i>M. chelonae</i> (2)	<i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> complex
<i>M. gordonae</i> (10)	<i>M. gordonae</i>
<i>M. kansasii</i> (5)	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> complex
<i>M. avium</i> complex (2)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex
<i>M. intracellulare</i> (2)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex
<i>M. scrofulaceum</i> (1)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex
<i>M. fortuitum</i> (7)	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. lentiflavum</i> (2)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. peregrinum</i> (3)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. shimoidi</i> (1)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. xenopi</i> (2)	<i>Mycobacterium</i> genus
<i>M. intermedium</i> (1)	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> complex
<i>M. marinum</i> (2)	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> complex
<i>M. szulgai</i> (1)	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> complex
Clinical samples	
<i>M. tuberculosis</i> complex (4)	<i>M. tuberculosis</i> complex
<i>M. abscessus</i> (1)	<i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> complex
<i>M. avium</i> complex (7)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex
<i>M. avium</i> complex (1)	<i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i> / <i>M. scrofulaceum</i> complex and <i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> complex
<i>M. avium</i> complex (1)	Invalid
<i>M. kansasii</i> (2)	<i>M. kansasii</i> / <i>M. gastri</i> complex
<i>M. triplex</i> (1)	<i>Mycobacterium</i> genus

シーケンスして同定した。16S rRNA 遺伝子はDNA サンプル 5  $\mu$ l に EX Taq HS (タカラバイオ) 0.625U, プライマー 264 (5-TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA-3) および 285 (5-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3) 5 pmol, buffer, dNTPs を加えて全量を 25  $\mu$ l とし, 94°C/30 秒, 60°C/30 秒, 72°C/1 分の加温サイクルを 30 回実施した。hsp 65 遺伝子は DNA サンプル 3  $\mu$ l に Type-it® Microsatellite PCR (QIAGEN) Master Mix 12.5  $\mu$ l, プライマー HSPF3 (5-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3) および HSPR4 (5-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT-3) 5 pmol を加えて全量を 25  $\mu$ l とし, 95°C で 5 分間加温後 95°C/30 秒, 60°C/90 秒, 72°C/30 秒の加温サイクルを 30 回実施し, 最終延長反応を 68°C で 10 分間行った。PCR 産物を MagExtractor™ (TOYOBO) 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。得られた塩基配列は Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), Ribosomal Differentiation of Medical Microorganisms (RIDOM) および Bio Informatic Bacteria Identification (BIBI) を用いて相同性検索を行い菌種の同定を行った。

NALC-NaOH 処理後喀痰検体は TRC Rapid (東ソー) を用いて結核菌群および *M. avium* complex (MAC) を同定し, TRC で同定できなかった検体は 2% 小川培地で培養後 DDH マイコバクテリア, 16S rRNA 遺伝子あるいは hsp 65 遺伝子ダイレクトシーケンスで同定した。

#### [SPEED-OLIGO]

方法は SPEED-OLIGO の取扱説明書に従った。概要として, 核酸抽出, 標的領域の PCR による増幅, 核酸クロマトグラフィーによる検出の 3 工程で検査が構成されている。変性させた増幅産物にストリップの一端を浸漬すると, メンブレン上で特異的オリゴヌクレオチド (金コロイド標識) と PCR 増幅断片が結合する。この複合体はさらに移動し特異的プローブ (*Mycobacterium* 同定用, PCR 増幅コントロール用) とハイブリダイゼーションし, その発色したバンドのパターンにより菌種を同定する。今回テストした SPEED-OLIGO は菌株からの同定を対象としているが, 遺伝子増幅工程を含むため塗抹検査陽性の臨床検体も同定が可能であると考え NALC-NaOH 処理後の喀痰検体からも同定を試みた。DNA 抽出は VIRCELL SAMPLE SOLUTION 150  $\mu$ l に 2% 小川培地に発育した菌 1 ユーゼ, あるいは MGIT 陽性となった培地 1 ml を 12,000G で 15 分遠沈した後の沈渣および NALC-NaOH 処理後喀痰検体 100  $\mu$ l を加え, 95°C で 1 時間加温した後, 12,000G で 5 分遠心し, 上清をサンプルとして使用した。PCR は溶解した VIRCELL MBA PCR MIX 15  $\mu$ l に前述の DNA サンプル 10  $\mu$ l を加え, 92°C で 1 分加温

後 92°C/20 秒, 55°C/30 秒, 72°C/30 秒の加温サイクルを 40 回実施後, 最終延長反応を 72°C で 1 分間行った。検出の前工程として 1.5 ml のマイクロチューブに VIRCELL MBA RUNNING SOLUTION を 40  $\mu$ l 分注し, 55°C のヒートブロックで 2~5 分加温した。また PCR 産物を変性させるために 95°C で 1 分間加温後, 氷上に移した。加温した VIRCELL MBA RUNNING SOLUTION に変性させた PCR 産物 5  $\mu$ l を加え, 直後に検出用の VIRCELL MBA STRIPS を入れ, 55°C で 5 分間加温後ストリップを取り出し判定した (Fig.)。

## 結 果

SPEED-OLIGO による検査開始から同定終了までの時間は DNA 増幅, 検出を含めて約 90 分であった。type strain および reference strain 15 菌種のうち 12 菌種について SPEED-OLIGO の同定は一致した。結果が一致しなかった 3 菌種は *M. celatum* (ATCC51130), *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (ATCC11440), *M. marinum* (ATCC927) であり, SPEED-OLIGO ではそれぞれ *M. chelonae*/*M. abscessus*

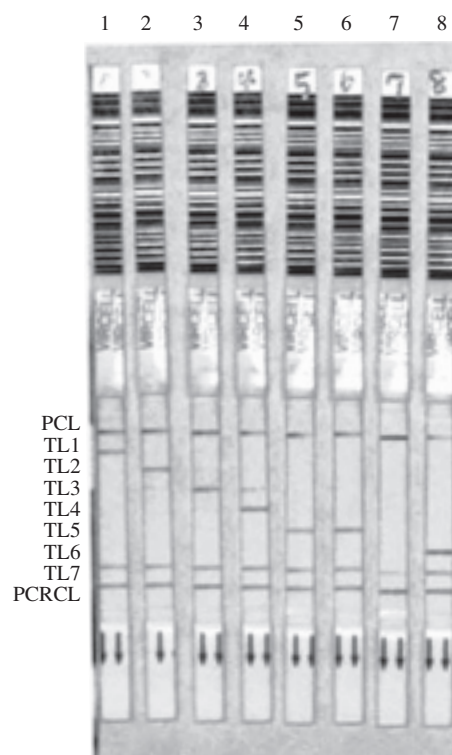


Fig. Hybridization patterns observed in SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA assay.

PCL; product control line, TL1 to TL7; specific identification lines, PCRCL; PCR amplification control line. Typical hybridization patterns are shown in the figure as follows: lane 1=*M. chelonae*/*M. abscessus* complex; lane 2=*M. gordonae*; lane 3=*M. kansasii*/*gastri* complex; lane 4=*M. tuberculosis* complex; lane 5, 6=*M. avium*/*intracellulare*/*scrofulaceum* complex; lane 7=*Mycobacterium* genus; lane 8=*M. fortuitum*

complex, *Mycobacterium* spp., *M.kansasii*/*M.gastri* complex と同定された (Table 1)。臨床分離48株のうち44株で同定結果がSPEED-OLIGOの結果と一致した。しかし, *M.intermedium* 1株, *M.marinum* 2株および*M.szulgai* 1株がSPEED-OLIGOでは*M.kansasii*/*M.gastri* complex と同定された。*M.abscessus*, *M.fortuitum*, *M.gordonae*, *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.peregrinum* および *M.xenopi* は2% 小川培地とMGIT両培地に発育した菌を用いたが, SPEED-OLIGOはこれらの菌種について正しく同定し, 培地による差は認められなかった (Table 2)。

喀痰検体からDNA抽出をしてSPEED-OLIGOによる同定を行った17検体のうち15検体で同定結果が参照法と一致した。他の2検体からはMACが同定されたが, SPPEED-OLIGOでは1検体で*M.avium*/*M.intracellulare*/*M.scrofulaceum* complex と *M.chelonae*/*M.abscessus* complex の両プローブが陽性となった。他の1株はSPEED-OLIGOによるDNAの増幅が認められなかったが同じサンプルによる16S rRNA 遺伝子の増幅もできなかった (Table 2)。結果として, 今回使用した株あるいは検体でのSPEED-OLIGOでの同定率は, type strain および reference strain で80.0% (12/15), 臨床分離株で91.7% (44/48), 臨床検体では88.2% (15/17) であった。

## 考 察

SPEED-OLIGOの精度についてtype strain, reference strain, 臨床分離培養株および臨床検体(喀痰)を用いて検討を行った。Hofmann-Thielら<sup>7)</sup>は臨床分離株を使ったSPEED-OLIGOの同定精度は89.7%であり, 誤同定は*M.marinum* と *M.peregrinum*に見られたと報告している。臨床分離株を用いたわれわれの検討でも同定精度は同程度であった。われわれは*M.peregrinum*を正しく同定したが, *M.marinum*は上記の報告同様*M.kansasii*/*M.gastri* complex と誤って同定された。*M.marinum*と*M.kansasii*は同じRunyon分類I群であることから, 一般的な検査室で簡便に行える光発色試験では誤同定を発見することができないため, 注意が必要であると考えられた。Tortoliら<sup>8)</sup>は136菌種についてラインプローブアッセイであるLiPAとGT-CM/ASの同定精度を調査し, それぞれ20および28菌種が誤同定であったと報告している。われわれは今回本邦で比較的多く分離される19菌種を検討したが, 近年希少菌種の分離報告が増加してきている<sup>9)~11)</sup>ことから他の菌種についても検討の必要があると考えられた。

SPEED-OLIGOは*M.celatum* (reference strain) を *M.chelonae*/*M.abscessus* complex に, *M.intermedium* (臨床分離株), *M.szulgai* (臨床分離株) および *M.marinum* (type strain および臨床分離株) を *M.kansasii*/*M.gastri* complex として誤った菌種に同定した。GeneBankに登録されて

いるこれらの菌種のITS領域の塩基配列を比較すると, *M.abscessus* と *M.celatum* では2カ所, *M.kansasii* と *M.marinum*, *M.szulgai* および *M.intermedium* では3カ所で18bpから65bpの同一塩基配列が認められた。SPEED-OLIGOのプローブ配列は公開されていないため確認することはできなかったが, 検出プローブの塩基配列デザインと同一の塩基配列をもつ菌種による誤同定の可能性が考えられた。検出プローブの設計変更または他の遺伝子の追加などで誤同定が避けられる可能性が考えられた。実際にSPEED-OLIGO version 2が開発されており, 精度の改善が期待されている。

SPEED-OLIGOの用法には示されていないが, PCRによる増幅工程を含んでいることから, 今回NALC-NAOH処理後の抗酸菌塗抹陽性喀痰検体についてもSPEED-OLIGOを用いた同定検査を試みた。結果として, このキットでも少なくとも塗抹陽性検体であればPCR法でターゲット遺伝子の増幅が十分に可能であり, 検出・同定が実施可能であることが確認できた。17検体中1検体はSPEED-OLIGOで遺伝子増幅ができず同定は不可能であったが, 同時に実施した16S rRNA 遺伝子の増幅もできなかったことから, この検体中に含まれていたPCR増幅阻害物質の影響があるものと考えられた。他の1検体はSPEED-OLIGOの同定用プローブ2つが陽性となったが, *hsp65* 遺伝子のダイレクトシーケンスによる同定を行った結果シーケンス波形が単一でなかったことから検体中に抗酸菌が複数菌種存在した可能性が考えられた。

SPEED-OLIGOと他のラインプローブアッセイのDNA増幅後の検出時間を比較するとSPEED-OLIGOは約10分であったのに対して, LiPAは約3時間, GT-CM/ASは約2時間で結果が得られることが報告されており<sup>12)13)</sup>, SPEED-OLIGOの検査時間が一番短かった。これは, 主としてSPEED-OLIGOが金コロイド標識した増幅遺伝子産物がストリップ上を移動する約5分間でストリップ上のプローブとハイブリダイゼーションを行う核酸クロマトグラフィー法であるのに対し, 通常のリニアプローブアッセイはビオチン標識した増幅遺伝子産物とストリップ上のプローブをハイブリダイゼーションさせた後発色・検出するため, 長時間を要することによる。これらのラインプローブアッセイにはハイブリダイゼーション工程を自動化しているキット<sup>13)</sup>もあるものの, 検出用ストリップの洗浄やインキュベーション等の工程が省略されていることは, 検査時間の短縮やデバイス購入費用の削減に有用であると考えられた。

## ま と め

SPEED-OLIGOは汎用型のサーマルサイクラーとヒー

トブロックがあれば複数菌種の抗酸菌を同定することが可能で、検出時間はDNA抽出の時間も含めて約2時間半であり一般の細菌検査室において有用性が考えられた。しかし、SPEED-OLIGOの非結核性抗酸菌同定の精度は平均86.6%で、特に*M. marinum*の同定には注意が必要である。同定用プローブの改良がさらに進めば臨床に有用であると考えられる。

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) 森本耕三：非結核性抗酸菌症の日本と世界における疫学の現状. 第87回総会シンポジウム「増加するMAC症の制御を目指して」. 結核. 2013 ; 88 : 356-359.
- 2) 佐藤滋樹：肺非結核性抗酸菌症の最近の話題. 現代医学. 2008 ; 56 : 317-324.
- 3) 真鍋泰明, 生駒憲広, 加藤正幸, 他： *Mycobacterium chelonae*による皮膚感染症の2例. 皮膚の科学. 2012 ; 11 : 1347-1813.
- 4) 原口春毅, 上田 研, 原 信博, 他：意識障害を来たし、髄液より*Mycobacterium intracellulare*が同定された髄膜炎の1例. 内科学会雑誌. 2011 ; 100 : 176-178.
- 5) 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.
- 6) Kim H, Kim SH, Shim TS, et al.: Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). Int J Syst Evol Microbiol. 2005 ; 55 : 1649-1656.
- 7) Hofmann-Thiel S, Turaev L, Alnour T, et al.: Multi-centre evaluation of the speed-oligo Mycobacteria assay for differentiation of *Mycobacterium* spp. in clinical isolates. BMC Infect Dis. 2011 ; 11 : 353.
- 8) 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.
- 9) 寺田祐子, 竹下 啓, 馬場里英, 他： *Mycobacterium kyorinense* (*M. kyorinense*)による呼吸器感染症の1例. 内科学会雑誌. 2012 ; 101 : 2301-2303.
- 10) 竹村佳純, 上田幹雄, 中西雅樹, 他：浸潤型胸腺腫・重症筋無力症治療中に発症した*Mycobacterium massiliense*による播種性非結核性抗酸菌症の1例. 呼吸. 2012 ; 11 : 1070-1076.
- 11) Nakanaga K, Hoshino Y, Yotsu RR, et al.: Nineteen cases of Buruli ulcer diagnosed in Japan from 1980 to 2010. J Clin Microbiol. 2011 ; 49 : 3829-3836.
- 12) 吉田志緒美, 鈴木克洋, 露口一成, 他：遺伝子を用いた抗酸菌鑑別同定試薬 INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2の有用性の検討. 結核. 2009 ; 84 : 15-21.
- 13) Richter E, Rüsck-Gerdes S, Hillemann D: Evaluation of the GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 1769-1775.

## Original Article

EVALUATION OF THE USE OF SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA FOR IDENTIFICATION OF *MYCOBACTERIUM* SPECIES

<sup>1</sup>Kinuyo CHIKAMATSU, <sup>1</sup>Akio AONO, <sup>1</sup>Hiroyuki YAMADA, <sup>1,2</sup>Tomoko KATO,  
and <sup>1,2</sup>Satoshi MITARAI

**Abstract** [Objective] To evaluate the use of SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA (Vircell, Spain) in identifying *Mycobacterium* species.

[Method] We examined 15 type or reference strains of mycobacteria (*M.tuberculosis* H37Rv and 14 non-tuberculosis mycobacteria), 48 clinical isolates, and 17 AFB-positive sputa by using SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA, and compared the results with those obtained using other referral methods available for species identification.

[Result] SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA yielded favorable results in 80.0%, 91.7%, and 88.2% of the cases of the tested type/reference strains, clinical isolates, and clinical samples, respectively. However, the type/reference strains *M.celatum*, *M.fortuitum* subsp. *fortuitum*, and *M.marinum*, and the clinical isolates *M.intermedium*, *M.marinum*, and *M.szulgai* were misidentified when SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA was used.

[Discussion] SPEED-OLIGO® MYCOBACTERIA can fa-

cilitate the rapid identification of *Mycobacterium* species mainly because of its short turn-around time and simple procedures. However, the accuracy of this method remains unsatisfactory.

**Key words:** Dipstick method, *Mycobacterium* identification

<sup>1</sup>Bacteriology Division, Department of Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association, <sup>2</sup>Department of Basic Mycobacteriosis, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

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)