

遺伝子解析を用いた結核感染の長期経過後の 発病実態の把握とその有用性

オオハタ リツコ
大島 律子*

目的 感染から長期経過後に発病した結核患者の感染実態把握と感染源究明の一手段として、結核菌の遺伝子解析の有用性を検討する。

方法 2004年度に岡山県内で発生した、慢性排菌患者が関与した2つの結核感染事例を対象とした。患者から分離された結核菌のDNAを抽出し、IS6110をプローブとしたRFLP (restriction fragment length polymorphism 制限酵素断片長多型)解析(以下IS6110-RFLPと略す)および、PGRS (polymorphic GC-rich repetitive sequence)をプローブとしたRFLP解析(以下PGRS-RFLPと略す)を行って菌株間の相同性を調べた。疫学調査で感染源の推測が難しかった事例は、1999年12月から県内の結核新登録患者分離株のRFLPパターンを集積しているRFLPデータベースと照合し、パターン一致株の有無を調べた。また、結核菌のRifampicin (RFP)耐性に関与する*rpoB*遺伝子と、Isoniazid (INH)耐性に関与する*katG*遺伝子の変異を、リアルタイムPCRによる融解曲線分析で検出した。薬剤感受性は、微量液体希釈法および小川培地による比率法で調べた。

結果 事例1では、疫学調査により同一患者から2人が約20年を経て感染したことが疑われた。分離株の薬剤感受性パターンと薬剤耐性に関与する遺伝子の変異状況が異なっていたが、IS6110-RFLPパターンがほぼ一致し、かつ、PGRS-RFLPパターンも一致したため、同一株の可能性が高いと考えられた。事例2では、医療従事者が初回多剤耐性結核を発病したが、感染源が不明であった。そこで、分離株のIS6110-RFLPパターンをRFLPデータベースと照合した結果、4年8か月前に多剤耐性結核で死亡した慢性排菌患者からの分離株と一致した。また、薬剤感受性パターンと薬剤耐性に関与する遺伝子の変異状況も一致した。両者は、同一病院の職員と患者であったため、院内感染と考えられた。

結論 感染から長期経過後に発病した結核患者の感染実態の把握と感染源究明において、結核菌の遺伝子解析は、有用な情報を提供し、接触者健診を科学的に支援した。また、結核菌の遺伝子型データベースを構築し、疫学情報に基づいて的確に解析することで、接触者健診だけでは把握できない感染源の検出に繋がることが示唆された。

Key words : 結核, 遺伝子解析, 慢性排菌患者, 薬剤耐性, 遺伝子型データベース

Ⅰ 緒 言

結核は、感染後2年以内に発病することが多いが、数年から数十年を経過することもある。発病までの期間が長い場合、患者は感染時の記憶が不明瞭なことが多く、感染源究明が非常に難しい。さらに、慢性排菌患者が感染源として疑われた場合は、長期間の排菌のために感染した時期の推定が難しく、また、薬剤耐性の割合が高いため(多剤耐性

61.9%)¹⁾、感染者が発病までに長期間を経過している間に感染源の菌の薬剤感受性が変化し、薬剤感受性パターンが感染者の菌と一致しなくなることがあり、同一菌株かどうかの判断が一層困難となる。

今回筆者は、感染から発病までの期間が数年から20年以上におよび、感染源として多剤耐性の慢性排菌患者が疑われた2つの事例に遭遇した。これらの事例の感染実態を把握し感染源を究明するため、従来の疫学調査に加えて、RFLP解析²⁾や薬剤感受性遺伝子変異の検出などの遺伝子解析を用いたところ、有用な知見が得られたので報告する。

* 岡山県環境保健センター
連絡先：〒701-0298 岡山市内尾739-1
岡山県環境保健センター 大島律子

II 研究方法

1. 調査した事例

感染源として慢性排菌患者が疑われた2つの事例(表1)について検討した。事例1では、患者Cが2004年7月に右腎・尿管・膀胱結核を発病し、保健所の疫学調査から約30年前に結核登録された患者Aと親子であることが判った。Aは1973年に結核登録後、治癒しないまま2001年11月に受診した医療機関から再発として届け出られていた。その時の接触者健診で同僚Bの結核発病が判明し、薬剤感受性パターンおよびRFLPパターンの一致によって、Bの感染源はAと考えられた。一方、再発時にAから分離された結核菌株とCからの分離株は、医療機関が実施した薬剤感受性試験で感受性パターンが異なり、また、両者はCが幼少時に別居して以来接触が無かったため、Cの感染源はAか、或いは他に存在するのかわかるため両者分離株の遺伝子解析を行った。事例2では、結核病棟を持つX病院の職員定期検診で、結核と診断された看護師Eからの分離株が初回多剤耐性を示し、院内感染が疑われた。感染源究明のため、患者E分離株のRFLPパターンをX病院患者由来株と比較し、一致株の有無を調べた。

2. RFLP解析

結核菌遺伝子の挿入配列IS6110をプローブとするIS6110-RFLP解析で菌株の相同性を調べ、更

に、結核菌ゲノム上の繰り返し配列PGRSをプローブとするPGRS-RFLP解析³⁾でも確認した。

1) IS6110-RFLP解析

定法^{2,4,5)}に従った。結核菌からのDNA抽出は、ISOPLANT(ニッポンジーン)を用い、小川培地上に培養された菌体から、マニュアルに従って抽出した。プローブは、IS6110由来245bpのPCR産物をRandom primer DNA labeling kit(Enzo Diagnostics)によりビオチン標識した。RFLPパターンの検出は、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ(Amersham Pharmacia Biotech)および発光基質ルミホス530(Wako)を用い、化学発光によりX線フィルム上で行った。検出されたパターンは、データベースに登録し、パターン一致株の有無を解析ソフトFinger Printing Plus(Bio Rad)を用いて調べた。

このデータベースは、平成11年12月に結核菌RFLP解析事業が開始されて以降、県内の新登録患者から分離された結核菌株を対象とし、IS6110-RFLPパターンと疫学情報を融合させて整備している⁶⁾。平成15年度までは、県内の全新登録患者から分離された結核菌を対象としたが、平成16年度以降は、調査の効率化のため、過去の再燃ではなく最近の感染により発病した患者や集団感染に繋がる恐れがある患者からの分離株などに対象を絞った⁷⁾。今回の調査が行われた平成17年3月の時点では、管轄地域内の推定分離株の約70%が登録されていた。その内訳は、平成11年12月~17年3月までの推定分離

表1 感染事例の概要

事例	関連性	患者	登録時年齢	発病	登録検体採取	診断名病型(塗抹)	IS6110-RFLP	概要	薬剤耐性	薬剤耐性関係遺伝子
1	同僚(A, B)とAの子(C)	A	再発時57	2001/11/7 登録中再発	1973/1/22 2001/11/12	肺結核bIII2(+)	一致	患者Aの再発に伴う接触者検診で患者Bの発病が判明した。両者分離株のRFLPパターンが一致し、職場内感染と考えられた。一方、患者Cが尿路結核で発病し、疫学調査によりAと親子であることが判ったが、A・CはCが幼い頃別居し、Aの再発後両者は接触がなく、両者分離株の薬剤感受性も異なっていた。A・C分離株のRFLPパターンは、IS6110-RFLPではバンド1本の位置が僅かに異なったが、PGRS-RFLPでは一致した。従って、Cの感染源は幼少時に接触したAと考えられた。また、Aの結核菌は、Cへ感染後、遺伝子変異と薬剤耐性を獲得してBに感染したと推測された。	MDR: SM EB KM INH RFP	rpoB変異
		B	60	自覚症状無	2002/1/16 2002/3/12	肺結核rIII1(-)				
		C	30	2004/5/17	2004/7/12 2004/7/7	右腎・尿管・膀胱結核(-)	バンド1本の相違	感受性	H37Rv型	
2	同じ病院の患者(D)と職員(E)	D	52	不明 1999/12/15 死亡	1976/6/30 1999/12/7	肺結核(慢性排菌状態)	一致	X病院看護師Eが、職場の定期検診で結核と診断され、多剤耐性菌が分離された。Eには結核病棟勤務歴があったため、E分離株のRFLPパターンを、データベース中のX病院患者由来株と比較したところ、多剤耐性結核の慢性排菌患者Dからの分離株と一致し、薬剤感受性パターンも一致した。Dは1999年12月に結核で死亡しているが、入院期間がEの結核病棟勤務期間と重なる時期があり、Eの感染源はDと考えられた。	MDR: SM KM INH RFP LVFX SPFX CPFV EVM PAS	RFP+ katG+
		E	48	自覚症状無	2004/8/20 2004/10/22	肺結核rIII1(-)				

株数（菌陽性新登録患者数）約1200に対し、実際にデータベースに登録されたのはその約70%にあたる833株であり、それは、一部医療機関の理解が得られず菌株が提供されないなどの理由からであった。

事例1は、保健所の疫学調査から、あらかじめ患者間の関連性が疑われていたため、患者分離株間でRFLPパターンの相同性を調べた。さらに、他の患者との隠れたリンクの有無を確認するため、データベース内の全ての患者分離株との比較も行った。事例2では、患者Eは院内感染が疑われていたので、X病院から提供された感染源の可能性のある7人の患者由来株およびデータベースから抽出したX病院患者由来421株についてRFLPパターンを比較し、一致株の有無を調べた。また、事例1と同様に、データベース内の他の患者分離株との比較も行った。

2) PGRS-RFLP 解析

制限酵素 *Sma* I を用い、IS6110-RFLP 解析と同様に実施した。

3. 薬剤耐性に関与する遺伝子変異の検出

結核菌の Rifampicin (RFP) 耐性に関与する *rpoB* 遺伝子と、Isoniazid (INH) 耐性に関与する *katG* 遺伝子の変異を、リアルタイムPCR装置 LightCycler (Roche) を用い、ハイブリダイゼーションプローブ法による融解曲線分析で検出した⁸⁾。

RFP 耐性菌では、95%以上がRNA合成酵素のβ-サブユニットをコードしている *rpoB* 遺伝子のコア領域内に変異がみられることが報告されている⁹⁾。また、INHは、結核菌の産生するカタラーゼ・ペルオキシダーゼ活性によって抗菌性を示すため、高度INH耐性菌では、この酵素を支配する遺伝子 *katG* が欠損あるいは変異していることが多い⁹⁾。そこで、*rpoB* 遺伝子のコア領域と *katG* 遺伝子をPCRで増幅すると同時に、それらのPCR産物の配列に特異的なプローブRPO1およびRPO2とプローブKATGでハイブリダイゼーションを行い、プローブが標的DNAから解離する融解温度 (T_m) を結核菌標準株 (H37Rv) と比較した。プローブ内にミスマッチが存在すると、完全にマッチした配列よりも解離しやすいため、 T_m 値は低くなる。プローブRPO1とRPO2はH37Rvと相補的な配列であり、*rpoB* 遺伝子に変異があれば T_m 値はH37Rvよりも低くなる。プローブKATGは、*katG* 遺伝子の最も一般的な変異部位である codon 315 のAGCをACAに置換してあるので、その部位に変異があれば T_m 値はH37Rvよりも高くなる。これらの T_m 値の差異を融解曲線として分析した。

4. 薬剤感受性試験

2事例の患者分離株5株について、RFP, INH, Streptomycin (SM), Ethambutol (EB), Kanamycin (KM), Levofloxacin (LVFX), Sparfloxacin (SPFX) および Ciprofloxacin (CPFX) の8薬剤に対する感受性を、プロスミックMTB-I (極東) を用いた微量液体希釈法で調べた。感受性対照としては、結核菌標準株 H37Rv を用い、患者分離株と同様に調べた。予め多剤耐性結核菌と報告されていた事例2の患者E分離株と、Eの感染源と考えられた患者D分離株の2株については、(財)結核予防会結核研究所抗酸菌レファレンスセンターに検査依頼し、RFP, INH, SM, EB, KM, Enviomycin (EVM), *p*-Aminosalicylate (PAS), Cycloserine (CS), および Ethionamide (TH) の9薬剤に対する感受性について、小川培地による比率法で検査した。

III 研究結果

1. RFLP 解析結果

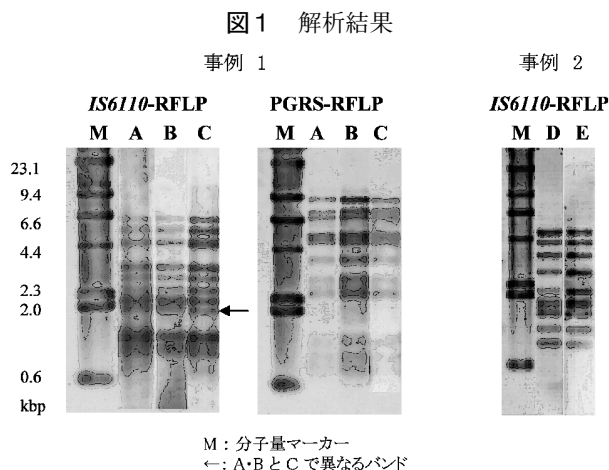
事例1では、IS6110-RFLP解析で患者A-B分離株間は一一致したが、C分離株は2.0 kbp 付近のバンドの位置がA・Bよりも僅かに異なった。PGRS-RFLP解析ではA, BおよびC分離株のパターンは全て一致した (図1)。

事例2では、X病院が提出した7株とは一致せず、データベース内のX病院患者Dの分離株と一致した (図1)。Dは多剤耐性の慢性排菌患者で1999年12月に死亡している。

事例1・2とも、データベース内の他の株との一致はみられなかった。

2. 薬剤感受性に関与する遺伝子変異の検出

事例1では、患者A・B分離株でプローブRPO2部位で *rpoB* 遺伝子に変異がみられ、さらに、B分



分離株では *katG* 遺伝子の欠損がみられたが、C 分離株は標準株 H37Rv と同様のパターンであり、遺伝子変異はみられなかった (図2)。

事例2では、患者 D・E の分離株の両方で RPO2 と *katG* に変異が検出された (図2)。

3. 薬剤感受性試験

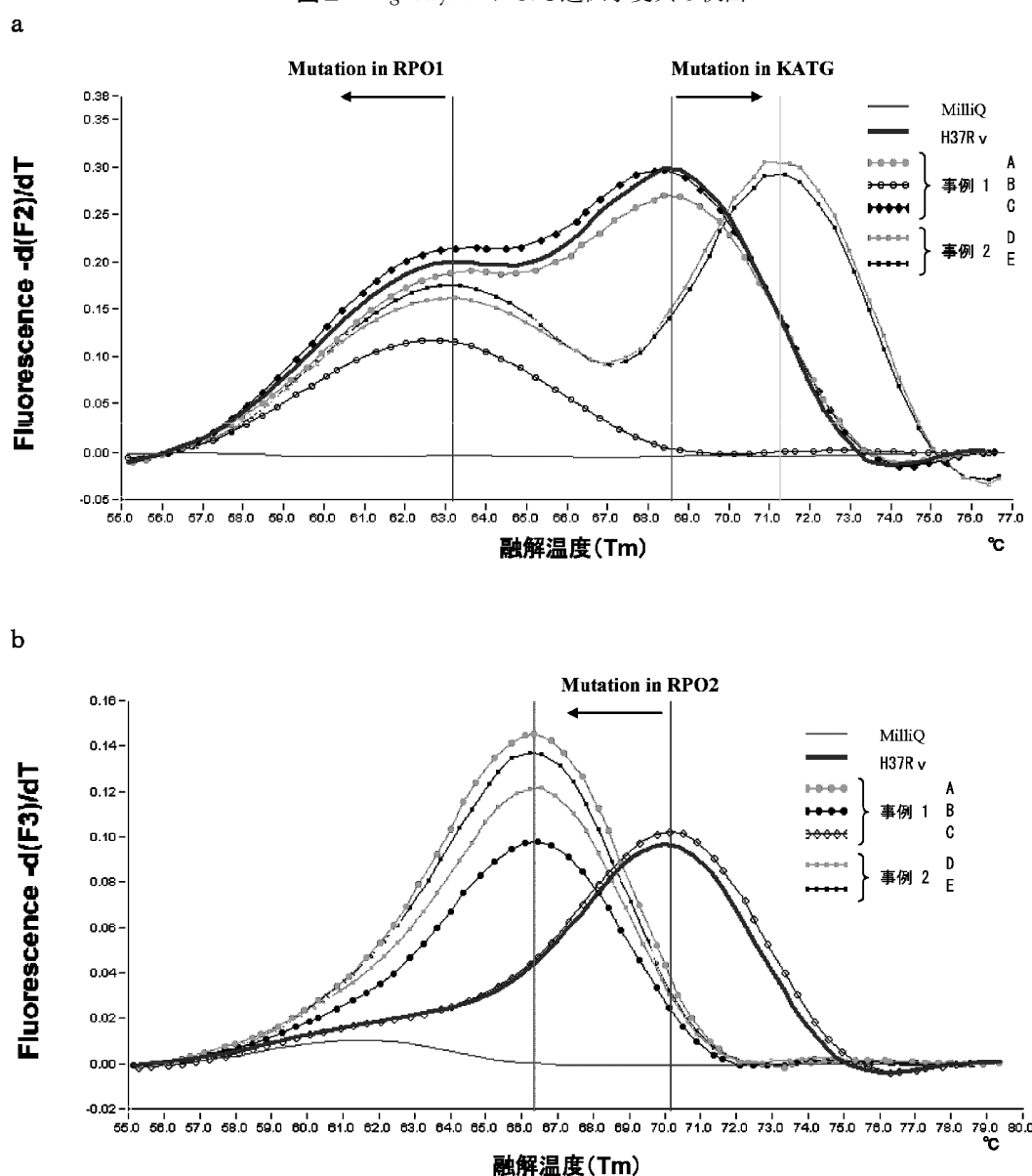
事例1では、プロスミック MTB- I を用いた検査の結果、患者 A・B 分離株は SM, EB, KM, INH および RFP に耐性を示したが、患者 C 分離株は 8 剤全てに感受性であった (表2)。

事例2では、プロスミック MTB- I を用いた検査

の結果、患者 D・E 分離株とも SM, INH, RFP, LVFX, SPFX および CPFY に耐性で、EB と KM は判定保留となった (表2)。小川培地による比率法の結果では、患者 D・E 分離株とも SM, KM, INH, RFP, EVM および PAS に耐性で、EB, CS および TH には感受性であった (表3)。

結核菌標準株 H37Rv のプロスミック MTB- I を用いた検査の結果は、8 剤全てに感受性であった (表2)。

図2 LightCycler による遺伝子変異の検出



プローブ RPO1 と RPO2 は、*rpoB* 遺伝子に変異があると Tm 値が H37Rv よりも低くなるので、事例1の A・B と事例2の D・E は、プローブ RPO2 の部位において *rpoB* 遺伝子に変異があることを示している (b)。プローブ KATG は、*katG* 遺伝子の codon 315 に変異があれば Tm 値は H37Rv よりも高くなるので、事例2の D・E はその部位に変異があることを示している。また、事例1の B は、*katG* 遺伝子の増幅が見られないため、*katG* 遺伝子の欠損を示している (a)。

表2 プロスミック MTB-I による薬剤感受性試験結果

	MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$)					
	A	B	C	D	E	H37Rv
Streptomycin (SM)	64	> 128	1	64	128	1
Ethanbutol (EB)	16	8	2	<u>4</u>	<u>4</u>	1
Kanamycin (KM)	> 128	> 128	1	<u>8</u>	<u>16</u>	1
Isoniazid (INH)	32	> 32	0.125	8	8	0.125
Rifampicin (RFP)	> 32	> 32	0.03	> 32	> 32	0.03
Levofloxacin (LVFX)	0.5	0.5	0.5	4	4	0.5
Sparfloxacin (SPFX)	0.25	0.125	0.25	2	2	0.25
Ciprofloxacin (CPFX)	0.5	0.5	0.5	4	4	0.5

■ : 耐性

下線 : 判定保留

表3 小川培地による比率法での薬剤感受性試験結果

	薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	患者 D	患者 E
		分離株	分離株
		判定	判定
Isoniazid (INH)	0.2	耐性	耐性
	1	耐性	耐性
Rifampicin (RFP)	40	耐性	耐性
Ethanbutol (EB)	2.5	感受性	感受性
Streptomycin (SM)	10	耐性	耐性
Kanamycin (KM)	20	耐性	耐性
Enviomycin (EVM)	20	耐性	耐性
p-Aminosalicylate (PAS)	0.5	耐性	耐性
Cycloserine (CS)	30	感受性	感受性
Ethionamide (TH)	20	感受性	感受性

IV 考 察

事例1では、患者A-B間は、疫学的状況とRFLPパターンおよび薬剤感受性パターンの一致により、AからBへの感染が支持された。A・B分離株が共にINH耐性を示したにもかかわらず、B分離株のみで*katG*遺伝子が欠損していた点については、様々な要因が考えられた。INH耐性に関与する遺伝子は、*katG*遺伝子以外にも知られており¹⁰⁾、また、東京都内の調査の結果、INH耐性67株中21株で、*katG*遺伝子に欠失、挿入あるいはアミノ酸変異がみられ、*katG*遺伝子などに変異の無い株も6株存在したと報告されていることから¹¹⁾、A分離株のINH耐性は、*katG*遺伝子のcodon 315以外の部位の変異、あるいは、*katG*遺伝子以外の要因により生じ、B分離株の耐性はそれに*katG*遺伝子欠損が加わったことによると推測された。B分

離株のINH耐性の最小発育阻止濃度 (MIC (minimal inhibitory concentration) 値) がA分離株よりも高かったのは、これを反映した結果かもしれない (表2)。一方、患者A-C間については、分離株のRFLPパターンがほぼ一致したことから、AからCへの感染の可能性が高く支持され、また、尿路結核¹²⁾で発病したCの臨床的病像は、初感染からかなりの年数を経て腎臓結核などで発病する二次結核症¹³⁾の病像と矛盾しなかった。したがって、Cは二十年以上前にAと接触した時に感染したと考えられた。薬剤感受性パターンが、A・B分離株が多剤耐性を示したのに対し、C分離株は全てに感受性であったことから、Aの結核菌は、Cへの感染が起こった二十年以上前は薬剤感受性であったことが推測された。

事例2では、RFLP解析の結果、X病院側が感染源と考えた7人の患者はいずれも感染源ではなく、データベース内のX病院患者Dが感染源として疑われた。D・E分離株のRFLPパターンは、この地域の流行株のパターン⁶⁾とは異なり、X病院以外の他株とも一致しなかったため、偶然の一致の可能性は低く、また、薬剤感受性試験および薬剤耐性遺伝子変異の検出結果からも、Dからの感染が強く支持された。したがって、EはDが結核死亡した1999年12月までにDから感染し、Dの死後4年8か月を経て、初回多剤耐性結核として発病したと推測された。患者DがX病院側の調査対象患者7人から外れていたのは、Eの感染から発病までの期間が長かったことと、DがEの発病の4年以上も前に死亡していたことが大きな要因と思われた。このことから、感染源究明を目的とした接触者健診対象者の範囲決定では、とくにEのように、あらゆるタイプの結核菌に暴露される可能性が高い環境下で

は、感染後2年以内が多いとされる発病までの期間を通常より長く考慮する必要があると思われた。

今回調査した2事例は、いずれも従来の接触者健診を主とする疫学調査だけでは感染源の特定が困難であり、遺伝子解析結果が科学的根拠として役立った。地域レベルでの結核対策において、結核菌の遺伝子解析は、①ある集団における結核感染の疫学的状況を把握する、②通常の接触者健診では把握できなかった感染源を検出する、③保健師が行う接触者疫学調査活動を支援するという点で有用とされている¹⁴⁾。事例1は③に該当し、薬剤感受性の違いから接触者健診だけでは判断しかねていた患者Cの感染源をAと特定できた。一方、事例2は①と②に該当し、流行株のRFLPパターン分布という地域の疫学状況を踏まえ、データベース内のパターンと照合し、接触者健診の対象外であった患者Dを感染源として見つけ出すことができた。このような隠れたリンクを発見するためには、地域内分離菌株のRFLPパターンなど遺伝子型のデータベース化は必要不可欠であり、その解析によって、事例2のような散発事例だけでなく、潜在的な集団感染を検出することも可能となる。実際に、地域内の全結核分離株の遺伝子型をデータベース化し、結核感染伝播を調査する地域分子疫学サーベイランス事業が欧米諸国で実施されており^{15~21)}、分離株の遺伝子型が一致した患者間の疫学的関連を調査することによって集団感染が判明した事例が報告されている^{22~24)}。これらの事例はいずれも3~5年間のデータ解析から集団感染が発見されており、また、今回の事例1・2も同期間のデータ解析が感染源究明に役立った。従って、遺伝子型データベースを結核対策に有用に活用するためには、長期間のデータ蓄積と疫学情報に基づく的確な解析が重要と思われた。

V 結 語

感染から長期経過後に発病した結核患者の感染実態の把握と感染源究明において、結核菌の遺伝子解析は、菌の遺伝子型や薬剤感受性遺伝子変異の状況など有用な情報を提供し、接触者健診を科学的に支援した。また、結核菌の遺伝子型データベースを構築し、蓄積されたデータを疫学情報に基づいて的確に解析することで、接触者健診だけでは把握できない感染源の検出に繋がることが示唆された。

本稿をまとめるにあたり、ご指導・ご助言をいただきました当センターの小倉肇所長および中嶋洋細菌科長に厚く感謝いたします。また、菌株の収集および疫学情報の収集にご協力いただきました、岡山県保健福祉部健康

対策課感染症対策係、県内保健所、県内医療機関および検査機関の担当者の皆様に感謝いたします。

(受付 2007.10. 1)
採用 2008. 4.22)

文 献

- 厚生労働省, 平成12年度結核緊急実態調査報告書, 2003.
- 高橋光良. 結核菌挿入断片 IS6110をプローブとした結核の分子疫学. 資料と展望 1996; 17: 43-53.
- Yang Z, Chaves F, Barnes PF, et al. Evaluation of method for secondary DNA typing of *Mycobacterium tuberculosis* with pTBN12 in epidemiologic study of tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 3044-3048.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendation for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31: 406-409.
- 高橋光良, 阿部千代治. IS タイピング法: IS6110をプローブとしたRFLP分析による結核菌の亜分類. 日本細菌学雑誌 1994; 49: 853-857.
- 大島律子, 中嶋 洋. 結核対策における地域ベースの結核菌RFLP解析の意義. 日本公衛誌 2005; 52: 736-745.
- 大島律子, 狩屋英明, 中嶋 洋. 結核疫学調査における結核菌DNAのRFLPデータベースの活用, 岡山県環境保健センター年報 2005; 29号: 81-84.
- Garcia de Viedna D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, et al. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol 2002; 40: 988-995.
- Ohno H, Koga H, Kohno S, et al. Relationship between rifampin MICs for and *rpoB* mutations of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Japan. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1053-1056.
- Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 496-514.
- 向川 純, 遠藤美代子, 柳川義勢, 他. 薬剤耐性結核菌株の薬剤耐性パターンと遺伝子変異の解析. 感染症誌 2005; 79: 388-396.
- 佐藤敦夫. 高齢者結核. 泉孝 英, 網谷良一, 編. 結核 第3版. 東京: 医学書院, 1999; 244-246.
- 佐藤敦夫. 高齢者結核. 泉孝 英, 網谷良一, 編. 結核 第3版. 東京: 医学書院, 1999; 43-52.
- 沖縄県結核サーベイランス検討委員会. 沖縄県の結核患者管理における結核菌遺伝子型同定の有用性. 日本公衆衛生雑誌 2003; 50: 339-348.
- van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PEW, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: A nationwide study from 1993 through 1997. J Infect Dis 1999; 180: 726-36.
- Lambregts-van Weezenbeek CSB, Sebek MM, van Gerven PJ, et al. Tuberculosis contact investigation and

- DNA fingerprint surveillance in the Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7: 463-470.
- 17) Castro KG and Jaffe HW. Rationale and methods for the National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1188-1191.
- 18) Crawford JT, Braden CR, Schable BA, et al. National Tuberculosis Genotyping and Surveillance Network: Design and Methods. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1192-1196.
- 19) Pfyffer GE, Strässle A, Rose N, et al. Transmission of tuberculosis in the metropolitan area of Zurich: a 3 year survey based on DNA fingerprinting. *Eur Respir J* 1998; 11: 804-808.
- 20) Bauer J, Kok-Jensen A, Faurschou P, et al. A prospective evaluation of the clinical value of nation-wide DNA fingerprinting of tuberculosis isolates in Denmark. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 295-299.
- 21) Dahle UR, Sandven PER, Heldal E, et al. Molecular Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Norway. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1802-1807.
- 22) Yaganehdoost A, Graviss EA, Ross MW, et al. Complex transmission dynamics of clonally related virulent *Mycobacterium tuberculosis* associated with barhopping by predominantly Human Immunodeficiency Virus-Positive Gay Men. *J Infect Dis* 1999; 180: 1245-1251.
- 23) Lathan M, Mukasa LN, Hooper N, et al. Cross-jurisdictional transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in Maryland and Washington, D.C., 1996-2000, linked to the homeless. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1249-1251.
- 24) McElroy PD, Sterling TR, Driver CR, et al. Use of DNA Fingerprinting to investigate a multiyear, multistate tuberculosis outbreak. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 1252-1256.
-

Utility of gene analysis for evaluation of the current status of tuberculosis developing long after primary infection

Ritsuko OHATA*

Key words : Tuberculosis, Gene analysis, Chronic carrier, Drug resistance, Genotype database

Purpose The purpose of this study was to examine the utility of gene analysis of *Mycobacterium tuberculosis* as a means of determining the current status of tuberculosis developing in patients long after primary infection and identifying the source of infection.

Methods We analyzed two outbreaks of tuberculosis involving chronic carriers in 2004 within Okayama prefecture. DNA was extracted from *Mycobacterium tuberculosis* stains isolated from the patients, and subjected to IS6110-RFLP and PGRS-RFLP analyses. The resulting IS6110-RFLP patterns were compared with a database (compiled since December 1999) of RFLP patterns of isolates from newly registered tuberculosis patients in the prefecture. Mutations in the *rpoB* gene for rifampicin resistance and the *katG* gene for isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* were detected by real-time PCR followed by melting curve analysis. Bacterial isolates were tested for antimycobacterial susceptibility by the microdilution susceptibility method and the proportion method on Ogawa's medium.

Results In outbreak 1, an epidemiological survey suggested that two individuals contracted tuberculosis from the same patient after an interval of about 20 years. They differed from the suspected patient in the drug susceptibility patterns of bacterial isolates and mutations in the drug susceptibility-related genes, but the results of IS6110-RFLP and PGRS-RFLP analyses supported a conclusion of a common source of infection. In outbreak 2, a hospital employee developed primary multidrug-resistant tuberculosis of unknown origin. Comparison between the IS6110-RFLP patterns of the employee's bacterial isolate and the IS6110-RFLP database showed identity to a bacterial isolate from a chronic carrier who had died in the same hospital 4 years and 8 months earlier. Moreover, the two isolates were identical regarding drug susceptibility patterns and mutations in drug resistance-related genes, suggesting a nosocomial infection.

Conclusion These results indicates that tuberculosis gene analysis provides useful information for comprehension of the current status of tuberculosis developing in patients long after primary infection. Genotype database construction may allow detection of the source of infection, which cannot be identified by contact examination alone.

* Okayama Prefectural Institute for Environmental Science and Public Health