

Line Probe AssayによるRifampicin耐性遺伝子検査の有用性：患者喀痰を供試しての検討

1,3,4 稲垣 孝行 5 八木 哲也 1 市川 和哉 1,2 中川 拓
1,6 森山 誠 3 打矢 恵一 3 二改 俊章 1,2 小川 賢二

要旨：〔緒言〕 薬剤耐性結核の蔓延防止は、臨床上重要な課題である。そこで、早期にRFP耐性を検出できる結核菌群RFP耐性遺伝子同定キット「ジェノスカラー・RifTB®」を用いて、その臨床的有用性についての検討を行った。〔方法〕 肺結核症と確定診断された患者喀痰110検体を用いて、Auto-LiPAを用いた「ジェノスカラー・RifTB®」を実施し、RFPに対する感受性の判定を行い、塗抹検査および培養検査結果による検出感度の違いを検討した。また培養陽性検体は、MGITを用いた薬剤感受性検査と比較した。〔結果〕 塗抹陽性検体は、73検体中69検体でLiPA陽性であった（感度：94.5%）。塗抹陰性検体は、37検体中25検体でLiPA陽性であった（感度：67.6%）。培養陰性検体や培養困難な検体であっても、半数以上の検体でLiPA陽性であった。培養陽性となった76検体を薬剤感受性検査と比較したところ、RFP感受性株ではすべての検体で野生型を示したのに対し、RFP耐性株では8検体中6検体で変異型を示した。また、変異型を示した検体はすべて多剤耐性結核であった。〔考察〕 本検査法は喀痰塗抹陽性度がLiPAによるRFP耐性遺伝子の検出を決定する要因の一つになると考えられた。また培養陰性検体や培養困難な検体でも検出可能であり、RFP耐性および多剤耐性結核患者をより迅速に発見できると考えられた。

キーワード：多剤耐性結核, rifampicin, Line Probe Assay, *rpoB* 遺伝子, 塗抹検査, 培養検査

緒 言

今日における結核短期化学療法は、isoniazid (INH) と rifampicin (RFP) を中心として、ethambutol や pyrazinamide を加えた多剤併用療法が行われている¹⁾。しかし近年では、この化学療法において必須の抗菌薬であるINHとRFPの両薬剤に耐性を示す多剤耐性結核 (Multi-drug resistant tuberculosis: MDR-TB) が世界的に問題となっている。WHOの調査では、2006年に世界185カ国における初回多剤耐性率が3.1%、既治療多剤耐性率が19.3%、全体での多剤耐性率が4.8%であった²⁾。同年の日本における多剤耐性率は、およそ1.3%程度であったと報告されている³⁾。また、多剤耐性結核は、感受性結核に比べて治療が困難となるケースが多く、治療成功率はおおよそ70%程度である⁴⁾。

結核菌の薬剤感受性検査は、主に薬剤含有培地によるものであり、結果が得られるまでに数週間から数カ月の時間を要している⁵⁾。そのため、検査結果を初期治療に役立てることや早期の蔓延防止対策は困難であるため、より迅速に薬剤耐性の有無を検出する方法が求められている。結核菌の薬剤感受性検査の結果を迅速に得る手段としては、耐性遺伝子変異の検出により表現型としての耐性を推定する方法が挙げられている。

耐性結核菌は、ゲノムDNAの突然変異により生じるが、通常1つの薬剤に対して複数の耐性遺伝子が関与している。例えば、INH耐性菌は、50%程度が*katG*の変異であり、残りが*inhA*などの遺伝子の変異により薬剤耐性が生じる⁶⁾。一方、RFP耐性菌は、Telentiら⁷⁾により、RFP耐性株66株中64株でRNA polymerase subunit β をコードしている*rpoB* 遺伝子の511番目から533番目の23個

¹⁾ 独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床研究部, ²⁾ 同呼吸器科, ³⁾ 名城大学薬学部微生物学研究室, ⁴⁾ 高山赤十字病院薬剤部, ⁵⁾ 名古屋大学医学部附属病院中央感染制御部, ⁶⁾ 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター薬剤科

連絡先：小川賢二，独立行政法人国立病院機構東名古屋病院臨床研究部/呼吸器科，〒465-8620 愛知県名古屋市長区梅森坂5-101 (E-mail: ogawak@toumei.hosp.go.jp)
(Received 15 Mar. 2010/Accepted 21 Jun. 2010)

のアミノ酸 (69 bp) 領域の変異があったと報告している。その後、Kapurら⁸⁾により、69 bpのコア領域の外側の変異が報告され、現在では507番目から533番目の27個のアミノ酸 (81 bp) コア領域をホットスポット領域としている⁹⁾。RFP耐性株の約95%がこの領域の変異のため、遺伝子によるRFP耐性検査が可能である^{10) 11)}。さらに、Traoreら¹²⁾は、RFP耐性菌の92%がINH耐性菌であったと報告している。従って、*rpoB* 遺伝子中のコア領域の変異を検出することは、早期の適切な治療や多剤耐性結核のスクリーニングが可能となり、臨床的にはきわめて有用な検査法である。

結核菌群RFP耐性遺伝子同定キット「ジェノスカラー・RifTB[®]」は、リバースハイブリダイゼーション法を用いて、Line Probe Assay (LiPA) により、結核菌群の鑑別と*rpoB* 遺伝子中のホットスポット領域の変異を喀痰から直接検出できるキットである。本法を用いることにより、約1日でRFPに対する感受性を判定することが可能である¹³⁾。しかし、本検査法を実施している施設が少ないため、喀痰からの直接検出による信頼性の評価が十分になされていない現状がある^{14) 15)}。そこで本研究では、「ジェノスカラー・RifTB[®]」を用い、その臨床的有用性について検討した。

実験材料および方法

(1) 使用検体

使用検体は、独立行政法人国立病院機構東名古屋病院において肺結核症と確定診断された新規入院患者からの喀痰50検体 (2008年2月～5月)、および結核病棟に既入院中の患者からの喀痰60検体 (2008年2月～4月) を用いた。採痰は、患者1人につき1回行った。喀痰検体は、喀痰溶解酵素 (スプタザイム) で溶解および均一化した検体をN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム (NALC-NaOH) 法により前処理を行い、各検査に使用した。

(2) 実験方法

1. 結核菌塗抹検査

塗抹検査については、2000年に発表された結核菌検査指針に基づき、蛍光法を用いて染色した。判定には簡易法にて3+ (ガフキー6号以上)、2+ (ガフキー3～5号)、1+ (ガフキー2号)、± (ガフキー1号)、- (ガフキー0号: 菌陰性) に区分し判定を行い、塗抹検査での陽性度とLiPAによるRFP耐性遺伝子の検出感度について比較した。

2. MGITによる結核菌培養検査および薬剤感受性検査

培養検査については、「Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) /BACTEC MGIT 960 システム」¹⁶⁾ により培養を行い、培養期間とLiPAによるRFP耐性遺伝子の検

出感度について比較した。判定には、培養陽性になるまでの期間の違いを1週間ごとに区分し、6週間経過しても増菌が見られない場合は培養陰性とした。

また、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」によりRFPおよびINHに対する感受性の判定を行い、LiPAのRFP感受性の判定と比較した。

3. DNAの抽出

前処理後の検体は、各検査で使用した後、残りの全量を12,000 rpmで15分間遠心し、上清を捨て、TE [10 mM Tris-HCl (pH 8.0) -1 mM EDTA (pH 8.0)] buffer を100 μL加えた。その後、再度12,000 rpmで15分遠心し、上清を捨て、TE bufferを50 μL加え、よく混和した後、95℃で30分間加熱し、30分間凍結してDNAの抽出を行った。また、新規入院患者からの喀痰検体に対しては、さらに前処理後の検体100 μLについてAMPLICOR respiratory specimen preparation kitを用いてマニュアルに従い、DNAの抽出を行った。それぞれのDNA抽出液は、12,000 rpmで3分間遠心した後、増幅に使用した。

4. Line Probe Assay

DNA抽出液5 μLをジェノスカラー RifTB増幅試薬キットA (outer primerを含む) を用いてPCRによる増幅を行った後、その産物1 μLをジェノスカラー RifTB増幅試薬キットB (inner primerを含む) を用いて再度PCRを行いLiPA検体とした。得られたLiPA検体に対し、アガロースゲルにて電気泳動後、増幅の確認を行った。その後、Auto-LiPAを用いた「ジェノスカラー・RifTB[®]」を実施し、LiPAによるRFP耐性遺伝子の検出感度、およびRFPに対する感受性の判定を行った。

「ジェノスカラー・RifTB[®]」は、ビオチン化して増幅した*rpoB* 遺伝子をストリップ上の結核菌群特異的プローブ (TB)、および5種類の野生型プローブ (S1～S5) とRFP耐性結核菌に見られる*rpoB* 遺伝子変異に対応する4種類の変異型プローブ (R2, R4a, R4b, R5) にハイブリダイズさせ、塩基配列が一致したプローブにLiPA検体が結合する。ストリップを洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、基質を加え発色させる。検体のDNA配列が野生型の場合5本の野生型プローブの発色が見られれば、RFP感受性と判定する。変異が存在する場合は、相当する野生型プローブに発色が見られず、RFP耐性と判定する。また、変異型プローブに該当する変異の場合、Rプローブが発色する。従って、結核菌群特異的プローブ、および5種類の野生型プローブに発色が見られた場合は野生型 (Wild type: WT) と判定した。結核菌群特異的プローブ、および4種類の野生型プローブのみに発色が見られた場合、もしくは対応する変異型プローブに発色が見られた場合

は変異型 (ΔS1 ~ S5, R2, R4a, R4b, R5) と判定した (Fig.)。

5. *rpoB* 遺伝子変異領域のシーケンス解析

判定が困難となった検体など合計 4 検体に対して、シーケンス解析用プライマー (IP-1, IP-2) を用いて、*rpoB* 遺伝子変異領域のシーケンス解析を行った。得られたデータは NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) による BLAST 解析を行い、データベースと比較した。

実験結果

(1) 塗抹検査で判定された陽性度と LiPA 判定結果の相関性

塗抹検査で判定された陽性度と LiPA による RFP 耐性遺伝子の検出結果を Table 1 に示した。新規入院患者からの喀痰 50 検体、および結核病棟に既入院中の患者からの喀痰 60 検体計 110 検体のうち、塗抹陽性であった

73 検体中 69 検体で LiPA 陽性であった (感度: 94.5%)。また、塗抹陰性であった 37 検体中 25 検体で LiPA 陽性であった (感度: 67.6%)。

(2) 培養期間の違いと LiPA 判定結果の相関性

培養期間の違いと LiPA による RFP 耐性遺伝子の検出結果を Table 2 に示した。培養陽性であった 76 検体中 LiPA 陽性検体が 68 検体 (感度: 89.5%)、LiPA 陰性検体が 8 検体であった。培養陰性の 29 検体中 23 検体が LiPA 陽性 (感度: 79.3%) であり、汚染により培養困難な検体 5 検体中 3 検体が LiPA 陽性であった。

(3) DNA の抽出方法の違いによる LiPA 判定結果に対する影響

TE buffer を用いて DNA 抽出した場合、50 検体中 46 検体で LiPA 陽性であった。一方、PCR 同定検査で用いられる AMPLICOR respiratory specimen preparation kit による DNA 抽出液を用いた場合、50 検体中 44 検体で LiPA

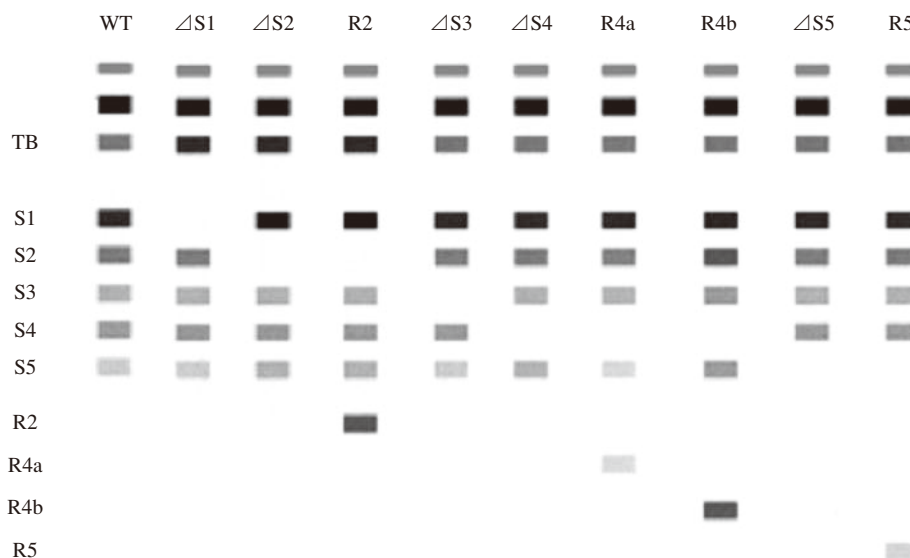


Fig. Representative hybridization patterns obtained with line probe strips. The TB line (TB) is a specific probe for *M. tuberculosis* complex. Nine probes (S1 to S5, R2, R4a, R4b and R5) were designed to detect nucleotide changes in the relevant part of *rpoB*. The S probes exclusively hybridize to the wild-type sequence. The R probes hybridize with amplicons carrying the respective mutations. According to the reactivities of the probes, 10 common LiPA patterns can be expected for *M. tuberculosis* complex strains. If all R probes are negative and all S probes are positive, a wild-type sequence is present (WT). When one of the S probes is missing and no R probe hybridizes, this pattern is indicated with a Δ preceding the missing probe (e.g., ΔS1). If one of the S probes is negative and the corresponding R probe is positive, the pattern is defined according to the R probe observed (e.g., R2). Occasionally, deviating patterns may be observed, as outlined in the text.

Table 1 Detection of mycobacteria by fluorochrome stain microscopy and LiPA for 110 sputum samples

		Smear examination				
		3+	2+	1+	±	-
LiPA test	Positive	20	21	15	13	25
	Negative	1	1	0	2	12
Total		21	22	15	15	37

陽性であった。異なるDNAの抽出方法による検出感度について、McNemar検定の結果、有意な差はなかった ($\chi^2 = 0.25$; $P = 0.62$)。

(4) LiPAによるRFP耐性遺伝子検査とMGITを用いた薬剤感受性検査の結果の比較

新規入院患者からの45検体、および培養陽性となった結核病棟に既入院中の患者からの31検体、合計76検体について、LiPAでのRFP感受性の判定結果とMGITによる薬剤感受性検査をTable 3に示した。RFP感受性株68検体中62検体が野生型を示した。残りの6検体は喀痰からのDNA抽出で検出されなかったが、培養後に培養菌液からのDNA抽出をしたところ、すべての検体で野生型を示した。一方、RFP耐性株8検体中6検体で変異型を示した。変異のパターンは、それぞれ Δ S1変異型が3検体、R2変異型が1検体、R5変異型が2検体であった。残りの2検体のうちNo.19は、プローブS2とR2の両方に発色が見られた。No.200は、プローブS5、R4a、R4bに弱い発色を呈した。そのため、この2検体は、感受性もしくは耐性の判定が困難であった。以上より、感度75.0%、特異度91.2%、一致率89.5%であった。

(5) LiPAでの判定困難であった検体に対するシーケンス解析の結果

判定が困難であった2検体 (No.19とNo.200) について、*rpoB* 遺伝子変異領域のシーケンス解析を行った。No.19の場合は、*rpoB* 遺伝子の塩基配列中の516番目のコドンにおける塩基が2種類以上混在していたため、シーケンス解析による判定ができなかった (gAc→gNc)。No.200の場合は、*rpoB* 遺伝子の塩基配列中の533番目のコドンにおける塩基の変異が認められた (cTg→cCg)。

(6) LiPA陰性となったが、ジェノスカラーで用いるPCRで増幅が認められた1検体の検討

LiPA陰性となったが、ジェノスカラーで用いるPCR

で増幅が認められた1検体 (No.83) について、*rpoB* 遺伝子変異領域のシーケンス解析を行った。BLAST解析の結果、*Neisseria meningitidis* 基準株と最も相同性が高く、93%の一致率であった。

考 察

本研究では、確定診断された結核患者からの喀痰110検体から、LiPAによるRFP耐性遺伝子の迅速検出法について、その臨床的有用性の検討を行った。RFPの作用機序は、結核菌のRNA polymerase subunit β に結合し、RNA鎖形成の開始を阻害する。約95%のRFP耐性菌は、このRNA polymerase subunit β をコードする*rpoB* 遺伝子中のホットスポット領域に変異が認められ、感受性菌には変異が認められていないことが報告されている¹²⁾。

病院施設内の細菌検査室でLiPAを実施する場合、検体提出から約1日以内に行われる。そのため、塗抹検査の結果のみで実施に適した検体であるか確認する必要がある。塗抹陽性検体では感度が94.5%、塗抹陰性検体では感度67.6%であった。つまり、塗抹検査により目視で菌が確認できない喀痰を検査材料として用いた場合には、感度が著しく低下した。従って、塗抹検査の陽性度がLiPAによるRFP耐性遺伝子の検出を決定する要因の一つになると考えられた。

従来の薬剤感受性検査は、培養陽性検体のみ実施することが可能だが、一般細菌汚染による検体や塗抹陽性だが培養陰性となる検体などでは、感受性の判定を行うことができない。一方、これらの薬剤感受性検査を実施できない検体に対してもLiPAは、培養陰性検体の79.3%、培養困難な検体5検体中3検体でRFP感受性の判定が可能であった。ただし、培養陽性でも10.5%の検体でLiPAによるRFP感受性の判定ができなかった。従って、LiPAを用いた遺伝子検査は、従来の薬剤感受性検査を実施で

Table 2 LiPA and culture results for 110 sputum samples

LiPA test		Culture positive				Culture negative 6 weeks	Contamination
		1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks		
Positive	Positive	38	23	7	0	23	3
	Negative	1	4	2	1	6	2
Total		39	27	9	1	29	5

Table 3 Comparison of the results of LiPA with the *in vitro* susceptibility test by MGIT

Susceptibility	(n)	LiPA profile			
		Wild type	Mutation type	Indeterminant	Undetected
RFP-sensitive	(68)	62	0	0	6
RFP-resistant	(8)	0	6	2*	0
Total	(76)	62	6	2	6

*Sample Nos. 19 and 200.

きない検体にも実施できるが、培養陽性検体であっても感受性を判定できなかった検体も少なからず存在することから、培養陽性検体であれば、常に薬剤感受性検査を実施すべきであると考えられた。

DNAの抽出方法により、PCRによるDNAの増幅に対する感度が異なることが知られている。そこで、PCR同定検査で用いられたDNA抽出液とTE bufferによるDNA抽出液を用いてLiPAでの検出感度を比較した。各抽出方法ともに、増幅できなかった検体が含まれた原因として、PCR同定検査で用いられたDNA抽出液では、サンプル量が少なかったために検出されなかったと考えられた。また、TE bufferによるDNA抽出では、抽出効率が低いと検出されなかったと考えられた。しかし、抽出方法の違いによる有意な差が認められなかったことから、PCR同定検査で使用したDNA抽出液をLiPAに用いることにより、DNA抽出の手間を省くことができ、より迅速に判定が可能になると考えられた。

LiPAの感受性の判定結果について、感度75.0%、特異度91.2%、一致率89.5%であった。感度が低下した原因は、判定が困難な検体（No.19とNo.200）があった。No.19の検体については、S2とR2の両方に発色が見られ、シーケンス解析結果から516番目のコドンの判定ができなかったため、野生型と変異型の両方が混在していたと考えられた。Hillemannら¹⁷⁾は、変異型と野生型が混在する検体での検出限界は10%であったと報告しており、これらの検体では薬剤感受性検査のほうが感度は高かったと報告している。一方、Hiranoら¹⁸⁾は、薬剤感受性検査に比べ、変異型プローブがあることで、変異型と野生型が混在する検体を確認できるため、有用な検査法であったと報告している。No.200の検体については、S5、R4a、R4bに弱い発色が見られ、533番目のコドンが変異していた。この533番目のコドンが変異するとホットスポット領域の末端に当たる位置のため、非特異的な結合が起こると報告されている¹³⁾¹⁹⁾。従って、このようにまれな判定の結果が起こりうることを考慮しておく必要があると考えられた。また、喀痰材料からのDNA抽出では、検出ができなかった検体が存在したため、特異度が低下した。しかし、RFP感受性株で変異型検体、RFP耐性株で野生型検体を認められなかったことから、薬剤感受性との相関性が高い検査法であると考えられた。本研究におけるすべての変異型検体は、多剤耐性結核であった。このうち1検体は、新規入院患者から得られた喀痰であった。従って、RFP耐性のみを判定する本検査法は、多剤耐性結核患者のスクリーニングをするうえでも有用な検査法であると考えられた。

LiPAの結核菌群特異的プローブは、この群に対して100%特異性を示すことが報告されている¹²⁾。本研究に

おいて、1症例であるがナイセリア属の髄膜炎起因菌（*N.meningitidis*）に最も相同性があるPCR産物が検出された。*N.meningitidis*は、健常人でも5~20%保菌者であるため、他の検体でもこれら結核菌以外の菌のDNAが増幅される可能性が考えられた。ただし今回、相同性が93%と低いことから、非特異的な増幅である可能性も考えられた。いずれにしてもLiPAでは、全く検出されなかった。そのため、きわめて特異性が高く信頼性がある検査法であると考えられた。

以上の結果から、本検査法は、塗抹陽性度によってLiPAによるRFP耐性遺伝子の検出感度が異なると考えられた。また、従来の薬剤感受性検査では、測定することができない検体も検出可能であり、特異性が高く、臨床現場では有用な情報となりうると考えられた。さらに、多剤耐性結核患者をより迅速に発見でき、早期に適切な治療を行うことができると考えられた。従って、本検査法は、新規入院患者における多剤耐性結核のスクリーニングや、既入院中患者での早期に耐性の判定が必要な時、培養が困難であった場合などに適用すべきではないかと考えられた。また、2カ所の変異や欠損するパターンなどの特殊なケースと薬剤感受性検査結果を比較したデータの蓄積や喀痰以外の材料を用いた場合の検出感度などが今後検討すべき課題であると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大な御協力をいただきました宮岡秀和氏をはじめとする独立行政法人国立病院機構東名古屋病院検査科の皆様にご礼申し上げます。また御助言をいただきましたニプロ株式会社 末竹寿紀氏に心より感謝致します。

文 献

- 1) 日本結核病学会治療委員会：「結核医療の基準」の見直し—2008年。結核。2008；83：529-535。
- 2) World Health Organization: Anti-tuberculosis drug resistance in the world: Fourth global report. WHO/HTM/TB. 2008；394。
- 3) 豊田恵美子, 川辺芳子, 四元秀毅, 他：多剤および超多剤耐性結核の全国調査（2006年）。結核。2008；83：773-777。
- 4) 吉山 崇, 尾形英雄, 和田雅子：多剤耐性結核の治療成績。結核。2005；80：687-693。
- 5) 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。
- 6) Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz-Kopec E, et al.: Detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2007；45：179-192。
- 7) Telenti A, Imboden P, Marchesi F, et al.: Detection of

- rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet. 1993 ; 341 : 647–650.
- 8) Kapur V, Li LL, Hamrick MR, et al.: Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. Arch Pathol Lab Med. 1995 ; 119 : 131–138.
 - 9) Musser JM: Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev. 1995 ; 8 : 496–514.
 - 10) Heep M, Brandstätter B, Rieger U, et al.: Frequency of *rpoB* mutations inside and outside the cluster I region in rifampin-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 107–110.
 - 11) Bártfai Z, Somoskövi A, Ködmön C, et al.: Molecular characterization of rifampin-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from Hungary by DNA sequencing and the line probe assay. J Clin Microbiol. 2001 ; 39 : 3736–3739.
 - 12) Traore H, van Deun A, Shamputa IC, et al.: Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA and rifampin resistance in clinical specimens from tuberculosis patients by line probe assay. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 4384–4388.
 - 13) 樋口武史, 伏脇猛司, 田中奈加子, 他: 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. 結核. 2004 ; 79 : 525–530.
 - 14) 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.
 - 15) Somoskovi A, Dormandy J, Mitsani D, et al.: Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. J Clin Microbiol. 2006 ; 44 : 4459–4463.
 - 16) 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.
 - 17) Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, et al.: Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol. 2005 ; 43 : 3699–3703.
 - 18) 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.
 - 19) Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, et al.: Evaluation of the INNO-LiPA Rif. TB assay, a reverse hybridization assay for the simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and its resistance to rifampin. Antimicrob Agents Chemother. 1997 ; 41 : 2093–2098.

Original Article

CLINICAL APPLICATION OF LINE PROBE ASSAY (LiPA) FOR RIFAMPICIN (RFP)-RESISTANT GENE EXAMINATION IN SPUTUM FROM TUBERCULOSIS PATIENTS

^{1,3,4}Takayuki INAGAKI, ⁵Tetsuya YAGI, ¹Kazuya ICHIKAWA, ^{1,2}Taku NAKAGAWA, ^{1,6}Makoto MORIYAMA, ³Kei-ichi UCHIYA, ³Toshiaki NIKAI, and ^{1,2}Kenji OGAWA

Abstract [Introduction] Preventing the spread of drug-resistant tuberculosis is a clinically important challenge. In this effort, rifampicin (RFP)-resistant gene examination by line probe assay (LiPA) was evaluated for its clinical application for rapid detection of tuberculosis.

[Methods] The RFP-resistant gene was examined in a total of 110 samples of sputum obtained from patients that were definitively diagnosed with pulmonary tuberculosis by auto-LiPA. The difference in detection sensitivity between the results of the smear and culture examinations was evaluated. Culture-positive samples were compared with the results of the drug susceptibility test.

[Results] Smear-positive samples were LiPA positive in 69 of 73 samples (sensitivity: 94.5%), and smear-negative samples were LiPA positive in 25 of 37 samples (67.6%). More than half of the samples were LiPA positive, even those that were culture-negative or contaminated. Comparison of the 76 culture-positive samples with the results of the drug susceptibility test found that all samples were wild type among the RFP-sensitive strains. Among the 8 RFP-resistant strains, 6 were mutation type. All samples shown to be mutation type were obtained from patients with multi-drug resistant tuberculosis.

[Discussion] Using LiPA, the amount of smear can be used as a factor for detection of RFP-resistant genes. Detection was possible even with culture-negative and contaminated samples, allowing more rapid diagnosis of patients with multi-drug resistant tuberculosis.

Key words: Multi-drug resistant tuberculosis (MDR-TB), Rifampicin, Line Probe Assay, *rpoB* gene, Smear examination, Culture examination

¹Departments of Clinical Research, ²Pulmonary Medicine, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital, ³Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, Meijo University, ⁴Department of Pharmacy, Takayama Red Cross Hospital, ⁵Department of Infectious Diseases, Center of National University Hospital for Infection Control, Nagoya University Hospital, ⁶Department of Pharmacy, National Hospital Organization Nagoya Medical Center

Correspondence to: Kenji Ogawa, National Hospital Organization Higashinagoya National Hospital, 5-101, Umemori-zaka, Meito-ku, Nagoya-shi, Aichi 465-8620 Japan.
(E-mail: ogawak@toumei.hosp.go.jp)