

Thi Minh Ngoc, Ms. Nguyen Thi Ha (NCGM-BMH Medical Collaboration Center), and all the healthcare staff of relevant district TB centers for supporting site implementation.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NTLH LTL SM PHT NVH VCC SS HE NK. Performed the experiments: SM TBT

NPH KTTN. Analyzed the data: NTLH AN TM NK. Contributed reagents/materials/analysis tools: NTLH LTL SM PHT NVH TBT NPH VCC KTTN SS HE NK. Wrote the manuscript: NTLH SM NK.

### References

- World Health Organization (2012) Global tuberculosis Report WHO/HTM/TB/2012.6. Available: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf). Accessed 20 April, 2013.
- Goble M, Iseman MD, Madsen LA, Waite D, Ackerson L et al. (1993) Treatment of 171 patients with pulmonary tuberculosis resistant to isoniazid and rifampin. *N Engl J Med* 328: 527-532. doi:10.1056/NEJM199302253280802. PubMed: 8426619.
- Zhang Y, Yew WW (2009) Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 1320-1330. PubMed: 19861002.
- Faustini A, Hall AJ, Perucci CA (2006) Risk factors for multidrug resistant tuberculosis in Europe: a systematic review. *Thorax* 61: 158-163. doi:10.1136/thx.2005.045963. PubMed: 16254056.
- Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A (2009) Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? *A Syst Rev PLOS One* 4: e5561. doi:10.1371/journal.pone.0005561.
- Caminero JA (2010) Multidrug-resistant tuberculosis: epidemiology, risk factors and case finding. *Int J Tuberc Lung Dis* 14: 382-390. PubMed: 20202293.
- World Health Organization (2008) Anti-tuberculosis drug resistance in the world—Fourth global report. WHO/HTM/TB/2008.394. Available: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO\\_HTM\\_TB\\_2008.394\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTM_TB_2008.394_eng.pdf). Accessed: 20 April, 2013.
- Huong NT, Lan NT, Cobelens FG, Duong BD, Co NV et al. (2006) Antituberculosis drug resistance in the south of Vietnam: prevalence and trends. *J Infect Dis* 194: 1226-1232. doi:10.1086/507906. PubMed: 17041848.
- Quy HT, Buu TN, Cobelens FG, Lan NT, Lambregts CS et al. (2006) Drug resistance among smear-positive tuberculosis patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 10: 160-166. PubMed: 16499254.
- Khuê PM, Phuc TQ, Hung NV, Jarlier V, Robert J (2008) Drug resistance and HIV co-infection among pulmonary tuberculosis patients in Haiphong City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 12: 763-768. PubMed: 18544201.
- World Health Organization (2003) Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis WHO/CDS/TB/2003.320. Available: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241546336.pdf>. Accessed 20 April, 2013.
- Sharma B, Pal N, Malhotra B, Vyas L, Rishi S (2010) Comparison of MGIT 960 & pyrazinamidase activity assay for pyrazinamide susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian J Med Res* 132: 72-76. PubMed: 20693593.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D et al. (1977) Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35: 907-914. PubMed: 9157152.
- Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodingier WM, Gori A et al. (2006) *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6: 23. doi:10.1186/1471-2180-6-23. PubMed: 16519816.
- Chuang PC, Chen HY, Jou R (2010) Single-nucleotide polymorphism in the fadD28 gene as a genetic marker for East Asia Lineage *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 48: 4245-4247. doi:10.1128/JCM.00970-10. PubMed: 20826639.
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rüsch-Gerdes S et al. (2006) Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 44: 4498-4510. doi:10.1128/JCM.01392-06. PubMed: 17005759.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J et al. (1994) The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 330: 1703-1709. doi:10.1056/NEJM199406163302402. PubMed: 7910661.
- Zhao Y, Xu S, Wang L, Chin DP, Wang S et al. (2012) National survey of drug-resistant tuberculosis in China. *N Engl J Med* 366: 2161-2170. doi:10.1056/NEJMoa1108789. PubMed: 22670902.
- Menzies D, Benedetti A, Paydar A, Martin I, Royce S et al. (2009) Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLOS Med* 6: e1000146. PubMed: 19753109.
- Lew W, Pai M, Oxlade O, Martin D, Menzies D (2008) Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 149: 123-134. doi:10.7326/0003-4819-149-2-200807150-00008. PubMed: 18626051.
- Liang L, Wu Q, Gao L, Hao Y, Liu C et al. (2012) Factors contributing to the high prevalence of multidrug-resistant tuberculosis: a study from China. *Thorax* 67: 632-638. doi:10.1136/thoraxjnl-2011-200018. PubMed: 22403070.
- Buu TN, Huyen MN, Lan NT, Quy HT, Hen NV et al. (2009) The Beijing genotype is associated with young age and multidrug-resistant tuberculosis in rural Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 900-906. PubMed: 19555542.
- Huong NT, Duong BD, Co NV, Quy HT, Tung LB et al. (2005) Establishment and development of the National Tuberculosis Control Programme in Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 9: 151-156. PubMed: 15732733.
- Ministry of Health (2006) National Tuberculosis Program: 20 years establishment and development. Vietnam: Medical Publishing House. 132 p.
- Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D (2002) Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. *Emerg Infect Dis* 8: 843-849. doi:10.3201/eid0808.020002. PubMed: 12141971.
- European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis/European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis (2006) Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. *Emerg Infect Dis* 12: 736-743. doi:10.3201/eid1205.050400. PubMed: 16704829.
- Yang C, Luo T, Sun G, Qiao K, Sun G et al. (2012) *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains favor transmission but not drug resistance in China. *Clin Infect Dis* 55: 1179-1187. doi:10.1093/cid/cis670. PubMed: 22865872.
- Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD et al. (2002) Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 40: 4561-4566. doi:10.1128/JCM.40.12.4561-4566.2002. PubMed: 12454152.
- Shanmugam S, Selvakumar N, Narayanan S (2011) Drug resistance among different genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients from Tiruvallur, South India. *Infect Genet Evol* 11: 980-986. doi:10.1016/j.meegid.2011.03.011. PubMed: 21453793.
- Phyu S, Stavrum R, Lwin T, Svendsen ØS, Ti T et al. (2009) Predominance of *Mycobacterium tuberculosis* EAI and Beijing lineages in Yangon, Myanmar. *J Clin Microbiol* 47: 335-344. doi:10.1128/JCM.01812-08. PubMed: 19036933.
- Sandman L, Schluger NW, Davidow AL, Bonk S (1999) Risk factors for rifampin-mono-resistant tuberculosis: A case-control study. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 468-472. doi:10.1164/ajrccm.159.2.9805097. PubMed: 9927359.
- Suchindran S, Brouwer ES, Van Rie A (2009) Is HIV infection a risk factor for multi-drug resistant tuberculosis? *A Syst Rev PLOS One* 4: e5561. doi:10.1371/journal.pone.0005561.
- UNAIDS/WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STI Surveillance (2008) Epidemiological Fact Sheet on HIV and AIDS, 2008 update. Available: [http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/EFS2008/full/EFS2008\\_VN.pdf](http://apps.who.int/globalatlas/predefinedReports/EFS2008/full/EFS2008_VN.pdf). Accessed: 20 April, 2013.

34. Cohn JA (2002) HIV-1 infection in injection drug users. *Infect Dis Clin North Am* 16: 745-770. doi:10.1016/S0891-5520(02)00012-0. PubMed: 12371125.
35. McIlleron H, Wash P, Burger A, Norman J, Folb PI et al. (2006) Determinants of rifampin, isoniazid, pyrazinamide, and ethambutol pharmacokinetics in a cohort of tuberculosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1170-1177. doi:10.1128/AAC.50.4.1170-1177.2006. PubMed: 16569826.
36. Ahmad Khan F, Minion J, Al-Motairi A, Benedetti A, Harries AD et al. (2012) An updated systematic review and meta-analysis on the treatment of active tuberculosis in patients with HIV Infection. *Clin Infect Dis* 55: 1154-1163. doi:10.1093/cid/cis630. PubMed: 22820541.
37. Slama K, Chiang CY, Enarson DA, Hassmiller K, Fanning A et al. (2007) Tobacco and tuberculosis: a qualitative systematic review and meta-analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 11: 1049-1061. PubMed: 17945060.
38. Chang KC, Yew WW, Zhang Y (2011) Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4499-4505. doi:10.1128/AAC.00630-11. PubMed: 21768515.
39. Luo T, Yang C, Gagneux S, Gicquel B, Mei J et al. (2012) Combination of single nucleotide polymorphism and variable-number tandem repeats for genotyping a homogenous population of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains in China. *J Clin Microbiol* 50: 633-639. doi: 10.1128/JCM.05539-11. PubMed: 22205801.
40. Mulenga C, Shamputa IC, Mwakazanga D, Kapata N, Portaels F et al. (2010) Diversity of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes circulating in Ndola, Zambia. *BMC Infect Dis* 10: 177. doi: 10.1186/1471-2334-10-177. PubMed: 20565802.
41. Nabyonga L, Kateete DP, Katabazi FA, Odong PR, Whalen CC et al. (2011) Determination of circulating *Mycobacterium tuberculosis* strains and transmission patterns among pulmonary TB patients in Kawempe municipality, Uganda, using MIRU-VNTR. *BMC Res Notes* 4: 280. doi: 10.1186/1756-0500-4-280. PubMed: 21835016.
42. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D (2010) Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis* 10: 103-111. doi:10.1016/S1473-3099(09)70330-5. PubMed: 20113979.
43. Buu TN, van Soolingen D, Huyen MN, Lan NT, Quy HT et al. (2010) Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin: a population-based study. *PLOS ONE* 2012: e42323. PubMed: 22912700.
44. Nguyen VA, Choisy M, Nguyen DH, Tran TH, Pham KL et al. (2010) High prevalence of Beijing and EA14-VNM genotypes among *M. tuberculosis* isolates in northern Vietnam: sampling effect, rural and urban disparities. *PLOS ONE* 7: e45553. PubMed: 23029091.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Clonal expansion of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and coexisting drug resistance in patients newly diagnosed with pulmonary tuberculosis in Hanoi, Vietnam

Nguyen-Van Hung<sup>1\*</sup>, Hiroki Ando<sup>2</sup>, Tran Thi-Bich Thuy<sup>1</sup>, Tomoko Kuwahara<sup>2</sup>, Nguyen Thi-Le Hang<sup>3</sup>, Shinsaku Sakurada<sup>2</sup>, Pham Huu Thuong<sup>4</sup>, Luu Thi Lien<sup>5</sup> and Naoto Keicho<sup>2,6</sup>

## Abstract

**Background:** Newly diagnosed patients without anti-tuberculosis (TB) treatment histories have not often undergone drug susceptibility testing (DST), but have received the standard treatment regimen without information about their DST profiles in many countries with inadequate resources.

**Methods:** We collected 346 clinical isolates from previously untreated patients with smear-positive active TB in Hanoi, the capital of Vietnam. Of these, 339 were tested for susceptibility to four first-line anti-TB drugs, including isoniazid (INH), rifampicin (RMP), streptomycin (SM), and ethambutol (EMB), using the proportion method. A pyrazinamidase (PZase) test was used to assess pyrazinamide (PZA) resistance. Results of the culture-based drug susceptibility tests were confirmed by those from reverse hybridization-based line probe assays (LiPAs) that detected mutations associated with RMP, INH, PZA, and fluoroquinolone (FQ) resistance. To investigate a diversity of these strains, IS6110-probed restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) were analyzed. Nucleotide sequences for *furA-katG* and *fabG1-inhA* operons, transcription units responsible for INH resistance, were also determined.

**Results:** Of the isolates tested, 127 (37.5%) were resistant to at least one of the four drugs, which included 93 (27.4%) isolates that were resistant to INH. RFLP analysis identified four clusters defined by similarity of the band patterns, which accounted for 46.1% of the tested isolates. Among the clustered isolates, 37.7% were resistant to INH, most of which (85.4%) carried a g944c mutation, which causes an S315T amino acid substitution, in the *katG* gene.

**Conclusions:** Our results suggest that drug-resistant strains, particularly those with INH resistance characterized by a single mutation, S315T, are spreading in Hanoi, Vietnam. When RMP resistance is combined with this setting, patients are not easily cured by conventional short-term treatment. We will need to carefully monitor these trends and search for the origins and transmission routes of these strains.

**Keywords:** Primary drug resistance, Isoniazid, Gene mutation, Restriction fragment length polymorphism, Vietnam

\* Correspondence: hungmtb75@gmail.com

<sup>1</sup>Department of Microbiology, National Lung Hospital, 463 Hoang Hoa Tham, Hanoi, Vietnam

Full list of author information is available at the end of the article

## Background

The drug susceptibility profiles of clinically isolated *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) strains, particularly those from previously untreated patients, have not been included in clinical practice in many countries with inadequate resources. A single standard anti-tuberculosis (TB) treatment without information regarding drug susceptibility is prone to failure or relapse, as initial drug resistance increases the chance of acquiring additional drug resistance [1].

Molecular fingerprinting of MTB strains has been used extensively and is crucial for elucidating the transmission routes of drug-resistant TB [2,3]. A rapidly developing large city is often accompanied by overcrowding and a floating population, and it is often not easy to identify the epidemiological link between TB cases. Nevertheless, the molecular epidemiological techniques are useful for providing insights into the spread patterns of MTB on site and can thus aid in enhancing TB control activities in the entire city.

Vietnam is a Southeast Asian country stretching over 1,800 km from north to south. It is one of 22 high-burden countries worldwide, and its TB prevalence remains high (323 per 100,000 in 2011) [4]. Vietnam reported an incidence of 2.7% multi-drug resistant-TB among new cases in a 2006 survey (95% confidence interval: 2.0–3.6) [5].

The northern and southern regions of Vietnam have also been under different health policies for more than 20 years. It remains unclear whether entire profiles of MTB isolates obtained in one area are equally useful throughout the country. An earlier report [6] suggested differences in genotypes and drug susceptibility patterns between isolates obtained in distant regions of Vietnam.

Although the status of primary drug resistance has been reported in some areas of Vietnam [7-9], molecular biological approaches to this issue have not yet been completely exploited. Thus, we analyzed the profiles of drug susceptibility testing (DST), drug resistance genes, and fingerprint patterns of MTB isolates obtained from 339 previously untreated patients with smear-positive active TB in Hanoi, the capital of Vietnam.

## Methods

### Ethics statement

A written informed consent was obtained from each participant. The study was approved by ethical committees of the Ministry of Health, Vietnam and National Center for Global Health and Medicine, Japan.

### Clinical isolates from acid-fast bacilli (AFB)-positive sputum

Clinical isolates were consecutively collected from previously untreated patients with AFB-positive active TB in Hanoi city between August 2007 and August 2008. At

least two sputum specimens were collected from each patient; one was for a smear test and the other was used for culture in the Department of Microbiology of the Hanoi Lung Hospital. Specimens were decontaminated and homogenized with 0.5% NALC–2% NaOH and subsequently inoculated on Löwenstein–Jensen media. MTB isolates were transferred to the Molecular Biology Laboratory of the National Lung Hospital and subjected to MTB identification using niacin and nitrate tests, DST, and other molecular epidemiological tests.

### Drug susceptibility testing (DST)

DST was performed using the proportion method based on World Health Organization (WHO) guidelines [10]. The test medium contained rifampicin (RMP; 40 µg/mL), isoniazid (INH; 0.2 µg/mL and 1.0 µg/mL), ethambutol (EMB; 2.0 µg/mL), and streptomycin (SM; 4.0 µg/mL). Drug resistance was defined as  $\geq 1\%$  colony growth compared with a drug-free control of Löwenstein–Jensen medium.

### Pyrazinamidase (PZase) assay

PZase activity was determined by Wayne's method with minor modifications [11,12]. As a positive control, we used the MTB H37Rv strain that is susceptible to pyrazinamide (PZA) and is positive for PZase. As a negative control, we used the *M. bovis* BCG strain that is resistant to PZA and is negative for PZase.

### Isolation of genomic DNA

Genomic DNA from MTB was extracted using the original method described [13], with slight modifications [14]. Approximately 400 µl of a bacterial suspension in TE buffer was heated at 80°C for 20 min to kill bacteria. First, 50 µl of lysozyme (10 mg/ml) was added followed by incubation at 37°C for 1 h. Subsequently, 75 µl of SDS/proteinase K was gently mixed followed by incubation at 65°C for 10 min. In addition, 100 µl of 5-M NaCl and 100 µl of CTAB/NaCl solution were thoroughly mixed and incubated for 10 min at 65°C. An equal volume (approximately 750 µl) of chloroform/isoamylalcohol was added, and the mixture was centrifuged for 5 min at 12,000× g. The aqueous supernatant was carefully transferred to another tube. Total DNA was precipitated in isopropanol and was dissolved in 0.1× TE buffer.

### Line probe assays (LiPAs)

Reverse hybridization-based LiPAs were used to confirm the results of DST and to detect mutations associated with resistance to RMP [15], INH [16], PZA [12], and fluoroquinolone (FQ) [17]. To detect mutations associated with RMP resistance, 5 oligonucleotide probes were used to hybridize to wild-type sequences and 4 probes to mutation sequences of the *rpoB* gene. For INH resistance,

41 oligonucleotide probes were designed to cover mutations in the regions of *katG* (35 probes), *furA* (2 probes), *fabG1-inhA promoter* (2 probes), and *fabG1* (2 probes). The details and performances of these tests have been reported in the references described above [12,15-17].

#### Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

Experimental procedures for bacterial growth, DNA extraction, DNA digestion with *PvuII* (Takara Bio Inc. Otsu, Japan), electrophoresis on a 1% agarose gel, and Southern blotting and membrane hybridization with a peroxidase-labeled 245-bp IS6110 probe were performed using standardized methods [18] with slight modifications [14]. The hybridized probe was visualized with an ECL detection system (Amersham Biosciences). Fingerprinting images were analyzed with Fingerprinting™ II software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), and percent similarity among the isolates was determined according to the supplier's instructions. To classify strains into the same family on the basis of their genotyping profiles, a similarity index of 70%, slightly more stringent than 65% used in a previous report [19] was chosen in this study. Normalization was performed using molecular weight standards and the IS6110-fingerprinting patterns of two isolates run on each gel. Isolates with fewer than five IS6110 copies were excluded from the cluster analysis.

#### DNA sequencing of INH resistance-related genes

The *furA-katG* operon and its upstream region were amplified by PCR using the specific primers and conditions described previously [16]. The primers used were -129*furA* (5'-GCTCATCGGAACATACGAAG-3') and *katG* +50 (5'-GTGCTGCGGCGGGTTGTGGTTGATCGGCGG-3'). The *fabG1-inhA* operon and the upstream region of the *fabG1-inhA* operon were also amplified using previously reported primers [16]: -200*fabG1* (5'-TTCGTA GGGCGTCAATACAC-3') and *inhA* +40 (5'-CCGAA CGACAGCAGCAGGAC-3'). PCR products were used as templates for direct DNA sequencing. To detect mutations, DNA sequences were compared with those of H37Rv using Genetyx-Mac, version 14.0.2 (Genetyx Corporation, Tokyo, Japan).

#### Statistical analysis

Chi-square tests were used to compare proportions between two groups. Kappa statistics were used to determine the agreement between two tests. The following guidelines were used to interpret kappa coefficients: <0, poor agreement; 0-0.20, slight; 0.21-0.40, fair; 0.41-0.60, moderate; 0.61-0.80, good; and 0.81-1.00, very good. *P* values <0.05 were considered statistically significant, unless otherwise noted. The Bonferroni correction was used when comparing the results for multiple drugs. JMP version 9.0.0 (SAS

Institute, Inc., Cary, NC, USA) statistics software was used for analysis.

## Results

#### Clinical isolates from AFB-positive sputum

Clinical isolates were collected from 346 consecutive previously-untreated patients with AFB-positive active TB in Hanoi, Vietnam. Of these patients, 270 (78.0%) were male, and their median age was 38 years (range: 17-84 years). Coinfection with HIV was found in 31 patients (9.0%).

#### Drug susceptibility profiles of MTB isolates

Sputum samples from 346 smear-positive patients were cultured, from which 339 MTB isolates (98.0%) were obtained. DST information for seven patients was not available. Among these, 127 (37.5%) were resistant to at least one of the four drugs tested; 93 (27.4%), 19 (5.6%), 96 (28.3%), and 11 (3.2%) isolates were resistant to INH, RMP, SM, and EMB, respectively; and 17 (5.0%) were multidrug-resistant (MDR) strains (Table 1). The PZase assay revealed that 8 (2.4%) of the 339 isolates were negative for PZase and were considered to be resistant to PZA (data not shown).

Eighty-eight INH-sensitive and 64 INH-resistant strains were randomly selected. LiPAs for RMP and INH were performed to confirm consistency with the results of culture-based DST and to identify profiles of genetic mutations associated with resistance to these drugs. Agreement between LiPAs and conventional DST was good or very good ( $\kappa = 0.80$  for RMP and  $\kappa = 0.84$  for INH 0.2  $\mu\text{g/mL}$ ; table not shown).

Mutations for RMP included *rpoB*:H526D, H526Y, S526D, and S531L. Only 11 isolates had one of these mutations, and 4 undefined RMP mutations were also observed in our study.

Mutations for INH were mostly *katG*:S315T (data not shown). This was more widely confirmed by subsequent DNA sequencing around the *katG* and *inh* genes (Additional file 1). LiPA for PZA was compared

**Table 1 Drug susceptibility profiles of MTB isolates from previously-untreated patients**

Patterns	n	% (95% CI)
Sensitive with all drugs	212	62.5 (57.3 - 67.5)
Any resistance	Subtotal	127
	INH	93
	RMP	19
	SM	96
	EMB	11
MDR	17	5.0 (3.2 - 7.9)

N = 339 isolates.  
 INH concentration (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ).

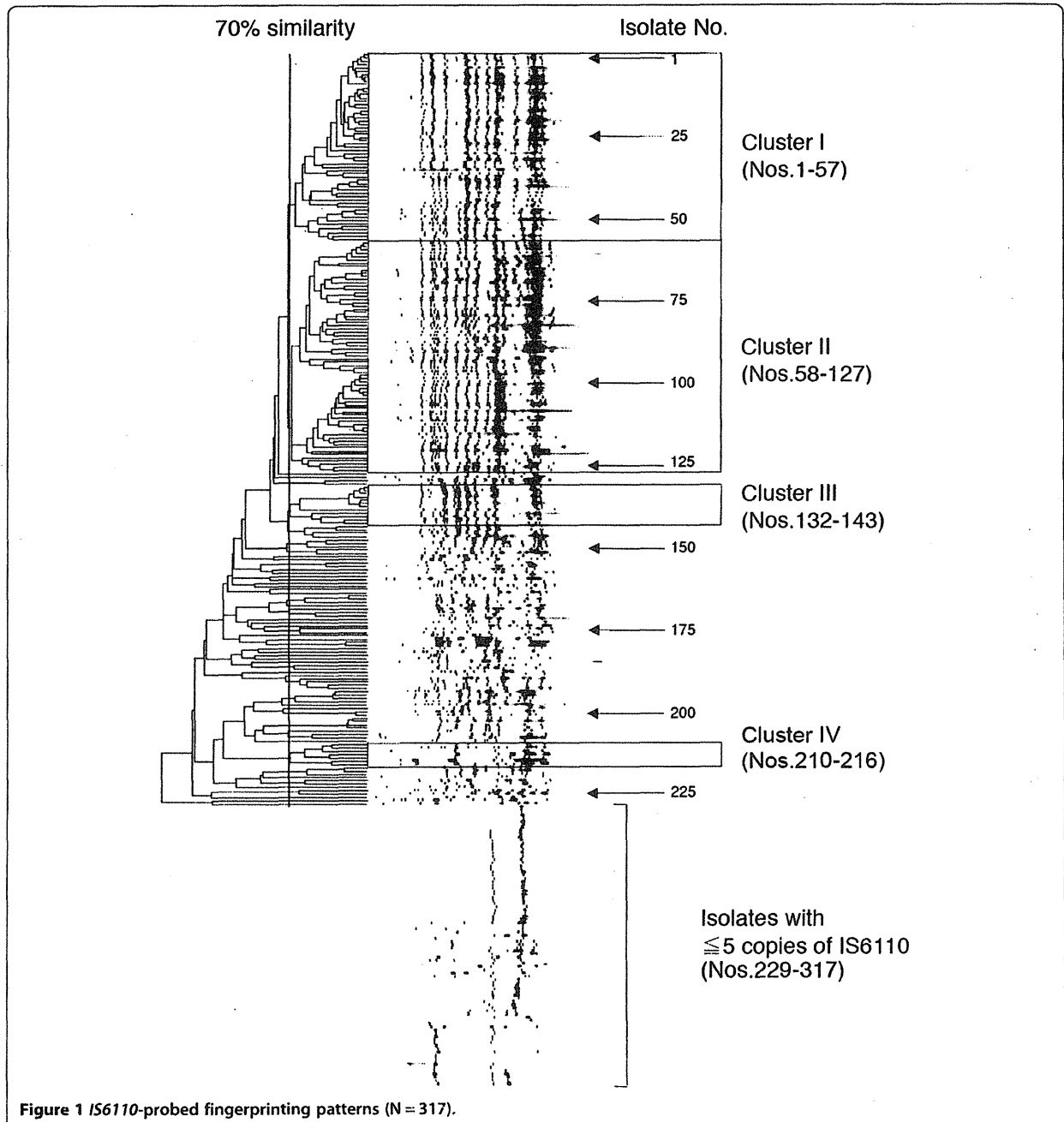
with the results of the PZase assay; their consistency was moderately high ( $\kappa = 0.55$ ; table not shown). LiPA for FQ identified only 1 mutated strain carrying *gyrA:A90V*.

#### IS6110-probed RFLP and drug susceptibility

Sufficient DNA was extracted from 317 of the 339 isolates. Their IS6110-probed fingerprinting patterns are shown in Figure 1. Four clusters were identified when defined by >70% similarity in their RFLP patterns. These

clusters accounted for 146 (46.1%) of the total isolates: 57 (18.0%) in cluster I; 70 (22.1%) in cluster II; 12 (3.8%) in cluster III; and 7 (2.2%) in cluster IV. Each cluster consisted of isolates collected from at least three districts in the city of Hanoi (data not shown).

Within these four clusters, 55 and 49 (37.7% and 33.6%) of the isolates were resistant to INH at 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively; these proportions were significantly higher than the 19.9% and 17.0% among the non-clustered isolates ( $P = 0.0004$  and  $P = 0.0006$ ,



respectively; Table 2). In fact, in the small clusters III and IV, the majority of the isolates were highly resistant to INH at 1.0 µg/mL (Additional file 1: Table S1). Although the proportions of isolates in these clusters that were resistant to RMP and other drugs also tended to be higher than those of non-clustered isolates, these differences were not significant, based on multiple comparisons statistical testing (Table 2). In addition, there were no significant associations between the clusters and specific *rpoB* mutations (data not shown).

#### Gene mutations responsible for INH resistance

Among all the INH-resistant isolates noted above, possible mutations within the *furA-katG* operon, the *fabG1-inhA* operon, and their upstream regions were investigated by PCR-based nucleotide sequencing (Additional file 1: Table S1).

Of 89 INH (0.2 µg/mL)-resistant isolates, 76 (85.4%) carried a g944c mutation (AGC to ACC) that caused an S315T amino acid substitution in the *katG* gene and 70 (92.1%) of the isolates that carried the g944c mutation were highly resistant to INH at 1.0 µg/mL. Furthermore, g204c mutations in the *furA* operon were detected in 13.6% of all the isolates and were frequently accompanied by the g944c mutation in the *katG* gene, although this variant itself was not directly associated with culture-based INH resistance ( $P = 0.072$ ; table not shown). In the upstream region of the *fabG1-inhA* operon, c-15t was observed in 7 isolates, and minor variations with <1% were observed within the *fabG1-inhA* operon. The combination of a g944c mutation in the *katG* gene with c-15t in the *inhA* promoter was observed only in 1 isolate.

#### Discussion

We investigated the drug susceptibility profiles of clinical isolates obtained from previously untreated patients with active pulmonary TB in Hanoi, the northern largest city in Vietnam, and found that a quarter of these isolates were highly resistant to INH, most of which had a

single S315T mutation in the *katG* gene. These isolates with primary resistance to INH were enriched in the clusters identified by RFLP. They probably originated from a few genetically related clones and were recently transmitted into and spread within this area of Vietnam.

Among the isolates with resistance to the first-line drugs tested in this study, a high proportion of primary INH resistance (27.4%) was rather characteristic. This resistance level was higher than the average (19.1%) obtained during a 2006 nation-wide survey [5]. Such a high level of primary resistance is a serious concern because INH is a key drug by which newly diagnosed TB patients can be successfully treated. In Vietnam, culture-based DST has not yet been routinely performed for previously untreated patients, and the standard regimen for these patients remained 2S(E)HRZ/6HE for a long time [20]. In the years when RMP-based treatment was not easily accomplished during the maintenance phase in areas with inadequate resources, this regimen had certain significance and was thus endorsed by the WHO until recently [21].

However, when DST results are unknown and the above standard regimen is used for INH-resistant TB, treatment during the maintenance phase is no more than EMB monotherapy, which could increase the chances of failure, early relapse, and additional drug resistance [21,22]. Prescribing 2RHEZ/4RHE, a regimen that includes 6 months of RMP, has also been recently approved by the national TB program in Vietnam. Because treatment outcomes are largely affected by locale-specific factors, including patient adherence to the regimen and drug resistance profiles of the prevailing strains, further studies will be needed to confirm the optimal regimens in Vietnam [23].

To reduce the likelihood of failure, relapse, and additional acquired drug resistance in major cities, updating clinical laboratories for DST is an urgent need [21]. In addition to DST for first-line drugs, detecting resistance to second-line drugs, including FQ, has also become important recently [24], although the proportion appeared to be low (<1%) in our study. Even in a resource-poor setting, as per timely DST results, health care staff should treat and intensively follow up those patients with drug-resistant TB with the aim of complete cure in most of these cases and to prevent further spread of MDR-TB and generation of extensively drug-resistant TB.

Genetic analysis of our MTB isolates demonstrated that >85% of the INH resistance (92% with high-level resistance) was caused by a S315T mutation in the *katG* gene. The predominance of this mutation in INH resistance has been observed in most of the areas with high TB prevalence, although the proportion (85%) in our study was relatively high compared with what was reported in other studies [25-27]. Continuous use of INH may cause additional mutations and induce higher levels

**Table 2 The relationship between drug resistance and clustering of the clinical isolates in Hanoi**

Resistant to	MTB isolates		P value*
	Clustered	Non-clustered	
	N = 146	N = 171	
INH (0.2 µg/mL)	55 (37.7%)	34 (19.9%)	0.0004
INH (1.0 µg/mL)	49 (33.6%)	29 (17.0%)	0.0006
RMP	13 (8.9%)	6 (3.5%)	0.0437
SM	49 (33.6%)	41 (24.0%)	0.0592
EMB	7 (4.8%)	4 (2.3%)	0.2338

\*P values by chi-square test.  $P < 0.01$  was regarded as statistically significant after considering multiple comparisons.

of resistance [27,28]. Rapid detection of INH resistance at an early phase is important to break this chain of acquiring additional resistance. Predominance of the S315T mutation is potentially advantageous for providing molecular DST in a resource-limited setting because it might entice manufacturers to develop a simplified, maintenance-free genetic test specialized for detecting the relevant mutations at a reasonably low cost [29].

RFLP analysis demonstrated that primary resistance to INH was more often observed in clustered isolates than in non-clustered isolates. Resistance to other drugs also appeared to be associated with these clustered isolates, although the tendencies were not as clear as that for INH. This indicates that expansion of INH-resistant isolates presumably originated from a few genetically related clones and that they were transmitted into the city of Hanoi and they spread widely within a relatively short period. Rapid expansion of genetically related strains may also explain why a single INH-resistant mutation, S315T, was predominantly detected in this area.

In our study, other genotype data for these clinical isolates were not available. However, in Vietnam, particularly in the southern region, two families of strains, designated the Beijing genotype and a presumably indigenous East-African Indian (EAI) genotype, are known to be predominant [30]. According to the literature, strains with  $\geq 15$  IS6110 copies may indicate typical Beijing strains [31], whereas most of the EAI strains in Vietnam have  $< 5$  copies [30]. The copy numbers and RFLP pattern profiles in large cluster II in our study were definitely consistent with those of Beijing strains, whereas approximately one-fourth of the isolates had a few copies that are observed in EAI. IS6110 copy numbers in other clusters were those between these two families. An earlier study demonstrated that copy numbers of northern strains in Vietnam were relatively smaller than those of southern strains in which typical Beijing genotypes are frequently observed [6]. We will need to further characterize the strains originating from the Hanoi area in future genotypic studies.

Our study had some limitations. The isolates analyzed in this study were collected from sputum smear-positive patients who visited TB clinics. Therefore, we may have only extracted features of MTB isolates from moderate to severe pulmonary TB cases. Nevertheless, understanding the current status of highly transmissible smear-positive TB is a priority for TB control because Vietnam is one of the high TB burden countries.

## Conclusions

High levels of primary resistance to INH and emerging RMP resistance may be closely related to the problems of a rapidly developing city, such as the distribution of young workers with low incomes, undernutrition, poor hygiene, and crowding in a densely populated urban area

with a floating population. Private acquisition and inappropriate use of anti-TB drugs through unofficial distribution routes are also difficult to manage in a large city such as Hanoi. It will be necessary to curb the transmission of drug-resistant MTB by considering effective counter measures. We will need to carefully monitor these trends further and search for the origins and transmission routes of these Southeast Asian MTB strains.

## Additional file

**Additional file 1: Table S1.** Drug susceptibility testing and DNA sequencing of *M. tuberculosis* clinical isolates (N = 317).

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

NVH supervised on-site implementation of this study and drafted and revised the manuscript. HA performed the experiments and participated in technical transfer and supervision. TTBT carried out the drug susceptibility tests. TK performed the experiments. NTLH supervised on-site implementation of this study and drafted and revised the manuscript. SS and PHT monitored on-site data collection. LTL conceived and supervised this study. NK conceived the study, analyzed and interpreted data, and drafted and revised the manuscript. All authors read and approved this manuscript.

## Authors' information

NVH is the head of the National Mycobacteria Reference Laboratory in the National Lung Hospital, Vietnam, and a senior expert on MTB. HA has extensive experience in MTB molecular analysis techniques. TTBT is the deputy head of the National Mycobacteria Reference Laboratory and has extensive experience in drug susceptibility testing. TK has experience in MTB molecular analysis techniques. NTLH has experience in clinical research. SS has experience in field studies. PHT is the director of the Hanoi Lung Hospital and is an expert on TB management. LTL is the vice director of the Hanoi Department of Health and is a senior expert on TB management. NK is the head of the Department of Pathophysiology and Host Defense, the Research Institute of Tuberculosis, Japan, and has experience in clinical research, data analysis, and TB control.

## Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Program of Japan Initiative for Global Research Network on Infectious Diseases (J-GRID), MEXT, Japan. The funder had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors would like to thank Dr. Bui Thi Nguyet, Ms. Vu Thi Xuan Thu, Dr. Pham Thu Anh (Hanoi Lung Hospital), Dr. Phan Thi Minh Ngoc, Ms. Nguyen Thi Ha (NCGM-BMH Medical Collaboration Center), and all healthcare staff of the relevant district TB centers for supporting site implementation.

## Author details

<sup>1</sup>Department of Microbiology, National Lung Hospital, 463 Hoang Hoa Tham, Hanoi, Vietnam. <sup>2</sup>National Center for Global Health and Medicine, Tokyo, Japan. <sup>3</sup>NCGM-Bach Mai Hospital Medical Collaboration Center, Hanoi, Vietnam. <sup>4</sup>Hanoi Lung Hospital, Hanoi, Vietnam. <sup>5</sup>Hanoi Department of Health, Hanoi, Vietnam. <sup>6</sup>Research Institute of Tuberculosis JATA, Tokyo, Japan.

Received: 3 May 2013 Accepted: 29 October 2013

Published: 5 November 2013

## References

1. Lew W, Pai M, Oxlade O, Martin D, Menzies D: Initial drug resistance and tuberculosis treatment outcomes: systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2008, **149**:123-134.



2. Kato-Maeda M, Metcalfe JZ, Flores L: Genotyping of *Mycobacterium tuberculosis*: application in epidemiologic studies. *Future Microbiol* 2011, **6**:203–216.
3. Sougakoff W: Molecular epidemiology of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2011, **17**:800–805.
4. World Health Organization: *Global tuberculosis report 2012*; 2012. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf), WHO/HTM/TB/2012.6.
5. World Health Organization: *Anti-tuberculosis drug resistance in the world, fourth global report*. WHO report; 2008. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO\\_HTM\\_TB\\_2008.394\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2008/WHO_HTM_TB_2008.394_eng.pdf), WHO/HTM/TB/2008.394.
6. Le TK, Bach KH, Ho ML, Lê NV, Nguyen TN, Chevrier D, Guesdon JL: Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Vietnam using IS6110 as probe. *Tuber Lung Dis* 2000, **80**:75–83.
7. Quy HT, Buu TN, Cobelens FG, Lan NT, Lambregts CS, Borgdorff MW: Drug resistance among smear-positive tuberculosis patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006, **10**:160–166.
8. Huong NT, Lan NT, Cobelens FG, Duong BD, Co NV, Bosman MC, Kim SJ, van Soolingen D, Borgdorff MW: Antituberculosis drug resistance in the south of Vietnam: prevalence and trends. *J Infect Dis* 2006, **194**:1226–1232.
9. Khuê PM, Phuc TQ, Hung NV, Jarlier V, Robert J: Drug resistance and HIV co-infection among pulmonary tuberculosis patients in Haiphong City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008, **12**:763–768.
10. *Guidelines for surveillance of drug resistance in tuberculosis*. 2nd edition. WHO report; 2003. <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241546336.pdf>, WHO/CDS/TB/2003.320.
11. Wayne LG: Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1974, **109**:147–151.
12. Sekiguchi J, Nakamura T, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae F, Kobayashi I, Augustynowicz-Kopec E, Zwolska Z, Morita K, Suetake T, Yoshida H, Kato S, Mori T, Kirikae T: Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant mycobacterium tuberculosis strains. *J Clin Microbiol* 2007, **45**:2802–2807.
13. van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD: Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991, **29**:2578–2586.
14. Otsuka Y, Parniewski P, Zwolska Z, Kai M, Fujino T, Kirikae F, Toyota E, Kudo K, Kuratsuji T, Kirikae T: Characterization of a trinucleotide repeat sequence (CGG)<sub>5</sub> and potential use in restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2004, **42**:3538–3548.
15. Rossau R, Traore H, De Beenhouwer H, Mijs W, Jannes G, De Rijk P, Portaels F: 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.
16. Ando H, Kondo Y, Suetake T, Toyota E, Kato S, Mori T, Kirikae T: Identification of *katG* mutations associated with high-level isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010, **54**:1793–1799.
17. Ando H, Mitarai S, Kondo Y, Suetake T, Kato S, Mori T, Kirikae T: Evaluation of a line probe assay for the rapid detection of *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol* 2011, **60**:184–188.
18. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, Small PM: Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993, **31**:406–409.
19. Warren RM, Richardson M, Sampson SL, van der Spuy GD, Bourn W, Hauman JH, Heersma H, Hide W, Beyers N, van Helden PD: Molecular evolution of *Mycobacterium tuberculosis*: phylogenetic reconstruction of clonal expansion. *Tuberculosis (Edinb)* 2001, **81**:291–302.
20. Huong NT, Duong BD, Co NV, Quy HT, Tung LB, Bosman M, Gebhardt A, Velema JP, Broekmans JF, Borgdorff MW: Establishment and development of the National Tuberculosis Control Programme in Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005, **9**:151–156.
21. *Treatment of tuberculosis: Guidelines*. 4th edition. WHO report; 2009. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547833_eng.pdf), WHO/HTM/TB/2009.420.
22. Menzies D, Benedetti A, Paydar A, Martin I, Royce S, Pai M, Vernon A, Lienhardt C, Burman W: Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2009, **6**:e1000146.
23. Quy HT, Cobelens FG, Lan NT, Buu TN, Lambregts CS, Borgdorff MW: Treatment outcomes by drug resistance and HIV status among tuberculosis patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006, **10**:45–51.
24. Kiet VS, Lan NT, An DD, Dung NH, Hoa DV, van Vinh Chau N, Chinh NT, Farrar J, Caws M: Evaluation of the MTBDRsl test for detection of second-line-drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2010, **48**:2934–2939.
25. Minh NN, Van Bac N, Son NT, Lien VT, Ha CH, Cuong NH, Mai CT, Le TH: Molecular characteristics of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Vietnam. *J Clin Microbiol* 2012, **50**:598–601.
26. Mathuria JP, Nath G, Samaria JK, Anupurba S: Molecular characterization of INH-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates by PCR-RFLP and multiplex-PCR in North India. *Infect Genet Evol* 2009, **9**:1352–1355.
27. Zhang M, Yue J, Yang YP, Zhang HM, Lei JQ, Jin RL, Zhang XL, Wang HH: Detection of mutations associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *J Clin Microbiol* 2005, **43**:5477–5482.
28. Piatek AS, Telenti A, Murray MR, El-Hajj H, Jacobs WR Jr, Kramer FR, Alland D: Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:103–110.
29. Moore DA, Shah NS: Alternative methods of diagnosing drug resistance—what can they do for me? *J Infect Dis* 2011, **204**(Suppl 4):S1110–S1119.
30. Buu TN, van Soolingen D, Huyen MN, Lan NT, Quy HT, Tiemersma EW, Kremer K, Borgdorff MW, Cobelens FG: Increased transmission of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with resistance to streptomycin: a population-based study. *PLoS One* 2012, **7**:e42323.
31. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikhan D, Nymadawa P, van Embden JD: Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995, **33**:3234–3238.

doi:10.1186/1756-0500-6-444

Cite this article as: Hung et al.: Clonal expansion of *Mycobacterium tuberculosis* isolates and coexisting drug resistance in patients newly diagnosed with pulmonary tuberculosis in Hanoi, Vietnam. *BMC Research Notes* 2013 **6**:444.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## 第88回総会ミニシンポジウム

## Ⅲ. 合併症を有する結核治療

座長<sup>1</sup>阿部 聖裕<sup>2</sup> 藤田 明

キーワード：結核，HIV，関節リウマチ，肝障害，慢性腎障害

シンポジスト：

## 1. HIV合併結核

青木孝弘（国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター）

## 2. 生物学的製剤使用者関節リウマチ（RA）患者の結核治療

吉永泰彦（倉敷成人病センター リウマチ膠原病センター）

## 3. 肝疾患・肝障害患者の結核

佐々木結花（結核予防会複十字病院呼吸器内科）

## 4. 腎疾患・透析患者の結核

高森幹雄（東京都立多摩総合医療センター呼吸器内科）

わが国の2011年の結核罹患率は、人口10万人対17.7人で、他の先進国の多くが5前後であるのに比べると未だ高く中蔓延国の状況である。

結核対策の基本は早期発見、適切な治療であるということ疑いのないことである。現在の結核医療の問題点として、都市部に集中する患者発症、外国人の結核、社会的弱者における結核、院内・施設内の集団感染等の社会的側面と、高齢者結核、HIV合併結核、多剤耐性菌・超多剤耐性菌による結核、生物学的製剤を用いる患者の結核感染対策などの医学的側面が挙げられる。またHIV合併結核、生物学的製剤を使用するリウマチ患者に加え、肝疾患や透析など腎障害を有する患者への適切な治療や抗結核薬使用時における副作用対策は医療者を悩ます重要な問題である。

今回のミニシンポジウムでは、臨床上重要と思われるいくつかの「合併症を有する結核治療」について4人の

先生方から専門的な立場で現状や問題点を検討し提言をいただいた。

最初に国立国際医療研究センターの青木孝弘先生から「HIV合併結核」について、わが国におけるHIV/AIDS患者の現状、HIV感染者に発症した結核治療の問題点である薬剤の副作用、抗HIV薬と抗結核薬の相互作用、抗HIV薬の開始時期と免疫再構築症候群などに関して自験例も交えてご講演をいただいた。

次に倉敷成人病センターの吉永泰彦先生から「生物学的製剤使用者関節リウマチ（RA）患者の結核治療」に関して、RAの薬物療法の進歩とRAに合併する結核の特徴、生物学的製剤使用RA患者と未使用RA患者の結核標準化罹患率の違い、各種生物学的製剤の結核発症のリスクの違い、生物学的製剤投与中に発症した結核の特徴、RA患者の結核治療の問題点とその対応についてご講演をいただいた。

さらに結核予防会複十字病院の佐々木結花先生に「肝疾患・肝障害患者の結核」について、肝疾患の現状と免疫低下のメカニズム、結核治療における肝障害発症の頻度、また肝硬変や肝炎ウイルス感染例における結核発症のリスクや予後および合併症による抗結核薬での副作用出現の頻度など自験例も含めてご講演いただいた。

最後に東京都立多摩総合医療センター呼吸器内科の高森幹雄先生に「腎疾患・透析患者の結核」について、血液透析患者における結核罹患率など疫学的な現状、発症のリスク要因、糖尿病の腎疾患への関わり、血液透析を要した結核患者自験例の臨床的検討、透析患者での抗結核薬使用法や管理のポイントなどをご講演いただいた。

結核患者は何らかの基礎疾患を有していることが多く、また抗結核薬による肝障害や腎障害などの副作用も

<sup>1</sup>独立行政法人国立病院機構愛媛病院呼吸器科，<sup>2</sup>東京都保健医療公社多摩北部医療センター呼吸器科

連絡先：阿部聖裕，独立行政法人国立病院機構愛媛医療センター，〒791-0281 愛媛県東温市横河原366

(E-mail: mabe@ehime-nh.go.jp)

(Received 17 Sep. 2013)

懸念される。このミニシボジウムは結核治療にたずさわっている医師をはじめ多くの医療関係者に必ずや有用

なものになると確信できるものであった。

## 1. HIV合併結核

国立国際医療研究センター エイズ治療・研究開発センター 青木 孝弘

### 1. はじめに

本邦における結核罹患率は、人口10万人対で17.7人(2011年)と漸減傾向ではあるが、他の先進国の多くが5前後であるのに比べると未だ高値である<sup>1)</sup>。また、HIV/AIDS患者数は、1529例(2011年)で、過去最高を記録した2008年の1557例と比較し横ばいである<sup>2)</sup>。一方、AIDS発症者は473例(2011年)と過去最多となっており、免疫不全が進行した状態でHIV感染が判明する症例が増加している。このような本邦の状況を鑑みると、HIV合併結核患者数は、今後増加することも考えられる。

結核菌に曝露した場合、HIV感染者ではその発症率は年に5~10%と推定されており、HIV非感染者が生涯で5~10%の発症率であることと比べると非常に高い。また、HIV感染者の結核による死亡率は、HIV非感染症例の約5倍と高値である。HIV感染者では結核の発症率と重症化率が有意に高いため、HIV感染者において結核を早期に発見することが結核の蔓延の予防につながると考えられる。

本稿では、海外のHIVガイドラインに言及しながら、HIV感染者における結核症の治療を中心に概観する。

### 2. HIV合併結核の診断

結核診断の原則は、非HIV感染者の場合同様に結核菌の証明である。HIV感染者は、結核の発症率が高いことに加え臨床像が非典型的であることが多いため、常に結核の感染を疑う必要がある。HIV感染者では、喀痰の塗抹陽性率は50%程度と高くなく、非HIV感染者では比較的まれである血液や糞便などから結核菌が検出されることがある。また、HIV感染者では肺外結核が多いことも特徴の一つである。

HIV感染症の有無が不明の結核患者で、HIV感染症のスクリーニング検査を施行するかどうかについては、米国では2006年に米国疾病予防管理センター(CDC)が、結核を治療する全患者でHIVスクリーニング検査を行うことを推奨している<sup>3)</sup>。米国では結核患者の7.7%がHIV陽性であったのに対し<sup>4)</sup>、本邦では0.7%と報告されており<sup>5)</sup>、米国と本邦では、結核患者におけるHIV陽性率が大きく異なっている。そのため、本邦で結核患者に対し

HIV感染症のスクリーニング検査を行う可否については、患者の居住地、年齢、社会背景などを考慮のうえ施行の可否を判断すべきと考える。

### 3. HIV合併結核の治療

結核菌が耐性菌でなければ、HIV患者でも抗結核薬治療への反応は良好で、治療は非HIV患者と差はない。治療方法は、イソニアジド(INH)+リファンピシン(RFP)またはリファブチン(RFB)+エタンブトール(EB)+ピラジナミド(PZA)を2カ月施行し、その後INH+RFP(RFB)を4カ月投与する標準治療でよいと考えられている<sup>6)</sup>。一方で、標準治療では、結核の再燃率が有意に高いとの報告もあり<sup>7)</sup>、治療に反応の悪い患者や排菌が3カ月以上持続する患者では、治療期間の延長を考慮する。間欠治療も再燃率が高いため、一般的には行わない<sup>8)</sup>。

### 4. 抗HIV療法の開始時期

抗HIV療法が施行されている患者が、結核を発症した場合には、現在施行されている抗HIV療法が有効であることを確認したうえで抗HIV療法を継続しながら、抗結核療法を開始する。なお、抗結核療法の導入が抗HIV薬との薬物相互作用で困難な症例では、抗HIV療法の変更を考慮する。

抗HIV療法が未導入の患者で、抗結核薬開始後どの程度期間をあけて抗HIV療法を開始するかについては、2010年から11年にかけて3つの臨床試験(SAPiT, CAMELIA, STRIDE)の結果が公表され、早期に抗HIV療法を開始すると、免疫再構築症候群(IRIS)の頻度が上昇するが、死亡や他のAIDS指標疾患の発症を抑制できることが示された<sup>9-11)</sup>。

こうした臨床試験の結果を受けて、結核を発症した患者では、抗HIV療法を早期導入する流れとなった。2012年版の米国保健福祉省(DHHS)のガイドラインでは、結核診断時に抗HIV療法を導入していないHIV合併結核患者では、CD4数が50/ $\mu$ L未満であれば、抗結核療法開始から2週間以内の抗HIV療法開始が推奨されるようになった<sup>10)</sup>。CD4数が50/ $\mu$ L以上の場合、全身状態が重症であれば結核治療開始から2~4週以内に、重症でなければ8~12週以内の開始が推奨されている(Table

1). ヨーロッパ HIV 臨床協会 (EACS) と英国 HIV 協会 (BHIVA) のガイドラインでは、CD4 数  $100/\mu\text{L}$  未満では 2 週間以内、 $100\sim 350/\mu\text{L}$  では可能なかぎり早期導入が望ましいが、開始後 2 カ月までは待ってもよいとされている。CD4 値  $350/\mu\text{L}$  以上では主治医判断とされている<sup>11) 12)</sup> (Table 2)。

海外のガイドラインでは、早期の抗 HIV 療法開始が推奨されているが、実際には、抗結核療法のみを施行の段階ですら、有害事象で投薬を中止せざるをえないことがしばしば生じる。CD4 数にかかわらず抗結核薬と抗 HIV 薬の併用が有害事象等で困難な場合は、慎重に経過観察を施行しながら結核の治療を優先し、4 剤治療が終了後に抗 HIV 療法を考慮してもよい。

### 5. 抗結核治療と抗 HIV 療法の薬物相互作用

抗 HIV 薬と抗結核薬の相互作用に関しては、リファマイシン系の薬剤 (RFP, RBT) と抗 HIV 薬の併用が問題となる。リファマイシン系の薬剤はチトクローム P450 (CYP) を誘導する薬剤で、その中でも CYP3A4 の誘導作用が強い。非核酸系逆転写酵素阻害剤 (NNRTI) とプロテアーゼ阻害剤 (PI) は CYP3A4 で代謝されるため、リファマイシン系の薬剤との併用で血中濃度が低下する。リファマイシン系の薬剤の中でも RBT は CYP3A4 の誘導作用が弱いため、PI との併用の際には RBT を用いる。RBT の用量は、抗 HIV 薬と併用する際には、DHHS のガイドラインでは、 $150\text{ mg/日}$ <sup>9)</sup>、BHIVA と EACS のガイドラインでは、 $150\text{ mg/日}$  週 3 回が推奨されている<sup>9) 10)</sup>。NNRTI については、エファビレンツ (EFV) は RFP との

併用が可能であるが、EFV の血中濃度を測定するなどの注意が必要である。インテグラーゼ阻害剤 (INSTI) であるラルテグラビル (RAL) は、UGT1A1 によるグルクロン酸抱合により代謝を受ける。RAL は RFP の UGT1A1 誘導により血中濃度が低下するため、通常用量の 2 倍である  $800\text{ mg}$  1 日 2 回投与が推奨されている。RBT と併用する場合は RAL の用量調節は不要である。抗 HIV 薬とリファマイシン系の薬物との併用について DHHS ガイドラインでの推奨を Table 3 に示した。

### 6. 抗結核薬の有害事象

抗結核薬の有害事象の頻度に関しては、当センターで結核治療を導入した HIV 合併結核患者 129 例で、抗結核薬で有害事象を生じた症例は 70 例 (54.3%) であった。その内訳は、INH 13.4%、RFP 26.1%、RBT 17.6%、EB 14.3%、PZA 18.1%、およびキノロン 21.2% (重複あり) と、RFP が最も多かった。抗 HIV 療法と抗結核療法の併用の際には、6 剤以上の併用となるため、有害事象が生じた際に原因薬物の同定が困難となり全薬剤をいったん中止せざるをえなくなる症例をしばしば経験する。

### 7. 免疫再構築症候群 (IRIS)

抗 HIV 療法を導入すると免疫力が上がり、逆に日和見感染症が増悪する IRIS と呼ばれる病態が知られている。早期に抗 HIV 療法を開始した場合には、結核が IRIS で一時的に増悪することがある<sup>13)</sup>。IRIS を生じた場合には、抗結核薬は継続しながら、抗炎症薬や副腎皮質ステロイド剤の投与や抗 HIV 療法の一時的中止を行う。

Table 1 Timing of initiation of ART during tuberculosis therapy in DHHS guideline

CD4 cell count (cells/ $\mu\text{L}$ )	When to start antiretroviral therapy
CD4 < 50	ART should be initiated within 2 weeks
CD4 $\geq$ 50, severe condition	ART should be initiated within 2 to 4 weeks
CD4 $\geq$ 50	ART can be delayed beyond 2 to 4 weeks of starting TB therapy but should be started within 8 to 12 weeks of TB therapy initiation
Pregnant women	ART should be started as early as feasible
Patients with documented MDR and XDR	ART should be initiated within 2 to 4 weeks of confirmation of TB drug resistance and initiation of second-line TB therapy

Severity was determined by clinical evaluation (including low Karnofsky score, low body mass index [BMI], low hemoglobin, low albumin, organ system dysfunction, or extent of disease)  
ART: antiretroviral therapy, MDR: multidrug-resistant, XDR: extensively drug-resistant

Table 2 Timing of initiation of ART during tuberculosis therapy in the BHIVA and EACS guidelines

CD4 cell count (cells/ $\mu\text{L}$ )	When to start antiretroviral therapy
CD4 < 100	As soon as practical within 2 weeks after starting TB therapy
100-350	As soon as practical, but can wait until after completing 2 months' TB treatment, especially when there are difficulties with drug interactions, adherence and toxicities
CD4 > 350	At physician's discretion

Table 3 Drug interactions between antiretroviral drugs and rifamycins in DHHS guideline (March 2013)

CD4 cell count (cells/ $\mu$ L)	Rifabutin	Rifampicin
Protease Inhibitors		
ATVr, ATV, DRVr, FPVr, FPV	150 mg/day, 300 mg three times a week.	Do not co-administer.
Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors		
EFV	Rifabutin 450–600 mg once daily or 600 mg three times a week if EFV is not co-administered with a PI.	Maintain EFV dose at 600 mg once daily and monitor for virologic response. Consider therapeutic drug monitoring. Some clinicians suggest EFV 800 mg dose in patients who weigh more than 60 kg.
ETR	Rifabutin 300 mg once daily if ETR is not coadministered with an RTV-boosted PI. If ETR is used with an RTV-boosted PI, rifabutin should not be co-administered.	Do not co-administer.
NVP	No dosage adjustment necessary.	Do not co-administer.
RPV	Do not co-administer.	Do not co-administer.
Integrase Inhibitor		
RAL	No dosage adjustment necessary.	RAL 800 mg BID.
EVG/COBI/TDF/FTC	Do not co-administer.	Do not co-administer.

当院のHIV合併結核患者で、結核発症時に抗HIV療法を施行しておらず、抗結核治療導入後に抗HIV療法の導入を確認できた症例74例のうち、IRISを生じた症例は5例(6.8%)であった。5例中2例では抗HIV療法を中断する必要があり、4例でステロイドの使用を認めた。5例ともHIVと結核の経過は良好であった。IRISを生じた症例と生じなかった症例を比較検討すると、生じた症例群で、有意にCD4数が低く、HIV-RNA量が高いことが判明したが、症例数が少なく、さらなる症例の集積を要すると思われる。

#### 8. HIV合併結核の治療の実際

耐性菌でないかぎり結核治療への反応は非HIV患者と変わらないので、標準的な抗結核治療〔HREZ (INH + RFP + EB + PZA) など〕を導入する。治療期間は、2HREZ + 4HR (E) でよいが、排菌陰性化まで時間を要した症例などは、治療期間の延長を考慮する。

4剤での初期強化結核治療中にARTを開始すると、高率に薬剤アレルギーや肝腎機能障害などで治療中断となるため、可能であれば4剤治療終了後に抗HIV療法の導入が望ましい。

抗HIV療法の中断・再開の可能性が高い症例では、EFVとRALの投与は抗HIV薬の中断による耐性獲得のリスクが高いため、プロテアーゼ阻害剤の使用が望ましい。

以上をまとめると、下記の治療から患者の種々の状態に合わせて治療薬を選択することが望ましいと考える。

2HREZ終了後に抗HIV療法を開始  
 $\Rightarrow$  4HR (RFB150 mg/日または150 mg/日週3回) + NRTI + PI

$\Rightarrow$  4HR (RFP通常用量) + NRTI + RAL (800 mg 1日2回, 通常用量の倍量)  
 $\Rightarrow$  4HR (RBT 150 mg/日または150 mg/日週3回) + NRTI + RAL (400 mg 1日2回, 通常用量)  
 $\Rightarrow$  4HR (RFP通常用量) + NRTI + EFV (600または800 mg 1日1回)

#### 9. 治療の経過と予後

当センターのHIV合併結核患者129例の結核の経過はおおむね良好で、結核を直接の原因とする死亡の症例はなかった。経過中に死亡した7例はいずれも、結核以外のエイズ関連疾患での死亡であった。海外でのHIV合併結核患者の死亡率は20~30%程度と高率であるのに対し、当センターでのHIV合併結核患者の予後は良好で、結核による死亡例は存在しなかった。これは、本邦における医療機関へのアクセシビリティの良さやテトラメドな医療によると考えられる。

#### 文 献

- 1) 平成23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/kekaku-kansenshou03/11.html>
- 2) 平成23年エイズ発生動向年報 [http://api-net.jfap.or.jp/status/2011/11nenpo/nenpo\\_menu.htm](http://api-net.jfap.or.jp/status/2011/11nenpo/nenpo_menu.htm)
- 3) Branson BM, Handsfield HH, Lampe MA, et al.: Revised Recommendations for HIV Testing of Adults, Adolescents, and Pregnant Women in Health-Care Settings. MMWR Recomm Rep. 2006; 55 (RR-14): 1-17; quiz CE1-4.
- 4) Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Trends in tuberculosis—United States, 2012. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2013; 62 (11): 201-5.

- 5) Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. [http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/adult\\_oi.pdf](http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/adult_oi.pdf)
- 6) Nahid P, Gonzalez LC, Rudoy I, et al.: Treatment Outcomes of Patients with HIV and Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 1199-1206.
- 7) Havlir DV, Kendall MA, Ive P, et al.: Timing of antiretroviral therapy for HIV-1 infection and tuberculosis. *N Engl J Med.* Oct 20 2011; 365: 1482-1491.
- 8) Blanc FX, Sok T, Laureillard D, et al.: Earlier versus later start of antiretroviral therapy in HIV-infected adults with tuberculosis. *N Engl J Med.* 2011; 365: 1471-1481.
- 9) Abdool Karim SS, Naidoo K, Grobler A: Integration of antiretroviral therapy with tuberculosis treatment. *N Engl J Med.* 2011; 365: 1492-501.
- 10) The Department of Health and Human Services (DHHS): Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in HIV-1-Infected Adults and Adolescents. March 27, 2012. <http://www.aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adultandadolescentgl.pdf>
- 11) British HIV Association (BHIVA): British HIV Association guidelines for the treatment of HIV-1-positive adults with antiretroviral therapy 2012. [http://www.bhiva.org/documents/Guidelines/Treatment/2012/hiv1029\\_2.pdf](http://www.bhiva.org/documents/Guidelines/Treatment/2012/hiv1029_2.pdf)
- 12) European AIDS Clinical Society (EACS): EACS Guidelines version 6.1. November 2012. <http://www.europeanaidssociety.org/images/stories/EACS-Pdf/EACSGuidelines-v6.1-English-Nov2012.pdf>
- 13) Narita M, Ashkin D, Hollender ES, et al.: Paradoxical worsening of tuberculosis following antiretroviral therapy in patients with AIDS. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 158: 157-61.

## 2. 生物学的製剤使用者関節リウマチ (RA) 患者の結核治療

倉敷成人病センターリウマチ膠原病センター 吉永 泰彦

### はじめに

関節リウマチ (RA) の薬物療法は近年、急速に進歩している。欧米から10年以上遅れたが、わが国でも1999年よりメトトレキサート (MTX) が、2003年より抗TNF抗体であるインフリキシマブ (IFX) が承認され、これらの薬剤を早期から積極的に使用することによって骨関節破壊の進行が阻止され、真の寛解が得られることも稀ではなくなった。一方、生物学的製剤治療、とくにTNF阻害療法により結核が増加することを、われわれは第84回本学会総会で報告した<sup>1)</sup>。その後もRA治療に新た

な生物学的製剤が登場しており、2013年現在わが国でRA患者に市販されている生物学的製剤は、抗TNF抗体であるインフリキシマブ (IFX)、アダリムマブ (ADA)、ゴリムマブ (GLM)、セルトリズマブ・ペゴル (CZP)、可溶性TNF受容体Ig融合蛋白であるエタネルセプト (ETN)、抗インターロイキン6 (IL-6) 受容体抗体であるトシリズマブ (TCZ) と、T細胞選択的共刺激調節剤であるアバタセプト (ABT) の7剤である (表1)。RA患者における結核罹患率の前向き調査を継続し、その推移を検討し、生物学的製剤4剤 (IFX, ETN, ADA, TCZ) の全例市販後調査から、各薬剤の結核発症のリスクの比

表1 日本で市販される関節リウマチに対する生物学的製剤

一般名	商品名	標的	半減期 (H)	日本での承認年	投与方法	投与量	投与間隔	MTX併用	
抗TNF $\alpha$ 抗体									
キメラ型	インフリキシマブ (IFX)	レミケード <sup>®</sup>	TNF $\alpha$	8~10	2003	点滴	3~10 mg/kg	8週毎	必須
ヒト型	アダリムマブ (ADA)	ヒュミラ <sup>®</sup>		10~14	2008	皮下注	40/80 mg	2週毎	推奨
ヒト型	ゴリムマブ (GLM)	シンボニー <sup>®</sup>		12~13	2011	皮下注	50/100 mg	4週毎	推奨
PEG化	セルトリズマブ・ペゴル (CZP)	シムジア <sup>®</sup>		10~13	2012	皮下注	200/400 mg	2/4週毎	推奨
可溶性TNF受容体	エタネルセプト (ETN)	エンブレル <sup>®</sup>	TNF $\alpha/\beta$	3~5.5	2005	皮下注	25 mg	週1/2回	推奨
抗IL-6受容体抗体									
ヒト化	トシリズマブ (TCZ)	アクテムラ <sup>®</sup>	IL-6	5.5~10	2008	点滴	8 mg/kg	4週毎	不要
						皮下注	162 mg	2週毎	
抗T細胞	アバタセプト (ABT)	オレンシア <sup>®</sup>	T細胞	12~13	2010	点滴	10 mg/kg	4週毎	推奨
						皮下注	125 mg	毎週	

較を行い、生物学的製剤投与中に発症した結核の特徴と、結核治療の問題点を明らかにした。

### RA患者に合併した結核

われわれは、RA患者に合併した結核の特徴を検討した<sup>2)</sup>。結核を合併したRA患者を一般RA患者と比較すると、結核は高齢で、罹病期間の長いRA患者に合併しやすく、ステロイド剤使用例に多く、抗リウマチ薬使用例に少ないことが判明した。結核を合併したRA患者を一般結核患者と比較すると、RA患者の結核は女性に多く、喀痰培養陽性率が低いこと、肺結核は少なく、粟粒結核を含む肺外結核が多いことが明らかになった。

### RA患者における結核の頻度とその推移 —NinJaのデータより

われわれは、一施設における新規結核入院患者に占めるRA患者の割合と一般人口に占めるRA患者の頻度から、RA患者では一般人に比べ、結核の合併率が約3倍高いと推定した<sup>2)</sup>。これを確認するために、国立病院機構免疫異常ネットワークリウマチ部門 (iR-net) を中心とした本邦初の全国規模リウマチ性疾患データベース (NinJa)<sup>3)</sup> を利用して全国34施設から患者情報を収集し、RA患者の結核標準化罹病率 (Standardized Incidence Ratio: SIR) を前向きに解析した。

2003～2004年度の2年間のNinJa登録の生物学的製剤未使用RA患者7,832例 (男性1,309例, 女性6,523例, 平均61.0±12.0歳) 中、7例に結核 (肺結核5例, 肺外結核2例) が発症し、結核のSIRは3.98 (95%CI: 1.22～6.74) と、われわれの見積もりよりやや高く、男女別にみると、男性1.46 (0～4.32), 女性5.12 (1.02～9.21) と、女性で有意に高率であった。

その後もNinJaを利用した結核発症の前向き調査を継続しており、2003～2011年度9年間分でRA患者55,003人年分のデータが収集され、生物学的製剤投与例が12.9%含まれたが、結核発症は肺結核37例, 肺外結核9例の46症例であり、結核のSIRは3.99 (2.84～5.15), 男

女別にみると、男性3.09 (1.48～4.72), 女性4.57 (2.99～6.15) であった (表2)。ETN投与中に3例, IFX, ADA投与中に各1例ずつの結核発症を認めしたが、全例抗結核薬投与にて治癒した。2003～2011年度9年間のNinJa登録RA患者の結核のSIR 3.99 (2.84～5.15) は、2003～2004年度の2年間のNinJa登録の生物学的製剤未使用RA患者の結核のSIR 3.98 (1.22～6.74) に比べ増加はなかった。リウマチ医の間では、生物学的製剤による結核発症のリスクが熟知され、その導入時には日本リウマチ学会が作成したガイドライン<sup>4)</sup>に沿って、結核のスクリーニングや予防投与が実施されていることが奏効しているものと思われる。

### 生物学的製剤と結核—市販後調査成績より

抗TNF抗体であるIFXとADA, 可溶性TNF受容体Ig融合蛋白であるETN, 抗IL-6受容体抗体であるTCZの各市販後全例調査成績より結核のSIRを求め、2003～2004年度のNinJa登録TNF阻害療法未施行RAの結核のSIRと比較検討した。

各市販後調査によれば、IFX投与患者5,000例 (男性1,050例, 女性3,950例) 中14例の結核 (肺結核7例, 肺外結核7例) が発症し、IFXの結核のSIRは34.4 (22.2～46.6), ETN投与患者13,894例 (男性2,580例, 女性11,314例) 中10例の結核 (肺結核6例, 肺外結核4例) が発症し、ETNの結核のSIRは8.21 (4.76～11.7), ADA投与患者7,740例 (男性1,352例, 女性6,388例) 中9例の結核 (肺結核4例, 肺外結核5例) が発症し、ADAの結核のSIRは13.6 (7.59～19.7), TCZ投与患者7,901例 (男性1,456例, 女性6,445例) 中5例の結核 (肺結核4例, 肺外結核1例) が発症し、TCZの結核のSIRは8.01 (3.25～12.8) であった (表3)。

生物学的製剤4剤の各市販後全例調査により求めた結核のSIRはIFX 34.4 > ADA 13.6 > ETN 8.21 > TCZ 8.01となり、生物学的製剤未使用RA患者のSIR 3.98と比較すると、各々8.6倍, 3.4倍, 2.1倍, 2.0倍と、とくに抗TNF抗体製剤で高率であった。また、肺外結核の割合は、ADA

表2 9年間のNinJa登録RA患者の結核の標準化罹病率 (SIR) の推移

	患者数			薬剤使用率 (%)		結核発症数			結核SIR (95% CI)		
	RA男	RA女	RA男女	生物学的製剤	MTX	RA男	RA女	RA男女	RA男	RA女	RA男女
2003～05年度	2,221	10,615	12,836	2.37	39.5	1	11	12	0.84 (0-2.48)	5.67 (2.32-9.03)	3.83 (1.66-6.00)
2006～08年度	3,122	14,146	17,268	10.7	49.0	10	7	17	7.18 (2.73-11.64)	3.22 (0.83-5.61)	4.77 (2.50-7.03)
2009～11年度	4,638	20,261	24,899	19.8	58.3	3	14	17	1.62 (0-3.46)	4.69 (2.23-7.15)	3.52 (1.85-5.19)
2003～11年度	9,981	45,022	55,003	12.9	51.0	14	32	46	3.09 (1.48-4.72)	4.57 (2.99-6.15)	3.99 (2.84-5.15)

55.6 > IFX 50 > ETN 40 > TCZ 20%で、2003～2011年度9年間のNinJa登録RA患者の19.6%、生物学的製剤未使用RA患者の28.6%に比し、TNF阻害剤で高率であった。

#### 生物学的製剤使用RA患者の結核治療とその問題点

NinJa登録RA患者のうちで新規に結核を発症した46例および上記生物学的製剤4剤の市販後全例調査で新規に結核を発症した38例とも、全例、抗結核剤投与により回復した。

図は67歳男性の胸部X線とCT画像である。5カ月前より多関節痛が持続するためA病院を受診し、RAと診断され、4カ月前にMTX 4 mg/週とADA 40 mg/2週が導入された。1カ月前より発熱、腹部膨満感が出現し、B医院を受診。超音波検査で腹水を指摘されC外科病院に

紹介入院となった。腹部CTで、左胸水、憩室、下行結腸の炎症、腹水貯留を認め、憩室炎+腹膜炎を疑われて抗生物質投与を受けたが解熱せず。汎発性腹膜炎を疑われ、当院内科転入院となった(図A, A1-3)。抗生剤投与が継続されたが解熱せず、入院1カ月後に当科コンサルトされた。再検した胸部X線・CT(図B, B1-3)にて両少量胸水+両肺微小結節影を認め、クオンティフェロンTB-G 1.28 IU/mlと陽性で、喀痰より抗酸菌塗抹ガフキー8号、TB-PCR陽性であり、播種性結核(肺+胸膜膜炎)と診断し、結核専門病院に転院した。

RAの診断1カ月後に生物学的製剤が導入され、その3カ月で結核性腹膜炎を発症した症例である。発症後前医で1カ月、当院でさらに1カ月、計2カ月診断が遅れた。近年、RA診断早期よりRAの寛解を目指して、MTX

表3 RAに対する各種生物学的製剤の市販後調査からみた結核発症

全例市販後調査	結核患者数 /患者総数	結核患者数 /10万人・年	結核 SIR	(95%CI)	肺外結核 (%)
インフリキシマブ (IFX)	14/5,000	560	34.4	(22.2-46.6)	50
エタネルセプト (ETN)	10/13,894	144	8.21	(4.76-11.7)	40
アダリムマブ (ADA)	9/7,740	241	13.6	(7.59-19.7)	55.6
トシリズマブ (TCZ)	5/7,901	127	8.01	(3.25-12.8)	20
2003～04年度NinJa登録 生物学的製剤非使用RA患者	7/7,832	89.4	3.98	(1.22-6.74)	28.6

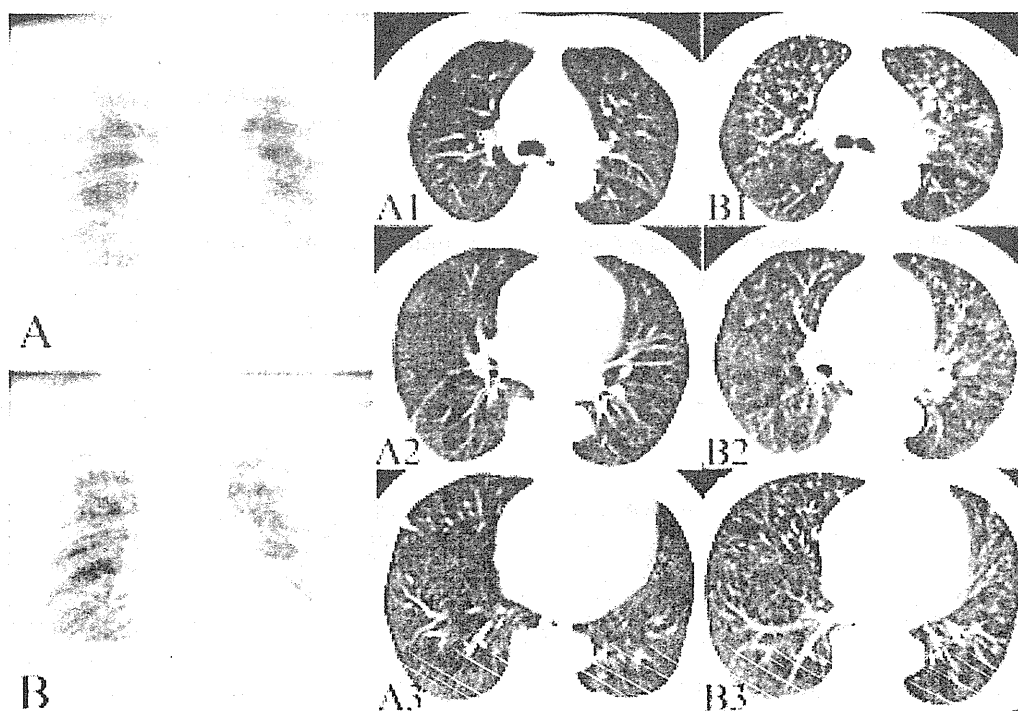


図 腹膜炎で内科に入院した67歳男性RA患者の胸部X線・CT所見

A: 当院内科入院時の胸部X線。A1-3: 同日のCT画像。左胸水を認める。

B: 当院内科入院1カ月後の胸部X線。B1-3: 同日のCT画像。両少量胸水+両肺微小結節影を認める。



や生物学的製剤が開始される傾向にある。リウマチ医や呼吸器内科医の間では、生物学的製剤投与中のRA患者では結核の合併が多く、とくに肺外結核の比率が多いことが知られているが、未だ一般臨床医まで衆知されていない。

生物学的製剤投与中の結核発症は、生物学的製剤導入早期に多い。Keane Jらの報告<sup>5)</sup>によると、147,000例のRAまたはCrohn病患者にIFXが投与され、70例に結核が発症し、結核発症までの中央値は12週(48例では3回以内)と報告され、Gomez-Reino JJら<sup>6)</sup>によると、IFXまたはETNが投与された1,540例のRA患者の2年間の追跡調査で、17例に結核が発症し、その59%は、IFX投与3カ月以内の発症であったという。また、わが国におけるIFXの市販後調査29,000例中、結核を発症した67例の結核発症時期の検討では、6カ月以内が44例(65.7%)、12カ月以内が58例(86.6%)であり、ADAの市販後調査でも、導入から結核発症までの期間は24週以内が54.5%、52週以内が90.9%であったと報告されている。

生物学的製剤投与中のRA患者では結核の治療には以下の問題点がある。①肺外結核が高率であり、しばしば診断が遅れる。一般病院での診断の遅れは、院内感染の原因となりうる。②一般的には結核の診断時に、生物学的製剤もMTXなどの免疫抑制剤も中止されるので、RAの活動性が増すことが多く、その場合のRA治療が制約される。ステロイド剤はリファンピシン投与により効果が半減する。

抗TNF抗体製剤をはじめとする生物学的製剤導入1年以内には結核の発症が多いことを念頭に置いて、慎重に経過を観察し、発熱や咳嗽などの呼吸器症状出現時はもちろん、肺外結核の諸症状にも注意が必要である。

## まとめ

本邦初の前向き調査を施行し、RA患者の結核のSIR

が一般人に比べ3.98倍高率であり、生物学的製剤、とくに抗TNF $\alpha$ 抗体治療によりIFXで8.6倍、ADAで3.4倍に増加したことが判明した。現在、わが国では生物学的製剤を導入されるRA患者数が急速に増加しているが、その導入に当たっては、結核のスクリーニングの徹底と抗結核薬の予防投与が重要である。導入後も結核発症に注意が必要である。生物学的製剤、とくにTNF阻害剤投与中の結核の過半数は肺外結核であり、しばしば診断が遅れてしまう。このことは、リウマチ医、呼吸器内科医のみならず、一般臨床医も衆知する必要がある。ますます、呼吸器科や結核を含む感染症専門医の協力が求められる。

## 文 献

- 1) 吉永泰彦：関節リウマチにおける結核とTNF阻害療法の影響。第84回総会ミニシンポジウム「免疫抑制療法と結核」。結核。2010；85：37-39。
- 2) Yoshinaga Y, Kanamori T, Ota Y, et al.: The clinical characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* infection among rheumatoid arthritis patients. Mod Rheumatol. 2004；14：143-148。
- 3) Yamanaka H, Tohma S: Potential impact of observational cohort studies in Japan on rheumatoid arthritis research and practice. Mod Rheumatol. 2006；16：75-76。
- 4) Miyasaka N, Takeuchi T, Eguchi K: Official Japanese guidelines for the use of infliximab for rheumatoid arthritis. Mod Rheumatol. 2005；15：4-8。
- 5) Keane J, Gershon S, Wise RP, et al.: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. N Engl J Med. 2001；345：1098-1104。
- 6) Gomez-Reino JJ, Carmona L, Valverde VR, et al.: BIO-BADASER Group: Treatment of rheumatoid arthritis with tumor necrosis factor inhibitors may predispose to significant increase in tuberculosis risk: a multicenter active-surveillance report. Arthritis Rheum. 2003；48：2122-2127。

### 3. 肝疾患・肝障害患者の結核

公益財団法人結核予防会複十字病院呼吸器内科 佐々木結花

#### はじめに

結核治療における副作用の中で肝障害については難渋するケースが多く、数多い検討がなされてきた。肝障害を有する症例への治療、治療中肝障害を生じた患者への対処は、日本結核病学会治療委員会で報告されている<sup>1)</sup>。今回、治療の現状および予後について、文献的な考察を加え報告する。

#### 1. 肝疾患の現状と免疫低下

本邦の平成23年の患者調査<sup>2)</sup>による肝疾患患者数は、医療機関に受診している人数ではあるがB型肝炎患者43,000人、C型肝炎患者163,000人、アルコールを除外した肝硬変56,000人と、合計して約26万人とされている。しかし、2000年時点の15～69歳の人口約9,332万人中、本人が自覚していない状態で社会に潜在している推定キ

キャリア数の推計値は、HBV (B型肝炎ウイルス) キャリア数96.8万人, HCV (C型肝炎ウイルス) キャリア数88.5万人<sup>3)</sup>と非常に多く、早期診断を目的としたウイルス性肝炎に対する特別事業等が国家として行われている。また、ウイルス関連肝障害以外のアルコール多飲等による肝障害も増加傾向である。

肝疾患における免疫能の低下については、網内系細胞(特に貪食能)の機能低下, Tリンパ球の増殖・活性化の障害, 門脈圧亢進による消化管粘膜の細菌透過性の亢進, 低アルブミン血症等の低栄養状態, 糖尿病の合併, およびアルコール多飲等の影響が肝硬変患者に免疫低下状態を生じると報告がなされている<sup>4)</sup>。

肝硬変は、肝炎ウイルス, アルコール多飲などを原因とし、肝全体に及ぶ線維化と結節形成を生じる不可逆な疾患であり、B型, C型等のウイルス性肝炎ではウイルスの排除目的の治療をしなければ肝硬変に至ることが多い。また、アルコール性肝硬変はアルコール多飲15年以上で肝硬変に至る頻度が高くなる。そのため、肝硬変患者は中高年者に高率で、肝硬変が進行し、非代償期に陥ると肝臓の合成能や解毒作用が低下し、免疫低下状態に至ることになる。

## 2. 肝障害と肺結核

デンマーク<sup>5)</sup>, インド<sup>6)</sup>から、肝硬変患者における結核有病率は一般人口に比し高率であると報告されている。本邦では肝硬変患者についての結核罹患率は調査されておらず、平成12年の結核緊急実態調査でも高率な合併症としては挙げられなかった。肝硬変症例は結核既感染率の高い中高齢者に多く、末期ほど免疫が低下していることから、肝硬変時に感染兆候が認められた際には結核を鑑別する必要があると考えられる。

## 3. 肝障害と結核治療

American Thoracic Society (ATS) による抗結核薬投与時の肝障害に関連する因子は、年齢、性別、妊娠の関連、合併症としての肝障害、アルコール多飲、低栄養、HIV感染、ウイルス性肝炎、薬物代謝、HLAなどが報告されている<sup>7)</sup>。

主たる抗結核薬の代謝および肝臓における副作用として、肝臓で代謝されるINH, RFP, PZAに機能障害、肝炎、黄疸等の副作用が認められ、肝障害のタイプは肝細胞障害型が多く、特にPZAでは強い肝毒性があると報告されている<sup>8)</sup>。

## 4. 結核治療における肝障害発症の頻度—自験例

肝障害を、治療開始後AST, ALTが150 IU/dl以上ないしは総ビリルビン (T-Bil) が2.0 mg/dl以上となった症例

と定義し、2010年, 2011年に当院にて入院加療した結核患者633例を調査した。年齢層別治療内容を示す (Fig. 1)。患者は80歳代が最も多く、また、どの年齢層も高率にINH, RFP, PZAを基本とした標準治療Aが施行されており、435例が標準治療Aにて加療されていた。

肝障害は、66例 (10.4%) に認め、治療開始薬剤は、INH + RFP + PZA + EB 56例, INH + RFP + PZA + SM 5例, INH + RFP + 抗結核薬 1例, 他の組み合わせによる処方 4例であった。標準治療Aにて加療した435症例のうち肝障害を生じた症例数は61例 (14.0%) であった。年齢層別副作用の発症率では (Fig. 2), 50歳代を超えると副作用が高率となり特に80歳以上では20%前後であった。

標準治療Aで加療し肝障害を生じた61例の肝障害パターンを3群に分類した。I群: 血清トランスアミラー

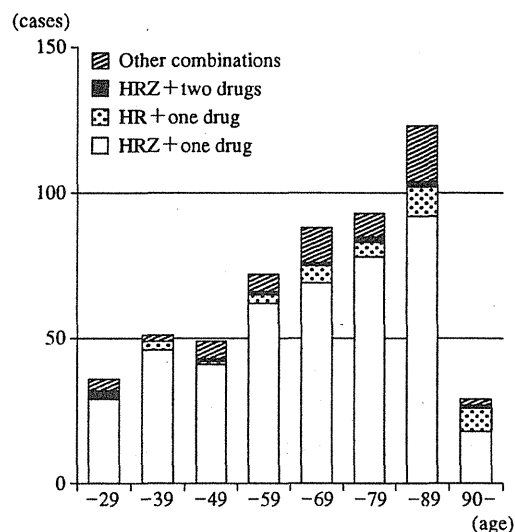


Fig. 1 Combination of anti-tuberculous drugs of each age groups

H: isoniazid (INH) R: rifampicin (RFP) Z: pyrazinamide (PZA)

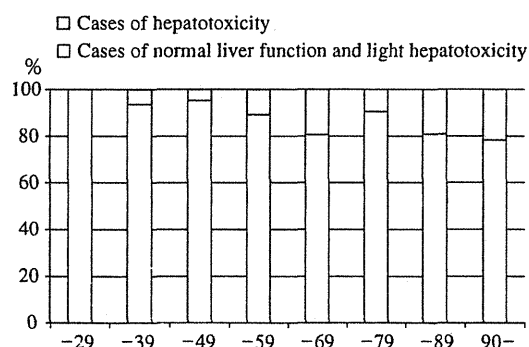


Fig. 2 Rate of hepatotoxicity of each age groups treated with INH, RFP, PZA, and other one anti-tuberculosis drug.

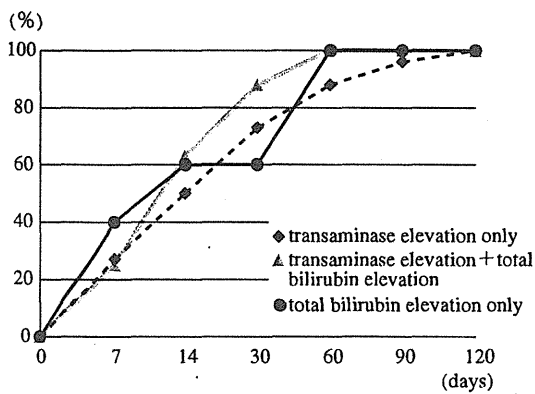


Fig. 3 The period which hepatotoxicity was found in the cases with INH, RFP, PZA, and one anti-tuberculosis drugs

ゼのみ上昇29例 (47.5%), II群: 血清トランスアミラーゼ上昇および総ビリルビン値上昇26例 (42.6%), III群: 総ビリルビン値のみ上昇6例 (9.8%) で, 80歳以上の高齢者はI群17.2%, II群53.8%, III群29%と, 高齢者の肝障害では総ビリルビン値上昇にも注意する必要があると考えられた。HBV抗原, HCV抗体陽性率については症例が少なく, 肝障害のパターンに特異的なものは認められなかった。各群の肝障害発症までの期間を示す (Fig. 3)。どの群も初期2週間に以内に肝障害の60%が生じており, II群, III群は全例が初期2カ月以内に肝障害が発症しており, PZAの関与が疑われた。I群は2カ月以降もわずかながら肝障害を生じており, 治療期間を通じて肝機能をチェックする必要があると考えられた。

次に, 標準治療Aにて加療し肝障害が発症した61例全体の治療変更および予後について検討した。治療変更47例, 治療変更せず改善4例, 治療変更せず継続し改善中他病発症し死亡 (他病死) 5例, 中止改善中他病発症し再投与できず死亡 (他病死) 4例, 中止後肝不全進行し死亡1例であった。治療変更した47例中, INH, RFP両者投与可能であったのは25例 (53.2%) にすぎず, INH投与不可RFP投与可能14例, INH投与可能RFP投与不可7例, INH・RFP両者投与不可1例であった。

### 5. 肝炎ウイルス感染例における肝障害

抗結核薬投与と肝炎ウイルス保有との関連について肝障害発症率を文献から示す。INH + RFP + PZA + EBないしはINH + RFP + EB投与例で, HBVキャリアでは8%, コントロール4%と有意ではないが高率であった<sup>9)</sup>。また, 中等度以上の肝障害をきたした症例は, HBVキャリアに有意に高率であった。HCV抗体陽性者では13%, コントロール4%と, やはりHCV抗体陽性者が高率であった<sup>10)</sup>。

自験例の, HBV抗原陽性者8例, HCV抗体陽性者14

例, 両者重感染1例の肝障害の比率を検討した。なお, 重感染者には肝障害は生じなかったため除外した。肝障害の発症率は, HBV抗原陽性者で1例 (12.5%), HCV抗体陽性者7例 (50%) であり, HCV抗体陽性者に高率であった。肝障害を生じた症例の背景として, HBウイルス抗原陽性者1例はキャリアであり肝障害の既往はなく, アルコール多飲などの誘因もなかった。一方, HBV抗原陽性者かつ治療中正常肝機能ないしは軽度肝障害をきたしたのみの症例ではHIV重感染, HBV治療中を認めた。肝障害を生じたHCV抗体陽性者では, 肝硬変1例, 治療前軽度肝障害2例, 他肝疾患発症1例を認めた。しかしHCV抗体陽性者かつ治療中正常肝機能ないしは軽度肝障害をきたしたのみの症例では, 肝硬変1例, 治療前軽度肝障害6例, HIV重感染, IFN治療後1例を認めており, 患者背景から肝炎ウイルス保有者の肝障害発症しやすさを推測できなかった。

### 6. 肝疾患合併結核症例の予後

Thulstrupの報告では, 肝硬変合併結核の治療開始30日以内の死亡率は27.3%, 1年以内の死亡率47.7%と予後は不良で, 特にChild-Turcotte-Pugh分類B, Cの, 非代償期の肝硬変症例では予後不良であると報告されている<sup>9)</sup>。

当院で2000年~2011年に入院治療した結核患者のうち, 肝硬変を合併した25例の予後を検討した。平均年齢は63.8歳で, 前医あるいは当院で判明した肝硬変の原因はC型肝炎16例, アルコール性5例, 原発性胆汁うっ滞性肝硬変1例, 不明3例であった。

肝硬変合併結核症例の死亡例では, 肝硬変の原因はC型肝炎ウイルスが高率で, 平均在院日数は38.8日と短期に死亡していた。肝硬変の重症例は認めず, 入院時の合併症として, 肝臓2例, DIC2例, 汎血球減少1例, 消化管出血1例, 急性呼吸不全 (入院直後人工呼吸管理) 1例等と非常に重症例が多かった。死因は結核死4例, 肝硬変関連死4例で, 死亡率は32%と不良であった。

### ま と め

肝疾患, 肝障害を有する症例について文献による成績および自験例を示した。肝障害は最も遭遇しやすい副作用であるが, 一方, 本邦においてPZAを含む標準治療を高齢者に用いない理由の一つとなっている。今回の検討でも標準治療Aを施行した症例では総ビリルビン値上昇を伴う肝障害が治療開始2カ月以内に生じておりPZAとの関連が疑われるが, 肝障害を生じた率は80歳以上で20%前後であり, 高齢者全例に一律に標準治療Aを行わない理由にはならない。治療開始前に十分全身状態の検討を注意深く行えば, 高齢者にも投与可能であると考えられた。

ウイルス性肝炎患者における検討では、HCV抗体陽性者において副作用が高率であり、治療中注意する必要がある。また患者背景因子の有無で肝障害発症を予測できなかったことから、定期的な検査および有症状時の適切な検査が必須となると考えられた。

肝硬変患者における結核症例は非常に少なく、大規模な検討はなされていないが、免疫能が低下し、特に非代償性肝硬変患者では免疫の低下に伴い、内因性再燃が生じる可能性もあり、欧米の報告では予後不良で早期死亡例が高率であるにもかかわらず、有病率が高い<sup>5)</sup>。本邦も様々な要因で肝硬変患者が増加しており、肝硬変患者の感染兆候の鑑別診断に、結核を落とさないようにするよう、啓発が必要であろう。

### 文 献

- 1) 日本結核病学会治療委員会：抗結核薬使用中の肝障害への対応について。結核。2007；82：115-118。
- 2) 厚生労働省大臣官房統計情報部：平成23年患者調査(傷病分類編)。25。
- 3) 田中純子：ウイルス肝炎の疫学。Medical Practice。2008；25：1726-1733。
- 4) Bonnel AR, Bunchorntavakul C, Reddy KR: Immune dysfunction and infections in patients with cirrhosis. Clinical Gastroenterology and Hepatology. 2011；9：727-738。
- 5) Thulstrup AM, Molle I, Svendsen N, et al.: Incidence and prognosis of tuberculosis in patients with cirrhosis of the liver. A Danish nationwide population based study. Epidemiol Infect. 2000；124：221-225。
- 6) Baijal R, Praveenkumar HR, Amarapurkar DN, et al.: Prevalence of tuberculosis in patients with cirrhosis of liver in western India. Trop Doct. 2010；40：163-164。
- 7) American Thoracic Society: An Official ATS Statement: Hepatotoxicity of antituberculosis therapy. Am J Respir Crit Care Med. 2006；174：935-952。
- 8) 厚生労働省：重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬物性肝障害(肝細胞障害型薬物性肝障害, 胆汁うっ滞型薬物性肝障害, 混合型薬物性肝障害, 急性肝不全, 薬物起因の他の肝疾患)。2008。41-43。
- 9) Lee BH, Koh WJ, Choi MS, et al.: Inactive hepatitis B surface antigen carrier state and hepatotoxicity during antituberculosis chemotherapy. Chest. 2005；127：1304-1311。
- 10) Kwon YS, Koh WJ, Suh GY, et al.: Hepatitis C virus infection and hepatotoxicity during antituberculosis chemotherapy. Chest. 2007；131：803-808。

## 4. 腎疾患・透析患者の結核

東京都立多摩総合医療センター呼吸器内科 高森 幹雄

### はじめに

慢性腎不全による血液透析は、抗凝固薬の開発等により1970年代以降に普及し始め現在でも患者数は増加傾向である。肺結核は1999年の結核非常事態宣言後は年々減少しているが、透析患者数は年々増加している。2011年透析患者総数は初めて30万人を突破し約30.4万人、100万人あたり2383人と見込まれ世界最多かつさらに増加傾向である。透析導入腎臓原疾患は糖尿病性腎症44.2%、慢性糸球体腎炎20.4%、腎硬化症11.7%の順であり

2000年代以降は原疾患として常時糖尿病性腎症が最多である。また2011年統計では患者の死因として導入初期では感染症が第1位、慢性期では心不全に続いて第2位である<sup>1)</sup>。慢性腎不全・糖尿病は共に肺結核発症のリスク因子とされ糖尿病性腎症の増加が危惧されている。

### 発症リスク要因

結核感染については、1974年Pradhanらによる5例のケース<sup>2)</sup>が初めて報告され、以後多数の報告がされている。国内、海外問わず時代背景・地域など罹患率や統計

Table 1 The incidence rate and risk ratio in hemodialysis patients

Year	Author	Investigation periods	Incidence rate (/100,000)	Risk ratio (compared to general population)
1979	Sasaki S	10 years	330	6-16
1976	Inamoto	1 year	1320 (M), 1475 (F)	8.5 (M), 18.4 (F)
1982	Inamoto	1 year	703 (M), 788 (F)	6.4 (M), 16.0 (F)
1997-99	Hasegawa H	3 years	236	
2003-05	Hasegawa H	3 years	246	4.3-8.3
2002	Sasaki Y	1 year	110.6	1.55 (M), 2.79 (F) [Extrapulmonary: 13.5 (M), 13.1 (F)]
2007-09	Fukushima C	3 years	146.0	8.34

M: male F: female