

[原 著]

比較的まれな非結核性抗酸菌臨床株を対象とした MALDI-TOF MS による同定性能の評価

鈴木弘倫¹⁾・吉田 敦¹⁾²⁾³⁾・樽川友美¹⁾・岡本友紀¹⁾・渡辺可菜¹⁾・小林優貴¹⁾
浅田道治¹⁾・奥住捷子³⁾・福島篤仁¹⁾²⁾³⁾・及川信次¹⁾・鹿住祐子⁴⁾・菱沼 昭¹⁾²⁾

¹⁾ 獨協医科大学病院臨床検査センター

²⁾ 獨協医科大学感染制御・臨床検査医学講座

³⁾ 獨協医科大学病院感染制御センター

⁴⁾ 結核予防会結核研究所抗酸菌部結核菌情報科

(平成 27 年 10 月 21 日受付, 平成 28 年 1 月 6 日受理)

今回、比較的まれな非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria ; NTM) を対象とした MALDI バイオタイパー (Bruker Daltonics) による同定性能の評価を行った。対象は臨床分離 NTM 50 株 (迅速発育抗酸菌 37 株, 遅発育抗酸菌 13 株) とし, 遺伝子解析と MALDI バイオタイパーの測定結果を比較した。MALDI バイオタイパーの Score Value 1.700 以上 2.000 未満を属レベルの判定とし, 2.000 以上を種レベルの判定とした。MALDI バイオタイパーの結果は, 遺伝子結果と比較して属レベルでは 96.0% (48/50 株) 一致し, 種レベルまで一致したのは 84.0% (42/50 株) だった。遺伝子検査で菌種が決定されたが MALDI バイオタイパーで Score Value が 1.700 以下で同定不能となったのは 2 株で, *M. paraffinicum* 1 株, *M. wolinskyi* 1 株であった。属レベルまでの一致を示したものは 6 株 (*Mycobacterium abscessus complex* 1 株, *M. chelonae* 4 株, *M. septicum* 1 株) であったが, Score Value で最も上位に挙げられた菌種名は遺伝子検査と一致していた。今回, 臨床分離株において MALDI バイオタイパーは, 遺伝子解析と比較しても良好な同定精度が確認された。しかし, 検討できた株数は少ないため, データベースの充実と合わせ, 今後も同定性能を確認していく必要がある。

Key words: MALDI-TOF MS, 非結核性抗酸菌, 菌種同定

序 文

非結核性抗酸菌 (nontuberculous mycobacteria ; NTM) は土壌や水などの環境に普遍的に存在する。多くはヒトに病原性を示さないが, 医療の進歩による免疫抑制状態の患者の増加や, 関節リウマチに対する治療薬に代表される生物学的製剤による副反応を反映し, NTM 感染症は増加している^{1)~4)}。同定はコロニー形態や発育速度, 光発色性などの従来法による分類を

基本として行われるが, さらに詳細な菌種同定には DNA-DNA ハイブリダイゼーション法 (DDH 法) が広く用いられている。しかし, これらの方法では, 現在 184 菌種ある抗酸菌に対応するには限界がある。一方, 研究施設では, 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* 遺伝子の塩基配列に基づいた詳細な同定を行っているが, すべての施設で実施できる訳ではなく, その費用も高い。

近年, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) による微生物同定が可能となり, 臨床現場でも普及し始めている。抗酸菌は一般細菌に比べ, タンパク質の抽出が難しいため, MALDI-TOF MS による同定はやや煩雑で, かつ Score Value の低い結果が出やすかった。しかし, シリカビーズを用いて前処理を行うことでこれらは改善され, 容易かつ正確な同定が可能と

著者連絡先: (〒321-0293) 栃木県下都賀郡壬生町大字北
小林 880 番地
獨協医科大学病院臨床検査センター
鈴木弘倫
TEL: 0282-86-1111 (3952)
FAX: 0282-86-4913
E-mail: s-hiro@dokkyomed.ac.jp

なった⁵⁾。既に結核やNTMのうち検出頻度の高い *M. avium* complex (MAC) においては、MALDI-TOF MSによる同定性能について複数の報告がなされ、その評価は定まったといえる⁶⁾。しかしながら、希少菌種については検出数が少ないことから、臨床株を用いた報告はほとんどなかった。

今回我々は、比較的まれなNTMを対象としてMALDIバイオタイパー (Bruker Daltonics) による同定性能の評価を行い、その精度について詳細な結果を得たので報告する。

材料と方法

対象

2011年1月～2015年4月の期間、当院検査センターで分離されたMAC以外のNTMと、2011年以降に関東地方から九州まで17施設から依頼を受けたNTMの臨床分離株50株を対象とした。

遺伝子検査

16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* 遺伝子それぞれについて、シーケンス解析を行った。工藤PD培地“ニチビー” (日本ビーシージー製造株式会社) にて培養したコロニーを蒸留水50 μ l に懸濁させ、100°C で10分間加熱し、軽く遠心した上清をPCRに用いた。

PCR反応は、16S rRNA領域のプライマー、16S-5F (5-TTGAGAGTTTTGATCCTGGCTC-3)、16S-534R (5-TACCGCG GCTGCTGGCAC-3)⁷⁾、*hsp65* 領域のプライマー、HSPF3 (5'-ATCGCCAAGGAGATCGAGCT-3)、HSPR4 (5'-AAGGTGCCGCGATCTTGTT-3)⁸⁾、*rpoB* 領域のプライマー、*rpoB*-mycoF (5-GGCAAGTCCACCCGAAGGG-3)、*rpoB*-mycoR (5-AGCGGCTGCTGGGTGATCATC-3)⁷⁾を用い、denaturation 98°C 4秒、annealing 55°C 30秒、elongation 72°C 1分、45サイクルで行った。PCR産物を精製した後、前述のプライマーとシーケンスキット BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit vl.1 (ABI applied biosystems) を用いて、シーケンスを行った。得られた塩基配列をBLAST解析し、菌種同定を行った (BLASTN algorithm : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)。

MALDIバイオタイパーによる解析

MALDI-TOF MS プロトコール

工藤PD培地“ニチビー” (日本ビーシージー製造株式会社) にて、迅速発育株 (rapid grower) は30°C、7日間培養した菌を使用し、遅発育株 (slow grower) は37°C、3週間培養した菌を用いた。Bruker社の推奨するシリカビーズを用いたプロトコールに従って前

処理を行い、MALDIバイオタイパー (Ver.3.1) Microflex LT (Bruker Daltonics) によって測定した。1.5 mlのエッペンドルフチューブに蒸留水300 μ lを加え、1 μ l ループを使用して菌体を釣菌し、1 μ l ループにて良く攪拌した。95°C で30分間インキュベートし、室温で数分放置後900 μ lのエタノールを加え、激しく攪拌した。15,000 rpmで2分間遠心、上清を捨て、得られたペレットを風乾させた。続いてシリカビーズとアセトニトリル30 μ lを加え、5分間ボルテックスで攪拌した。70%ギ酸30 μ lを加え、10秒程度ボルテックスを行い、15,000 rpmで2分間遠心、上清1 μ lを試料とし測定した。

MALDIバイオタイパーによる同定

Flex Controlソフトウエア (Bruker Daltonics) によりマススペクトルを得た。菌種同定を行うデータベースには、MALDI Biotyper 3.1 (Mycobacteria Library 2.0) を用いた。

MALDIバイオタイパーによるマニュアル波形解析 *Mycobacterium abscessus* complex はデータベースによる同定は不可能であるので、我々の既報の方法により菌種特異的シグナルで同定した⁹⁾。*M. abscessus* subsp. *abscessus* (*M. abscessus sensu stricto*) および *M. abscessus* subsp. *bolletii* (*M. bolletii*) に特異的なシグナル2か所 (4,391.24 *m/z*, 8,781.77 *m/z*) と、*M. abscessus* subsp. *massiliense* (*M. massiliense*) に特異的なシグナル2か所 (4,385.05 *m/z*, 8,767.98 *m/z*) を同定に用いた。

結 果

遺伝子検査の結果から当研究に使用した菌種の内訳は、*Mycobacterium abscessus* complex 20株、*Mycobacterium canariense* 1株、*Mycobacterium chelonae* 4株、*Mycobacterium fortuitum* 2株、*Mycobacterium mageritense* 3株、*Mycobacterium mucogenicum* 5株、*Mycobacterium septicum* 1株、*Mycobacterium wolinskyi* 1株、*Mycobacterium kansasii* 3株、*Mycobacterium kyorinense* 4株、*Mycobacterium kumamotoense* 2株、*Mycobacterium nebraskense* 1株、*Mycobacterium paraffinicum* 1株、*Mycobacterium porcinum* 1株、*Mycobacterium shimoidei* 1株であった (Table 1)。また、遺伝子同定ができなかった株はなく、*Mycobacterium abscessus* complexの細かな同定は、*M. abscessus sensu stricto* 11株、*M. massiliense* 6株および *M. bolletii* 3株であった (Table 2)。

遺伝子検査で同定できたが、MALDIバイオタイ

Table 1. Clinical isolates identified by MALDI-TOF MS (N = 50)

Characteristic	Genetic identification*	n	MALDI-TOF MS identification	Genus**	Species***	Score Value		
						Range	Median	
Rapid growers	<i>Mycobacterium abscessus</i> complex	20	<i>Mycobacterium abscessus</i> complex	1	19	1.983~2.432	2.257	
	<i>Mycobacterium canariense</i>	1	<i>Mycobacterium canariense</i>		1	2.432	2.432	
	<i>Mycobacterium chelonae</i>	4	<i>Mycobacterium chelonae</i>	4		1.824~1.986	1.891	
	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	2	<i>Mycobacterium fortuitum</i>		2	2.387~2.437	2.412	
	<i>Mycobacterium mageritense</i>	3	<i>Mycobacterium mageritense</i>		3	2.232~2.277	2.255	
	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	5	<i>Mycobacterium mucogenicum/phocaicum</i>		5	2.075~2.189	2.131	
	<i>Mycobacterium septicum</i>	1	<i>Mycobacterium septicum</i>	1		1.907	1.907	
	<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	1	no reliable identification****					
	Slow growers	<i>Mycobacterium kansasii</i>	3	<i>Mycobacterium kansasii</i>		3	2.410~2.579	2.497
		<i>Mycobacterium kyorinense</i>	4	<i>Mycobacterium kyorinense</i>		4	2.163~2.383	2.257
<i>Mycobacterium kumamotoense</i>		2	<i>Mycobacterium kumamotoense</i>		2	2.262~2.374	2.318	
<i>Mycobacterium nebraskense</i>		1	<i>Mycobacterium nebraskense</i>		1	2.461	2.461	
<i>Mycobacterium porcinum</i>		1	<i>Mycobacterium porcinum</i>		1	2.539	2.539	
<i>Mycobacterium shimoidei</i>		1	<i>Mycobacterium shimoidei</i>		1	2.363	2.363	
<i>Mycobacterium paraffinicum</i>		1	no reliable identification****					

*: Genetic identification by 16S rRNA, hsp65 and rpoB sequences.

** : Score Value range 1.700 to 2.000.

*** : Score Value range >2.000.

**** : Score Value was <1.700.

Table 2. Species identification of *M. abscessus* complex by specific MS peaks

Strain No.	Genetic identification by 16S rRNA, hsp65 and rpoB sequence	MALDI Biotyper				
		Identification by manual MS analysis	Specific MS peaks (m/z)*			
			4,385.05	4,391.24	8,767.98	8,781.77
10	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.64		8,782.23
11	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.97		8,783.31
12	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	4,385.07		8,767.55	
13	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.78		8,782.63
14	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.28		8,783.07
15	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.99		8,783.70
21	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	4,385.84		8,769.24	
22	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	4,384.83		8,768.52	
25	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.39		8,782.17
28	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,392.21		8,782.52
29	<i>M. bolletii</i>	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,392.28		8,784.05
30	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.69		8,782.91
33	<i>M. bolletii</i>	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.16		8,780.85
35	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	4,384.71		8,768.05	
36	<i>M. bolletii</i>	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.19		8,781.54
38	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	4,384.31		8,767.58	
39	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,392.26		8,783.81
40	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.54		8,781.71
41	<i>M. abscessus</i> sensu stricto	<i>M. abscessus</i> sensu stricto/ <i>M. bolletii</i>		4,391.91		8,782.34
42	<i>M. massiliense</i>	<i>M. massiliense</i>	4,385.08		8,767.63	

*Suzuki H., Yoshida S., Yoshida A., et al. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2015. 83: 365-370

パーの結果で Score Value 1.700 未満で同定不能となったのは 2 株で、*M. paraffinicum* 1 株、*M. wolinskyi* 1 株であった (Table 1)。MALDI バイオタイパーにおいて、属レベルまでの一致を示す Score Value が 1.700 以上 2.000 未満であった 6 株 (*Mycobacterium abscessus* complex 1 株、*M. chelonae* 4 株、*M. septicum* 1 株) も Score Value の高い同定菌名は遺伝子検査と一致していた。

Mycobacterium abscessus complex において行ったマニュアル波形解析では、*M. abscessus* sensu stricto/*M. bolletii* に特異的な 2 か所のシグナル (4,391.24 m/z, 8,781.77 m/z)⁹⁾ は 14 株中 14 株 (100%) で認められた。さらに *M. massiliense* に特異的な 2 か所のシグナル (4,385.05 m/z, 8,767.98 m/z)⁹⁾ も 6 株中 6 株 (100%) で認められた (Table 2)。

MALDI バイオタイパーの判定基準に従った結果は、遺伝子結果と比較して Score Value が 1.700~2.000 の属レベルでは 96.0% (48/50 株) 一致し、Score Value 2.000 以上の種レベルまで一致したのは 84.0% (42/50 株) だった。なお MALDI Biotyper 3.1 (*Mycobacteria* Library 2.0) には、今回、遺伝子同定で決定された菌

種名は詳細な同定を必要とする *Mycobacterium abscessus* complex と *Mycobacterium mucogenicum* / *phocaicum* を除いてすべて登録されており、各菌種における登録株数は 1~14 個であった。

考 察

抗酸菌の遺伝子同定では、細菌同定で最も広く行われている 16S rRNA 遺伝子領域のみでは分別できない菌種が存在する。このため hsp65 領域や rpoB 領域などハウスキーピング遺伝子を複数使用して総合的に判断しなければならず、知識と技術を必要とする。一方、MALDI-TOF MS では菌種ごとに前処理法を設定する必要はなく、一律のプロトコルで行うことが可能で、検査室の負担は少ない。また、MALDI バイオタイパーの MALDI Biotyper 3.1 *Mycobacteria* Library 2.0 には 313 株 133 種の抗酸菌が含まれ、多くの菌種をカバーし、高い同定性能を有している。

今回、比較的新な NTM 臨床株を対象とした MALDI バイオタイパーによる同定性能の評価を行い、遺伝子同定と比較したが、得られた Score Value が最も高く、ランク 1 位に挙げられた菌種名は、96.0%

で遺伝子同定菌種名と一致していた。なお MALDI バイオタイパーにおける同定結果で同定不能となった 2 株は *M. paraffinicum* 1 株, *M. wolinskyi* 1 株であった。この 2 菌種についてはライブラリに登録されている菌株がそれぞれ 1 株のみであり, ライブラリに登録数が少なかったために同定性能が低くなったと推測した。

一方, *M. chelonae* 4 株の Score Value は 1.824~1.986 となり, 全体として低かった。Mediavilla-Gradolph MC¹⁰ からも臨床分離株を用いた Mycobacteria Library 1.0 の評価を行っているが, *M. chelonae* は 5 株中 3 株が Score Value 2.000 を下回っていた。Mycobacteria Library 2.0 では前バージョンより 3 株多く登録され, 10 株の登録がある。ライブラリに登録された菌株数が多くなったにもかかわらず, 今回も Score Value は低かった。従来, *M. chelonae* と *M. abscessus* は同一のグループとされ, *M. abscessus* complex には遺伝的多様性があることが指摘されてきたが, *M. chelonae* にも同様に遺伝的多様性が存在し, Score Value が低くなっているのかもしれない¹¹⁾¹²⁾。今後, *M. chelonae* に関しては遺伝子多様性を明らかにし, さらにデータベースを充実させる必要があると思われる。

MALDI-TOF MS は, *M. chimaera* と *M. intracellulare*, *M. mucogenicum* と *M. phocaicum*, *M. abscessus* complex 内の 3 菌種 (i.e., *M. abscessus sensu stricto*, *M. bolletii*, and *M. massiliense*) は, 判別が困難とされている⁵⁾。MALDI バイオタイパーの同定結果もこれらの菌種を分けることが出来ない。しかし, *M. abscessus* complex においては, 特異的ピークのマニュアル解析により 3 菌種に細分類できる^{9)13)~16)}。今回, 我々の既報⁹⁾による特異的ピーク 4 か所を用いて *M. abscessus sensu stricto* と *M. bolletii* の 2 菌種から *M. massiliense* を分けた。特にこれら 3 菌種では, 主となる治療薬であるクラリスロマイシンに対する薬剤感受性に違いがあり, *M. abscessus* complex から *M. massiliense* を区別することは治療上も非常に重要である。

比較的良好な NTM による感染症に対する治療については, これまで得られている情報は少なく, 外科的切除や多剤抗酸菌療法を基本としているが, 菌種によっても抗酸菌の感受性に違いがあり, 定まった方法は確立されていない¹⁷⁾。しかし, 早い段階で菌種を同定することが出来れば, 抗酸菌治療に関する情報が得られている菌種に関しては, 治療薬の選択が容易になる可能性がある。また, 比較的良好な NTM は, コン

タミネーションとして検出される場合も多い。臨床への迅速な菌種同定のフィードバックは感染症とコンタミネーションの判断にも有用な情報となる。この点においても MALDI-TOF MS による同定は力を発揮する。

今回解析できた菌株数は必ずしも多くないが, 比較的良好な NTM 臨床分離株において MALDI バイオタイパーは, シークエンス解析に近い同定性能を持つことが確認された。また, シークエンス解析と比べ複雑な工程が無く, コストも安価であり臨床的に有用と考えられる。これからも稀少菌種による症例を増やし, データを蓄積する必要がある。

謝辞: 菌株を提供して頂きました獨協医科大学越谷病院の山本芳尚先生, がん研究会有明病院の原田壮平先生, 亀田総合病院の細川直登先生, 東京都健康長寿医療センターの増田義重先生, 虎の門病院の米山彰子先生, 国立国際医療研究センターの大曲貴夫先生, 済生会宇都宮病院の萩原繁広先生, 東京都済生会中央病院の吉藤 歩先生, 市立長浜病院の花谷 崇先生, 小倉記念病院の米澤昭仁先生, 聖マリアンナ医科大学病院の大柳忠智先生, 静岡県立静岡がんセンターの倉井華子先生, 静岡県立こども病院の伊藤雄介先生, 大阪府立急性期・総合医療センターの橋本展洋先生, 東京都立大塚病院の高野さかえ先生, 東京都立小児総合医療センターの森野紗衣子先生に深謝致します。

文 献

- 1) 倉島篤行. 2015. 7年ぶりに行われた肺非結核性抗酸菌症全国調査結果について. 結核 90: 605-606.
- 2) 森本耕三. 2013. 肺非結核性抗酸菌症の日本と世界の疫学的動向. p. 1-10, 肺 MAC 症診療 Up to Date—非結核性抗酸菌症のすべて—(倉島篤行, 小川賢二編).
- 3) Brode, S.K., F.B. Jamieson, R. Ng, et al. 2015. Increased risk of mycobacterial infections associated with anti-rheumatic medications. Thorax 70: 677-682.
- 4) Brode, S.K., F.B. Jamieson, R. Ng, et al. 2014. Risk of mycobacterial infections associated with rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. Chest 146: 563-572.
- 5) Saleeb, P.G., S.K. Drake, P.R. Murray, et al. 2011. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J. Clin. Microbiol. 49: 1790-1794.
- 6) 新妻一直. 2014. マトリックス支援レーザー脱離イ

- オン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF MS) による抗酸菌の同定 臨床分離抗酸菌株と基準菌株を用いて. 結核 89: 555-563.
- 7) Simmon, K.E., Ø. Kommedal, Ø. Saebo, et al. 2010. Simultaneous sequence analysis of the 16S rRNA and rpoB genes by use of RipSeq software to identify Mycobacterium species. J. Clin. Microbiol. 48: 3231-3235.
 - 8) Kim, H., S.H. Kim, T.S. Shim, et al. 2005. Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1649-1656.
 - 9) Suzuki, H., S. Yoshida, A. Yoshida, et al. 2015. A novel cluster of Mycobacterium abscessus complex revealed by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 83: 365-370.
 - 10) Mediavilla-Gradolph, M.C., I. De Toro-Peinado, M.P. Bermúdez-Ruiz, et al. 2015. Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous Mycobacterium Species Isolated from Clinical Specimens. Biomed. Res. Int. 2015: 854078.
 - 11) Vanitha, J.D., R. Venkatasubramani, K. Dharmalingam, et al. 2003. Large-restriction-fragment polymorphism analysis of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium terrae isolates. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4337-4341.
 - 12) Khan, I.U., S.B. Selvaraju, J.S. Yadav. 2005. Occurrence and characterization of multiple novel genotypes of Mycobacterium immunogenum and Mycobacterium chelonae in metalworking fluids. FEMS Microbiol. Ecol. 54: 329-338.
 - 13) Teng, S.H., C.M. Chen, M.R. Lee, et al. 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can accurately differentiate between Mycobacterium massiliense (M. abscessus subspecies bolletti) and M. abscessus (sensu stricto). J. Clin. Microbiol. 51: 3113-3116.
 - 14) Tseng, S.P., S.H. Teng, P.S. Lee, et al. 2013. Rapid identification of M. abscessus and M. massiliense by MALDI-TOF mass spectrometry with a comparison to sequencing methods and antimicrobial susceptibility patterns. Future Microbiol 8: 1381-1389.
 - 15) Fangous, M.S., F. Mougari, S. Gouriou, et al. 2014. Classification Algorithm for Subspecies Identification within the Mycobacterium abscessus Species, Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. 52: 3362-3369.
 - 16) Panagea, T., D.H. Pincus, D. Grogono, et al. 2015. Mycobacterium abscessus Complex Identification with Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. J. Clin. Microbiol. 53: 2355-2358.
 - 17) Griffith, D.E., T. Aksamit, B.A. Brown-Elliott, et al. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 175: 367-416.

Evaluation of MALDI-TOF MS analysis for the identification of rare nontuberculous mycobacteria species from clinical isolates

Hiromichi Suzuki¹⁾, Atsushi Yoshida^{1) 2) 3)}, Tomomi Tarukawa¹⁾, Yuki Okamoto¹⁾, Kana Watanabe¹⁾, Yuuki Kobayashi¹⁾, Michiharu Asada¹⁾, Katsuko Okuzumi³⁾, Atsuhito Fukusima^{1) 2) 3)}, Shinji Oikawa¹⁾, Yuko Kazumi⁴⁾, Akira Hishinuma^{1) 2)}

¹⁾Clinical Laboratory Center, Dokkyo Medical University Hospital

²⁾Department of Infection Control and Clinical Laboratory of Medicine, Dokkyo Medical University

³⁾Division of Infection Control, Dokkyo Medical University Hospital

⁴⁾Department of Mycobacterium Reference and Research, the Research Institute of Tuberculosis

MALDI-TOF MS was evaluated for the identification of relatively rare species of nontuberculous mycobacteria (NTM) isolates. Fifty NTM clinical isolates (37 rapid growers and 13 slow growers) were analyzed by MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics) as well as gene sequencing of 16S rRNA, *hsp65* and *rpoB*. MALDI-TOF MS correctly identified 96.0% (48/50) of NTM isolates to the genus-level and 84.0% (42/50) to the species-level. Only two isolates of *M. paraffinicum* and *M. wolinskyi* (4%) could not be determined. Our study suggests that relatively rare NTM species can be reliably identified by MALDI-TOF MS and that its application in clinical setting is useful for selecting appropriate antimicrobial therapies.