

[原 著]

Nocardia 属菌臨床分離株を用いた質量分析装置 VITEK MS の同定精度評価および薬剤感受性結果

大野真依¹⁾・清祐麻紀子¹⁾・相原正宗¹⁾²⁾・山下有加¹⁾・堀田多恵子¹⁾・國崎祐哉¹⁾

¹⁾九州大学病院検査部

²⁾九州大学大学院医学研究院保健学部門検査技術科学分野

(令和7年1月14日受付, 令和7年5月7日受理)

質量分析法を用いた *Nocardia* 属菌の迅速な同定はノカルジア症の診断や治療薬選択に有用だが, VITEK MS による本菌の同定精度や適切な菌株の前処理に関する報告は不足している。また, 近年ではノカルジア症の治療薬への耐性化が懸念されていることから, *Nocardia* 属菌臨床分離株 46 株を対象に VITEK MS の同定精度の評価と薬剤感受性検査を行った。

16S rRNA 遺伝子解析結果から 46 株中 40 株は VITEK MS データベース記載菌種に該当することが確認され, 40 株中 36 株 (90%) は Direct deposit (DD) で遺伝子解析と同じ菌種に同定された。DD で未同定の 4 株はギ酸による前処理では 1 株のみ, VITEK MS *Mycobacterium/Nocardia* Kit による前処理では 4 株全て同定された。薬剤感受性検査では 46 株は全て linezolid, sulfamethoxazole-trimethoprim に感性であったが, ceftriaxone に本来感性の *Nocardia cyriacigeorgica* では 9 株中 1 株に耐性を認めた。

VITEK MS による *Nocardia* 属菌の同定精度は高く, 適切な前処理の選択が更なる精度向上に寄与すると考えられた。また, 少数ながら獲得耐性の存在が示唆され, ノカルジア症治療には同定検査と併せて薬剤感受性検査の必要性が示された。

Key words: *Nocardia* 属, VITEK MS, 薬剤感受性検査

序 文

Nocardia 属菌は水中や土壌など自然界に広く存在するグラム陽性好気性放線菌の一つである。本菌による感染症は主に免疫不全宿主に見られ, 特に呼吸器感染症, 皮膚軟部組織感染症, 中枢神経感染症の原因菌として重要である¹⁾。*Nocardia* 属菌は菌種により原発部位や病原性が異なり, *Nocardia brasiliensis* や *Nocardia otitidiscaviarum* は皮膚軟部組織から, *Nocardia farcinica* や *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia nova* は肺から分離される頻度が高いことが知られている¹⁾。特に国内でノカルジア症の原因菌として分離頻度の高い *N. farcinica* は全身播種や脳病変を合併しやすく, 病原性が強いことが知られている²⁾。したがって臨床検体から *N. farcinica* が検出された場合は, 積極的な脳病変の検索を行うことが極めて重要であり, 原発巣の推定や合併症の回避において正確な菌種同定は重要と考える。また, *Nocardia* 属菌の正確な菌種同定は *N. otitidiscaviarum* における imipenem (IPM) への自然耐性など³⁾, 菌種ごとの薬剤感受性パターンを踏まえた治療薬選択においても有益であるが, 近年, ノカルジア症の第一選択薬である sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) に耐性を示す株の増加が報告されてお

り³⁾, ノカルジア症の適切な治療には *Nocardia* 属菌の正確な菌種同定に加え, 薬剤感受性検査の実施が不可欠と考えられる。

細菌検査における Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)を用いた同定は, 被験菌のマススペクトルをデータベースに照合し菌種を同定する検査技術として活用されており, 微生物同定システムとして MALDI Biotyper (ブルカー・ジャパン株式会社) と VITEK MS (ビオメリュー・ジャパン株式会社) の 2 つが上市されている。被験菌の増殖速度に依存しない本同定技術は遅発育菌の迅速な同定を可能にし, データベースの拡充とともにその有用性が評価されつつある。*Nocardia* 属菌においても MALDI-TOF MS の同定精度が国内外の臨床分離株を対象に評価されているが⁴⁾⁵⁾, その報告の多くは MALDI Biotyper によるものであり, VITEK MS を用いた *Nocardia* 属菌の同定精度に関する報告は乏しい。また, 本菌はミコール酸などの細胞壁中の脂肪酸や基生菌糸の形成などマススペクトル取得に影響を及ぼす可能性のある特徴を有するため⁴⁾⁶⁾, ギ酸やガラスビーズを用いた前処理が日常的に行われているが, これら前処理の必要性や最適な前処理の選択については十分に検証されていない。

そこで, 本研究では 2005 年から 2023 年までの期間に九州大学病院検査部で分離された *Nocardia* 属菌 46 株を解析対象に, 16S rRNA 遺伝子解析結果と VITEK MS による同定結果を比較し, VITEK MS の同定精度の評価を行った。また, 当院分離株の薬剤感受性検査も同時に施行したためここに併せて報告する。

著者連絡先: (〒812-8582) 福岡市東区馬出 3-1-1

九州大学病院検査部

大野真依

TEL: 092-642-5757

FAX: 092-642-5755

E-mail: ono.mai.733@m.kyushu-u.ac.jp

材料と方法

1. 対象

2005年1月1日から2023年12月31日までの期間に九州大学病院検査部細菌検査室にて分離され、マイクロバンク(イワキ株式会社)にてMcFarland3から4相当で -80°C 保存されていた *Nocardia* 属菌初代分離株46株を16S rRNA 遺伝子解析による同定、VITEK MSによる同定および薬剤感受性検査に用いた。標準菌株は、VITEK MSによる同定には *N. brasiliensis* ATCC 19296, *N. nova* ATCC BAA-2227 を用い、薬剤感受性検査には *N. nova* ATCC BAA-2227, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 を用いた。

臨床分離株はマイクロバンクにて -80°C 保存されていたものより、標準菌株は添付文書に記載の方法に準じてそれぞれアキュレート羊血液寒天培地(島津ダイアグノスティクス株式会社)に接種し、 35°C 、大気条件下で2回継代した。臨床分離株、*N. brasiliensis* ATCC 19296 および *N. nova* ATCC BAA-2227 は72時間、*S. aureus* ATCC 29213 は20時間培養したコロニーを用いて以降の実験を行った。

2. 方法

(1) 16S rRNA 遺伝子解析による同定

臨床分離株46株はサンガーシーケンシング法による16S rRNA 遺伝子解析⁷⁾を行った。既報の基準⁹⁾を参考に、EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) に登録された基準株との相同性から菌種あるいは complex レベルでの菌種同定を行った。16S rRNA 遺伝子解析により同定した菌種を VITEK MS による *Nocardia* 属菌の同定精度評価の基準とした。

(2) VITEK MS による同定と精度評価

MALDI-TOF MS による菌種同定には VITEK MS とその専用解析ソフトである VITEK MS Version3.2 (V3.2) が有するデータベースを用いた。まず、全ての臨床分離株、*N. brasiliensis* ATCC 19296 および *N. nova* ATCC BAA-2227 は前処理を行わず、ターゲットスライドに直接少量の菌を塗布し、MS-CHCA マトリックス試薬(バイオメリュー・ジャパン株式会社)を1 μL 滴下し乾燥後、VITEK MS による菌種同定を行った(Direct deposit, DD)。信頼値99.9で同定された菌種を採用し、信頼値99.8以下の場合には全て同定不可とした。次に、DDにより同定不可となった菌株のみを対象に、以下に示すギ酸(FA)およびVITEK MS *Mycobacterium/Nocardia* Kit (KIT, バイオメリュー・ジャパン株式会社)を用いた前処理をそれぞれ行ったのちVITEK MS による再測定を行った。

FA: ターゲットスライド上に塗布した菌に70%ギ酸(バイオメリュー・ジャパン株式会社)を0.5 μL 滴下した。乾燥したサンプルにMS-CHCA マトリックス試薬を1 μL 滴下した。

KIT: VITEK MS *Mycobacterium/Nocardia* Kit を用いて添付文書のとおり前処理を行った後の溶液1 μL をターゲットスライド上に滴下した。乾燥したサンプルにMS-CHCA マトリックス試薬を1 μL 滴下した。

VITEK MS の同定精度の確認として、対象菌株数のうち16S rRNA 遺伝子解析により同定された菌種と VITEK MS により同定された菌種が一致した株数を菌種ごとに算出した。

また、VITEK MS のデータベースに記載されている菌種に関しては DD, FA および KIT のそれぞれで16S rRNA 遺伝子解析により同定された菌種と VITEK MS により同定された菌種が一致した株数を算出した。VITEK MS のデータベースでは *Nocardia africana* と *N. nova* の鑑別は困難であり、*N. africana/N. nova* と併記されるため、16S rRNA 遺伝子解析による同定菌種がどちらか一方と同じ場合は同定一致と判定した。

(3) 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査はドライプレート‘栄研’DP1R (DP1R, 栄研化学株式会社)、ミューラーヒントンプイヨン‘栄研’(栄研化学株式会社)を使用し、臨床分離株および *N. nova* ATCC BAA-2227 は Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) M24-3rd¹⁰⁾、*S. aureus* ATCC 29213 は CLSI M100-S29¹¹⁾ に準じた微量液体希釈法にて MIC を測定した。対象薬剤は DP1R に含まれる薬剤のうち、CLSI M62-1st¹²⁾ で判定基準のある clavulanic acid/amoxicillin (CVA/AMPC), ceftriaxone (CTR), IPM, clarithromycin (CAM), moxifloxacin (MFLX), minocycline (MINO), tobramycin (TOB), amikacin (AMK), linezolid (LZD), ST の10薬剤とした。加えて、複数株を分離した菌種ごとにそれぞれの薬剤に対する感性率を算出した。

結 果

1. 16S rRNA 遺伝子解析による同定

16S rRNA 遺伝子解析により同定された臨床分離株46株の菌種内訳とそれぞれの株数を Table 1 に示す。臨床分離株46株は14菌種に分けられ、そのうち40株はVITEK MS のデータベースに記載されている9菌種に該当した (Table 1, Isolate (species included in the VITEK MS database))。

2. VITEK MS による同定と精度評価

N. brasiliensis ATCC 19296 および *N. nova* ATCC BAA-2227 は DD, FA および KIT の前処理において全て *N. brasiliensis*, *N. africana/N. nova* と同定された (Table 1, Control strain)。臨床分離株のうち VITEK MS のデータベースに記載されている9菌種40株において DD による VITEK MS の同定菌種が16S rRNA 遺伝子解析結果と一致した株数は、*N. farcinica* complex 9株, *N. cyriacigeorgica* 8株, *N. nova* 5株, *N. africana* 4株, *N. brasiliensis* 4株, *N. otitidiscaviarum* 2株, *Nocardia beijingensis* 2株, *Nocardia wallacei* 1株, *Nocardia veterana* 1株の合計36株であり、DDにより90%の株が正確に同定されていると判断した (Table 1, Isolate (species included in the VITEK MS database))。DDで同定不可と判定された *N. farcinica* complex 3株および *N. cyriacigeorgica* 1株の合計4株を FA および KIT でそれぞれ前処理を行い、VITEK MS で再度同定を試みたところ、FA で16S rRNA 遺伝子解析により同定された菌種と一致したのは *N. farcinica* complex 1株のみであったが、KIT では4株全てが16S rRNA 遺伝子解析結果と一致していた。

VITEK MS データベースに記載されていない5菌種6株のうち *Nocardia aobensis* 1株は DD, FA および KIT の前処理において全て *N. africana/N. nova* と同定され、残りの5株は DD, FA および KIT のどの方法でも同定不可と判定

Table 1. Comparison of 16S rRNA gene sequencing identification and VITEK MS identification for 46 *Nocardia* spp. isolates.

Species identified by 16S rRNA gene sequencing	Number of strain/ isolate	Number of strain/isolate correctly identified (total number of strain/isolate tested in each preparation)		
		DD	FA	KIT
Control strain				
<i>N. brasiliensis</i> ATCC 19296	1	1 (1)	1 (1)	1 (1)
<i>N. nova</i> ATCC BAA-2227*	1	1 (1)	1 (1)	1 (1)
Isolate (species included in the VITEK MS database)				
<i>N. farcinica</i> complex**	12	9 (12)	1 (3)	3 (3)
<i>N. cyriacigeorgica</i>	9	8 (9)	0 (1)	1 (1)
<i>N. nova</i> *	5	5 (5)	-	-
<i>N. africana</i> *	4	4 (4)	-	-
<i>N. brasiliensis</i>	4	4 (4)	-	-
<i>N. otitidiscaviarum</i>	2	2 (2)	-	-
<i>N. beijingensis</i>	2	2 (2)	-	-
<i>N. wallacei</i>	1	1 (1)	-	-
<i>N. veterana</i>	1	1 (1)	-	-
Total	40	36 (40)	1 (4)	4 (4)
Isolate (species not included in the VITEK MS database)				
<i>N. thailandica</i>	2	0 (2)	0 (2)	0 (2)
<i>N. aobensis</i>	1	0*** (1)	0*** (1)	0*** (1)
<i>N. puris</i>	1	0 (1)	0 (1)	0 (1)
<i>N. sputorum</i>	1	0 (1)	0 (1)	0 (1)
<i>N. vinacea</i>	1	0 (1)	0 (1)	0 (1)

To identify all isolates by the VITEK MS, the direct deposit (DD) method was performed. Subsequently, unidentified ones were prepared with 70% formic acid (FA) and the VITEK MS *Mycobacterium/Nocardia* Kit (KIT), respectively, for further identification.

*: *N. africana* and *N. nova* can not be separately identified by the VITEK MS V3.2.

** : *N. farcinica* complex includes *N. farcinica* and *N. kroppenstedtii*.

***: The isolate was identified as *N. africana/N. nova*.

された (Table 1, Isolate (species not included in the VITEK MS database))。

3. 薬剤感受性検査

臨床分離株 14 菌種 46 株および *N. nova* ATCC BAA-2227, *S. aureus* ATCC 29213 の薬剤感受性結果を Table 2 に示す。*N. nova* ATCC BAA-2227, *S. aureus* ATCC 29213 の MIC において、既定の薬剤は精度管理範囲内の MIC を示した。臨床分離株 14 菌種 46 株の薬剤感受性結果を薬剤ごとに見ると、LZD および ST はともに 46 株中 46 株が感性を示し、それに次いで感性の株の割合が高かった薬剤は AMK (46 株中 45 株), IPM (46 株中 40 株), CTRX (46 株中 35 株) であった。一方で、CAM (46 株中 16 株) や MINO (46 株中 12 株) では感性を示す株が少ない傾向にあった。菌種ごとの感受性率を確認するため、同一菌種 (complex を含む) 内で複数の株が分離された 4 菌種 36 株 (*N. farcinica* complex 12 株, *N. nova* complex 11 株, *N. cyriacigeorgica* 9 株, *N. brasiliensis* 4 株) のみを対象にそれぞれの薬剤に対する感性率を算出した (Table 3)。4 菌種全てにおいて MINO の感性率が低い傾向にあったが、CVA/AMPC や CAM, TOB では菌種ごとの感性率に明らかな差異を認めた。

考 察

Nocardia 属菌の菌種同定は従来、形態や生化学的性状に

基づいて行われてきたが、これらの方法は手順が煩雑で長時間を要することに加え、遺伝子検査による同定結果との乖離を指摘されている¹³⁾。また、Brown-Elliott ら¹⁾や矢沢ら¹⁴⁾により考案された薬剤感受性結果に基づく菌種同定法も活用されてきたが、*Nocardia* 属菌には現在 80 種以上もの菌種が存在すると言われており¹⁵⁾、それらを薬剤感受性結果だけで鑑別することは困難を極める。MALDI-TOF MS はデータベースに依存するものの、その迅速性や簡便さから遅発育菌である *Nocardia* 属菌の同定にも有用であることを示す報告¹⁶⁾が増えつつある。本研究では *Nocardia* 属菌の同定精度に関して検証が不十分であった VITEK MS を測定機器とし解析を行ったところ、データベースに収載されている 9 菌種 40 株は全て 16S rRNA 遺伝子解析結果と一致することが確認され、VITEK MS による *Nocardia* 属菌の同定精度は極めて高いことが示された。興味深いことに、解析したデータベース収載菌種 40 株のうち 36 株 (90%) は Direct deposit (DD) によって正確に同定された。本研究同様に *Nocardia* 属菌を用いた MALDI-TOF MS の同定精度を評価した文献において、16S rRNA 遺伝子解析結果との一致率は 78.4% から 90.0%^{17)~19)}との報告があり、これらの結果からも本研究の DD による *Nocardia* 属菌の同定精度は高いと考えられ、*Nocardia* 属菌臨床分離株の多くは前処理を必要としない一般細菌と同じ手法 (DD) を用いることにより日常業務の効率化に

Table 2. The minimal inhibitory concentration of 46 *Nocardia* spp. isolates to the antimicrobials.

Species	Number	MIC ($\mu\text{g/mL}$) *									
		CVA/ AMPC	CTRX	IPM	CAM	MFLX	MINO	TOB	AMK	LZD	ST
Control strain											
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1	$\leq 2/4$ [S]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	≤ 0.5 [S]	≤ 0.5 [S]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. nova</i> ATCC BAA-2227	1	8/16 [I]	2 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	2 [I]	2 [I]	8 [I]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
Isolate											
<i>N. farcinica</i> complex**	1	$\leq 2/4$ [S]	8 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	2 [I]	2 [I]	8 [I]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	$\leq 2/4$ [S]	8 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	2 [I]	2 [I]	8 [I]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	3	$\leq 2/4$ [S]	16 [I]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	1 [S]	2 [I]	8 [I]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	4	$\leq 2/4$ [S]	8 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	19/1 [S]
	5	$\leq 2/4$ [S]	8 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	6	$\leq 2/4$ [S]	4 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	1 [S]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	7	$\leq 2/4$ [S]	32 [I]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	8	$\leq 2/4$ [S]	≥ 64 [R]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	2 [I]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	9	$\leq 2/4$ [S]	32 [I]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	10	$\leq 2/4$ [S]	32 [I]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	11	$\leq 2/4$ [S]	≥ 64 [R]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	12	$\leq 2/4$ [S]	4 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. cyriacigeorgica</i>	1	4/8 [S]	2 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	2 [I]	4 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	4 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	8/16 [I]	2 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	2 [I]	4 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	3	4/8 [S]	2 [S]	≤ 2 [S]	8 [R]	4 [R]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	4	4/8 [S]	2 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	4 [R]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	4 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	5	4/8 [S]	4 [S]	≤ 2 [S]	8 [R]	4 [R]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	6	8/16 [I]	≤ 1 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	2 [I]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	7	8/16 [I]	≥ 64 [R]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	4 [R]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	8	8/16 [I]	8 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	1 [S]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	9	4/8 [S]	2 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	4 [R]	4 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. nova</i>	1	$\geq 16/32$ [R]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	2 [I]	1 [S]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	$\geq 16/32$ [R]	2 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	2 [I]	1 [S]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	3	$\geq 16/32$ [R]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	4 [R]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	4	8/16 [I]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	2 [I]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	5	$\geq 16/32$ [R]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	4 [R]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. africana</i>	1	$\geq 16/32$ [R]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	2 [I]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	8/16 [I]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	4 [R]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	3	$\geq 16/32$ [R]	2 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	1 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	4	8/16 [I]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	2 [I]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. brasiliensis</i>	1	$\leq 2/4$ [S]	16 [I]	≥ 32 [R]	≥ 16 [R]	1 [S]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	$\leq 2/4$ [S]	≥ 64 [R]	≥ 32 [R]	≥ 16 [R]	1 [S]	1 [S]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	3	$\leq 2/4$ [S]	8 [S]	≥ 32 [R]	≥ 16 [R]	1 [S]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	4	$\leq 2/4$ [S]	8 [S]	≥ 32 [R]	≥ 16 [R]	1 [S]	2 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. otitidiscaviarum</i>	1	$\geq 16/32$ [R]	≥ 64 [R]	≥ 32 [R]	≥ 16 [R]	2 [I]	1 [S]	4 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	$\geq 16/32$ [R]	≥ 64 [R]	≥ 32 [R]	≥ 16 [R]	2 [I]	1 [S]	4 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. beijingensis</i>	1	$\geq 16/32$ [R]	≤ 1 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	1 [S]	4 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	$\geq 16/32$ [R]	4 [S]	4 [S]	≤ 1 [S]	2 [I]	4 [I]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	8 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. thailandica</i>	1	8/16 [I]	2 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	1 [S]	1 [S]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
	2	$\geq 16/32$ [R]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	1 [S]	1 [S]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. aobensis</i>	1	$\geq 16/32$ [R]	4 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	4 [R]	1 [S]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. puris</i>	1	4/8 [S]	≤ 1 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	2 [I]	≤ 0.5 [S]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. sputorum</i>	1	$\leq 2/4$ [S]	8 [S]	≤ 2 [S]	≥ 16 [R]	≤ 0.5 [S]	1 [S]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. veterana</i>	1	8/16 [I]	8 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	4 [R]	2 [I]	≥ 16 [R]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. vinacea</i>	1	$\geq 16/32$ [R]	≤ 1 [S]	≤ 2 [S]	≤ 1 [S]	≤ 0.5 [S]	1 [S]	≤ 1 [S]	≤ 4 [S]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]
<i>N. wallacei</i>	1	$\leq 2/4$ [S]	2 [S]	≤ 2 [S]	4 [I]	≤ 0.5 [S]	2 [I]	≥ 16 [R]	32 [R]	≤ 2 [S]	$\leq 9.5/0.5$ [S]

*: Breakpoints are shown from CLSI M62 1st¹²⁾ and susceptibility category (S, susceptible; I, intermediate; R, resistant) in parentheses.

** : *N. farcinica* complex includes *N. farcinica* and *N. kroppenstedtii*.

The abbreviations of antimicrobials mean as follows; CVA/AMPC, clavulanic acid/amoxicillin; CTRX, ceftriaxone; IPM, imipenem; CAM, clarithromycin; MFLX, moxifloxacin; MINO, minocycline; TOB, tobramycin; AMK, amikacin; LZD, linezolid; ST, sulfamethoxazole-trime-thoprim.

Table 3. The antimicrobial susceptibility rates of *N. farcinica* complex, *N. nova* complex, *N. cyriaciageorgica* and *N. brasiliensis*.

Species	Number of isolate	% susceptible*									
		CVA/AMPC	CTRX	IPM	CAM	MFLX	MINO	TOB	AMK	LZD	ST
<i>N. farcinica</i> complex**	12	100	50	100	0	75	8	0	100	100	100
<i>N. nova</i> complex***	11	0	100	100	100	9	27	0	100	100	100
<i>N. cyriaciageorgica</i>	9	56	89	100	0	11	0	100	100	100	100
<i>N. brasiliensis</i>	4	100	50	0	0	100	25	100	100	100	100
All	36	58	75	89	31	42	14	36	100	100	100

*: Breakpoints were defined according to CLSI M62 1st¹²⁾.

** : *N. farcinica* complex includes *N. farcinica* and *N. krippenstedtii*.

*** : *N. nova* complex includes *N. aobensis*, *N. africana*, *N. nova*, *N. veterana*.

The abbreviations of antimicrobials mean as follows; CVA/AMPC, clavulanic acid/amoxicillin; CTRX, ceftriaxone; IPM, imipenem; CAM, clarithromycin; MFLX, moxifloxacin; MINO, minocycline; TOB, tobramycin; AMK, amikacin; LZD, linezolid; ST, sulfamethoxazole-trimethoprim.

も繋がること示唆された。DDで同定不可と判定された4株のうち、簡易的なギ酸 (FA) による前処理では1株しか同定できなかったのに対し、VITEK MS *Mycobacterium/Nocardia* Kit (KIT) を用いた前処理は全て正確に同定された。この差異の要因にはKITによる前処理の最適化の他に、前処理に用いた菌量の違いが影響したと考えられる。Khot⁶⁾らは培養時間がMALDI-TOF MSによる *Nocardia* 属菌の同定に及ぼす影響について検討しており、18-48時間培養した菌を用いることでより同定率が高まることを報告している。今回、DDで一部の株が同定されなかった *N. farcinica* complex と *N. cyriaciageorgica* について詳細な検討は行っていないが、これらの菌種は他の *Nocardia* 属菌に比べコロニー形成が速かった傾向にあり、同定に適したマススペクトルが得られにくい基生菌糸量の比率が増え、より少量の菌塊を採取し前処理を行ったFAでその影響を強く受けたことが考えられた。データベース未掲載の5菌種6株のうち、*N. aobensis* 1株はDD、FAおよびKITのどの方法でも *N. africana/nova* と同定されたが、これは本菌が *N. nova* complex に含まれるためVITEK MSでは鑑別困難であったと推測される⁸⁾。これらVITEK MSによる全ての同定結果を鑑みると、日常検査において *Nocardia* 属菌を疑うコロニーを分離した際は、まずDDによる同定を試み、同定できなかった場合にはKITによる前処理後に再試行することにより更なる同定精度の向上に寄与すると考えられた。

ノカルジア症の第一選択薬はSTであるが、本剤は皮疹や腎障害などの副作用が発現しやすいこと、近年では耐性化の報告²⁰⁾もあることから薬剤感受性結果に基づいた抗菌薬の選択は重要である。また、治療は少なくとも6ヵ月、免疫不全者や中枢神経系への播種を認めた場合は1年以上に及ぶため、外来での治療を考慮しCVA/AMPCやCAMなどの内服薬の薬剤感受性結果を報告することは臨床的意義が高いと考える。今回検討した *Nocardia* 属菌臨床分離株において、LZDおよびSTに耐性を示す株は認められなかったが、その他の薬剤では菌種により薬剤感受性結果に差が認められた。今回、検討株数が比較的多く得られた菌種 (*N. farcinica* complex 12株、*N. nova* complex 11株、*N. cyriaciageorgica* 9株、*N. brasiliensis* 4株) の薬剤感受性検査では、CVA/AMPCに

おいて、*N. nova* complex は検討した株全て非感性を示し、他の菌種と異なる薬剤感受性パターンを示した。*Nocardia* 属菌のβ-ラクタム系抗菌薬への耐性機序の一つとしてクラスA型β-ラクタマーゼの活性が報告されており、CVAなどの阻害剤により酵素活性が阻害される。しかし、Wallaceら²¹⁾は *N. nova*、*N. africana* がAMPC単剤では誘導されないが、CVAで誘導される誘導性膜結合ペニシリンナーゼ活性を有することを明らかにしており、今回の結果はCVA/AMPCに対する *N. nova* complex の自然耐性の一つと考えられた。本検討における菌種ごとの薬剤感受性パターンは、Lebeauxら²²⁾やToyokawaら²³⁾と同様の傾向であったが、Brown-Elliottら¹⁾やCLSI M62-1st¹²⁾によると、*N. cyriaciageorgica* はCTRXに感性が期待されているが、本検討では9株中1株が耐性を示した。McTaggartら²⁴⁾による *Nocardia* 属149株の薬剤感受性パターン解析においても、*N. cyriaciageorgica* 20株中1株がCTRXに耐性を示したことを報告している。*Nocardia* 属菌は抗菌薬への耐性化傾向が強く、近年ではβ-ラクタマーゼ以外の酵素活性²⁵⁾やプラスミド性耐性遺伝子の獲得²⁶⁾といった薬剤耐性機構が明らかにされつつある。本研究では既報の薬剤感受性パターンと異なる結果を示した株は *N. cyriaciageorgica* 1株のみであり耐性機構の解析には至っていないが、これは *Nocardia* 属菌においても菌種同定だけではなく薬剤感受性検査まで実施することの重要性を再認識させる結果であると考えられる。

本研究で使用した *Nocardia* 属菌臨床分離株はVITEK MS データベース V3.2 に記載された16菌種のうち9菌種のみを検討であり、今後更なる菌株の収集と解析が必要である。しかし、本研究の成果は臨床で分離頻度が高い *Nocardia* 属菌においてVITEK MSは16S rRNA 遺伝子解析と同等の同定精度を有することを示し、適切な前処理の選択が更なる精度向上に寄与することが示された。また、*Nocardia* 属菌は菌種により薬剤感受性パターンが異なることや、獲得耐性を示す株の出現も考慮すると同定検査と併せて薬剤感受性検査も実施することが望まれる。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) Brown-Elliott, B. A., J. M. Brown, P. S. Conville, et al. 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 259-282.
- 2) 中野真依, 東直人, 谷名, 他. 2021. 多発血管炎性肉芽腫症の経過中にノカルジア肺炎を呈した一例～培養検査と菌種同定の重要性～. *臨床リウマチ* 33: 113-120.
- 3) Uhde, K. B., S. Pathak, I. McCullum Jr, et al. 2010. Antimicrobial-resistant *Nocardia* isolates, united states, 1995-2004. *Clin. Infect. Dis.* 51: 1445-1448.
- 4) Segawa, S., M. Nishimura, K. Sogawa, et al. 2015. Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Proteomics.* 12: 6.
- 5) Marin, M., A. Ruiz, C. Iglesias, et al. 2018. Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 24: 1342.e5-1342.e8.
- 6) Khot, P. D., B. A. Bird, R. J. Durrant, et al. 2015. Identification of *Nocardia* species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 53: 3366-3369.
- 7) 大楠清文. 2013. いま知りたい 臨床微生物検査実践ガイド 珍しい細菌の同定・遺伝子検査・質量分析, p. 100-117, 医歯薬出版, 東京.
- 8) Conville, P. S., B. A. Brown-Elliott, T. Smith, et al. 2018. The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. *J. Clin. Microbiol.* 56: 1-10.
- 9) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing. Approved guideline, CLSI document MM18-A, CLSI, Wayne, PA.
- 10) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* spp., and Other Aerobic *Actinomycetes*, M24, 3rd ed. CLSI, Wayne, PA.
- 11) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 29th information supplement, CLSI, Wayne, PA.
- 12) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2018. Performance standards for susceptibility testing of *Mycobacteria*, *Nocardia* spp., and other aerobic *Actinomycetes*, M62, 1st Edition. CLSI, Wayne, PA.
- 13) 渋谷理恵, 舘田一博, 木村聡一郎, 他. 2006. ノカルジア属細菌の分子生物学的同定法と抗菌薬感受性に関する検討. *日臨微誌* 16: 81-88.
- 14) 矢沢勝清, 三上 襄. 2001. ノカルジアの検査法. *検査と技術* 29: 111-119.
- 15) Rahim, Y., J. Khan, S. Shahid, et al. 2023. Clinical characteristics, outcomes, and factors associated with mortality in *Nocardia* pneumonia: 18 years' real-world data from a tertiary care hospital in Karachi, Pakistan. *Respir. Investig.* 61: 254-260.
- 16) 佐々原正幸, 斎藤充史, 宮坂友紀, 他. 2021. MALDI-TOF MSを用いて *Nocardia otitidiscaviarum* を同定した肺ノカルジア症の1例. *感染症学雑誌* 95: 17-20.
- 17) Hodille, E., C. Prudhomme, O. Dumitrescu, et al. 2023. Rapid, Easy, and Reliable Identification of *Nocardia* sp. by MALDI-TOF Mass Spectrometry, VITEK[®]-MS IVD V3.2 Database, Using Direct Deposit. *Int. J. Mol. Sci.* 24: 5469.
- 18) Liu, Y., S. Y. Wu, J. Deng, et al. 2024. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *BMC. Microbiol.* 24: 358.
- 19) Buckwalter, S. P., S. L. Olson, B. J. Connelly, et al. 2016. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and Other Aerobic *Actinomycetes*. *J. Clin. Microbiol.* 54: 376-384.
- 20) 森永朝美, 大楠清文, 浅野裕子, 他. 2013. *Nocardia farcinica* が分離・同定された7症例の臨床細菌学的検討. *日臨微誌* 23: 51-58.
- 21) Wallace, R. J., B. A. Brown, M. Tsukamura, et al. 1991. Clinical and laboratory features of *Nocardia nova*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 2407-2411.
- 22) Lebeaux, D., E. Bergeron, J. Berthet, et al. 2019. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010-2015. *Clin. Microbiol. Infect.* 25: 489-495.
- 23) Toyokawa, M., N. Ohana, A. Ueda, et al. 2021. Identification and antimicrobial susceptibility profiles of *Nocardia* species clinically isolated in Japan. *Sci. Rep.* 11: 16742.
- 24) McTaggart, L. R., J. Doucet, M. Witkowska, et al. 2014. Antimicrobial susceptibility among clinical *Nocardia* species identified by multilocus sequence analysis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59: 269-275.
- 25) 三上 襄. 2010. 病原性放線菌の分類学的研究と新たな研究展開. *真菌誌* 51: 179-192.
- 26) Valdezate, S., N. Garrido, G. Carrasco, et al. 2015. Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains. *Front. Microbiol.* 6: 376.

Accuracy of *Nocardia* species identification by the VITEK MS Mass Spectrometer and Antimicrobial Susceptibilities of the *Nocardia* Isolates obtained at Kyushu University Hospital

Mai Ohno¹⁾, Makiko Kiyosuke¹⁾, Masamune Aihara^{1) 2)}, Yuka Yamashita¹⁾, Taeko Hotta¹⁾, Yuya Kunisaki¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Kyushu University Hospital

²⁾Department of Health Sciences, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Rapid identification of *Nocardia* spp. is helpful for the diagnosis of nocardiosis and the empirical treatment. In the clinical laboratories, the VITEK MS mass spectrometer is widely used for rapid identification of pathogens. However, the accuracy of *Nocardia* spp. identification by VITEK MS and the appropriate pretreatments of *Nocardia* isolates before VITEK MS analysis has not been evaluated.

Sulfamethoxazole-trimethoprim (ST) has long been the monotherapy treatment of choice, but resistance to this treatment has recently emerged. In this study, we confirmed the evaluation of identification performance and drug susceptibility of 46 isolates from Kyushu University Hospital. By 16S rRNA gene sequencing, 40 out of the 46 isolates were determined as the species listed in the VITEK MS Version 3.2 database. VITEK MS accurately identified thirty-six isolates (90%) by direct deposit. The four isolates unidentified by direct deposit were pretreated with 70% formic acid on the target slides and with the VITEK MS *Mycobacterium/Nocardia* Kit, respectively, for further VITEK MS identification. While one of the four isolates was successfully identified by the former pretreatment, the latter pretreatment resulted in the accurate identification of all four isolates. All the 46 isolates were susceptible to linezolid and ST. One of the nine isolates identified as *Nocardia cyriacigeorgica*, which expected to be susceptible to ceftriaxone, showed resistance to the drug. These findings reveal that VITEK MS can accurately identify the *Nocardia* isolates at the species levels and the appropriate pretreatment method increases its identification performance. The presence of acquired resistance, although in small numbers, it was shown that antimicrobial susceptibility testing is necessary in addition to identification testing for treatment.