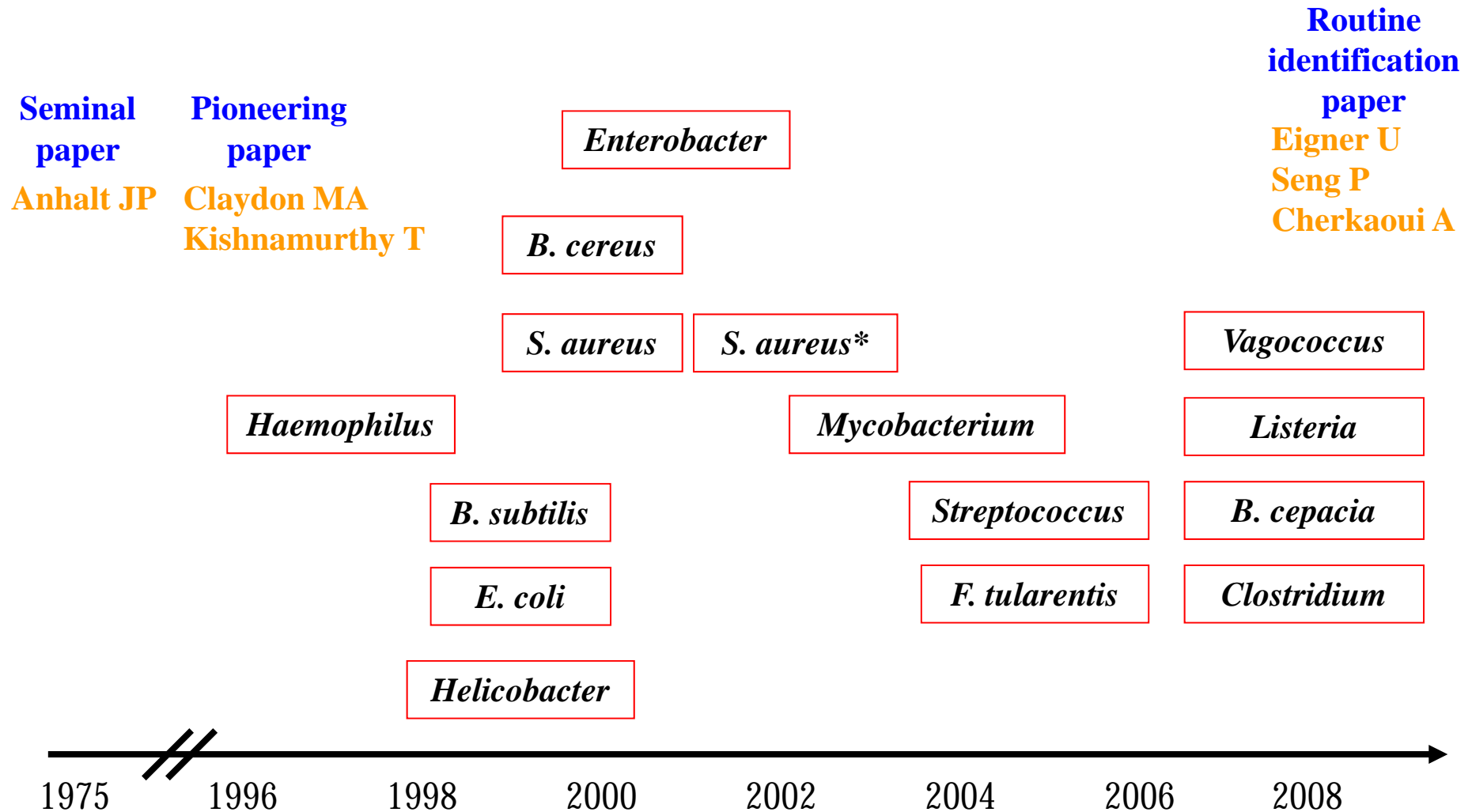


# 質量分析計を用いた迅速同定 について

千葉大学医学部附属病院検査部

渡邊正治

# 質量分析計を用いた細菌同定

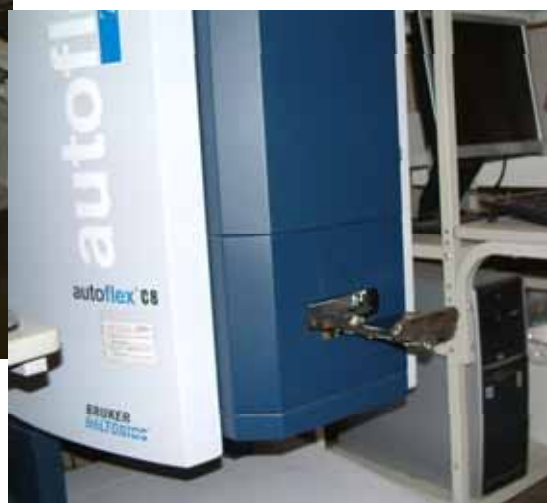


(Seng P, et al. *Clinical Infectious Diseases*. 2009 一部改訂)

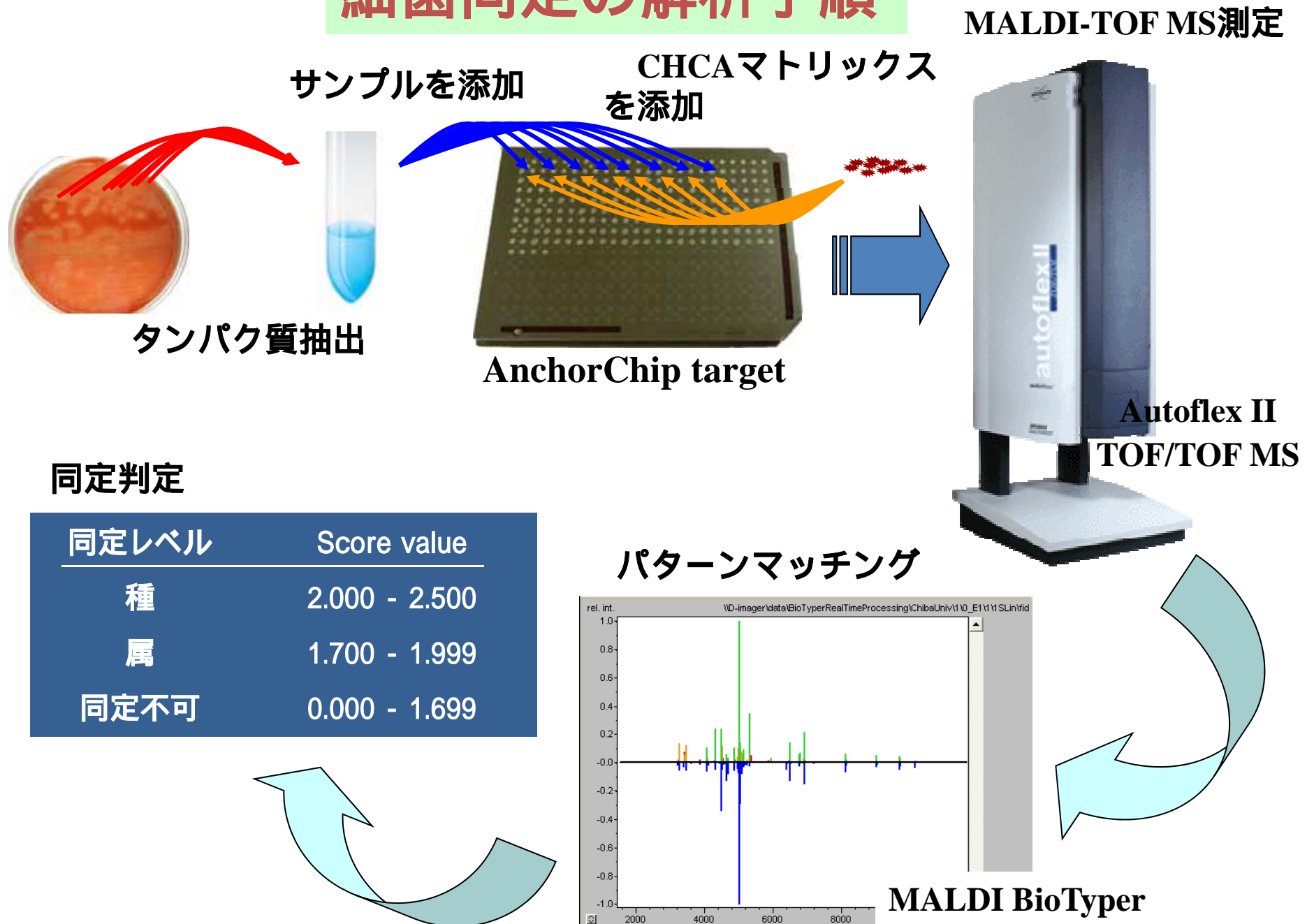
# 背景

- 従来細菌の同定には、主に形態学的手法(グラム染色、コロニーの形状やその大きさ)や生化学的手法が用いられる。いずれの手法も煩雑な作業であり高い専門性が要求される。また、グラム染色により使用キットを変更する必要がある。
- 高い識別能力がある16S rRNAを指標とする手法は、多くの検体を一度に解析することは難しく、日常的に用いることは困難でありコストがかかる。

# 当院の基礎教室にある機械

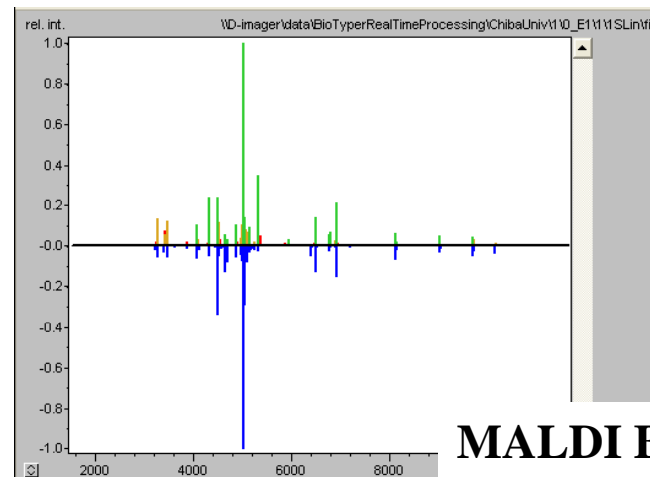


# 細菌同定の解析手順

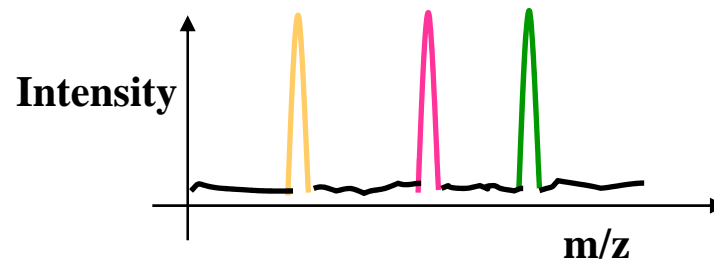
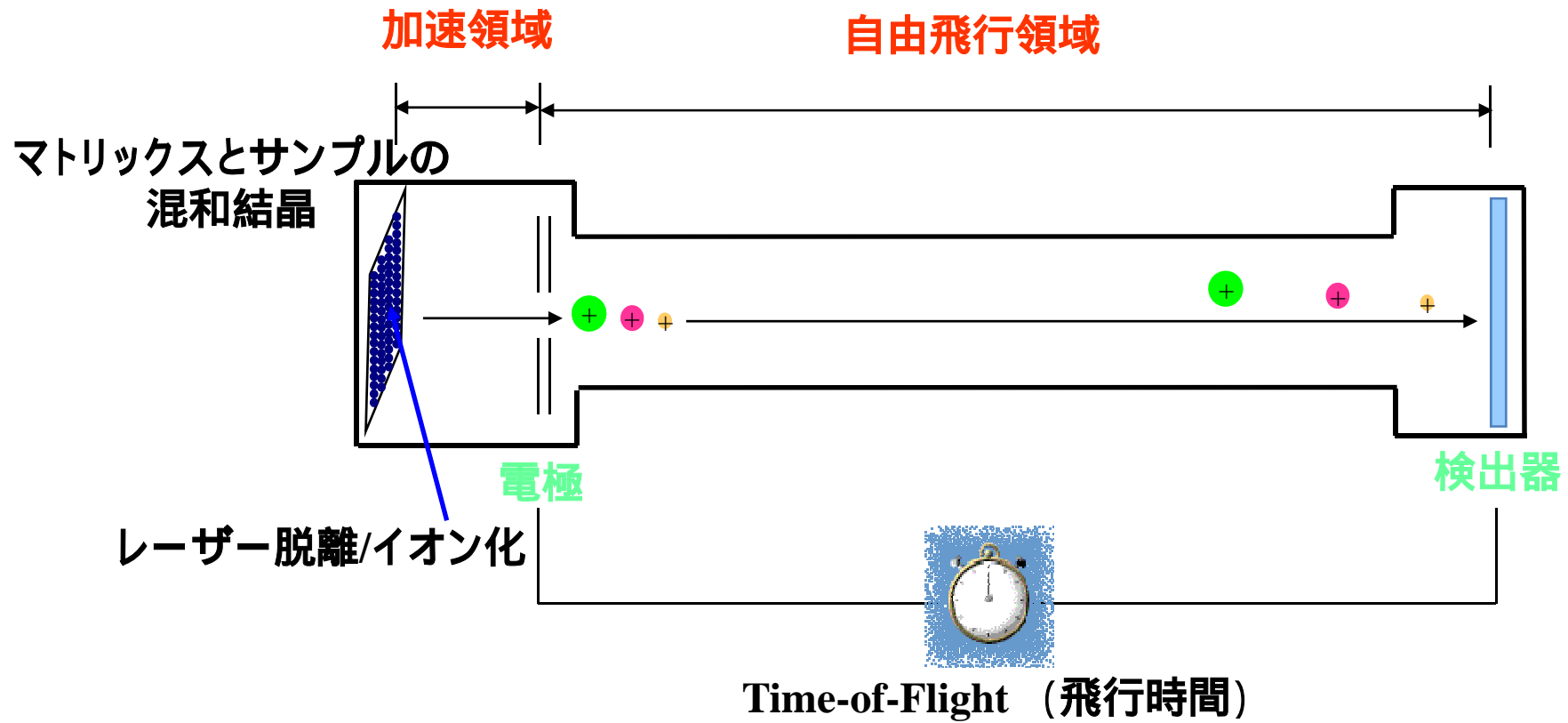


## 同定判定

同定レベル	Score value
種	2.000 - 2.500
属	1.700 - 1.999
同定不可	0.000 - 1.699



# 測定原理

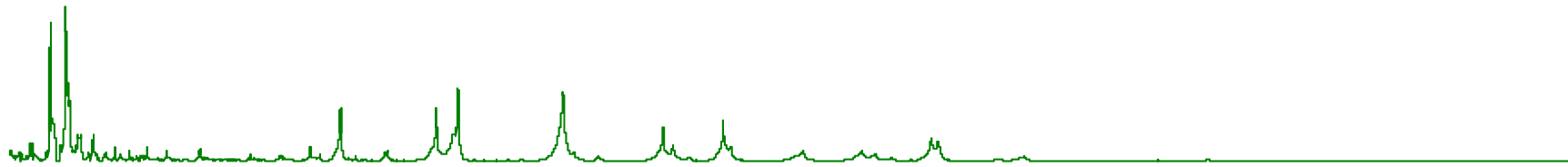


# 質量分析計で得られるマススペクトルの典型例

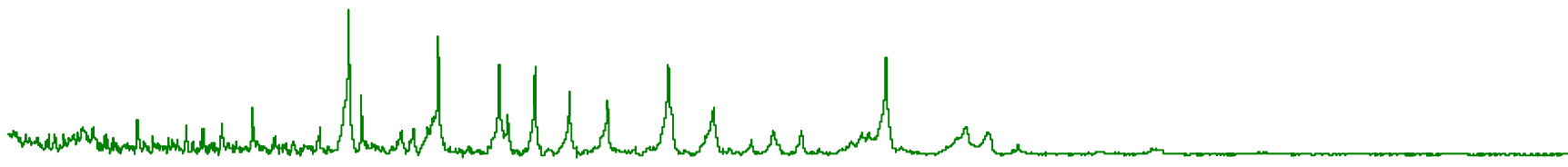
*Escherichia coli*



*Klebsiella pneumoniae*



*Pseudomonas aeruginosa*



*Staphylococcus aureus*



2000

4000

6000

8000

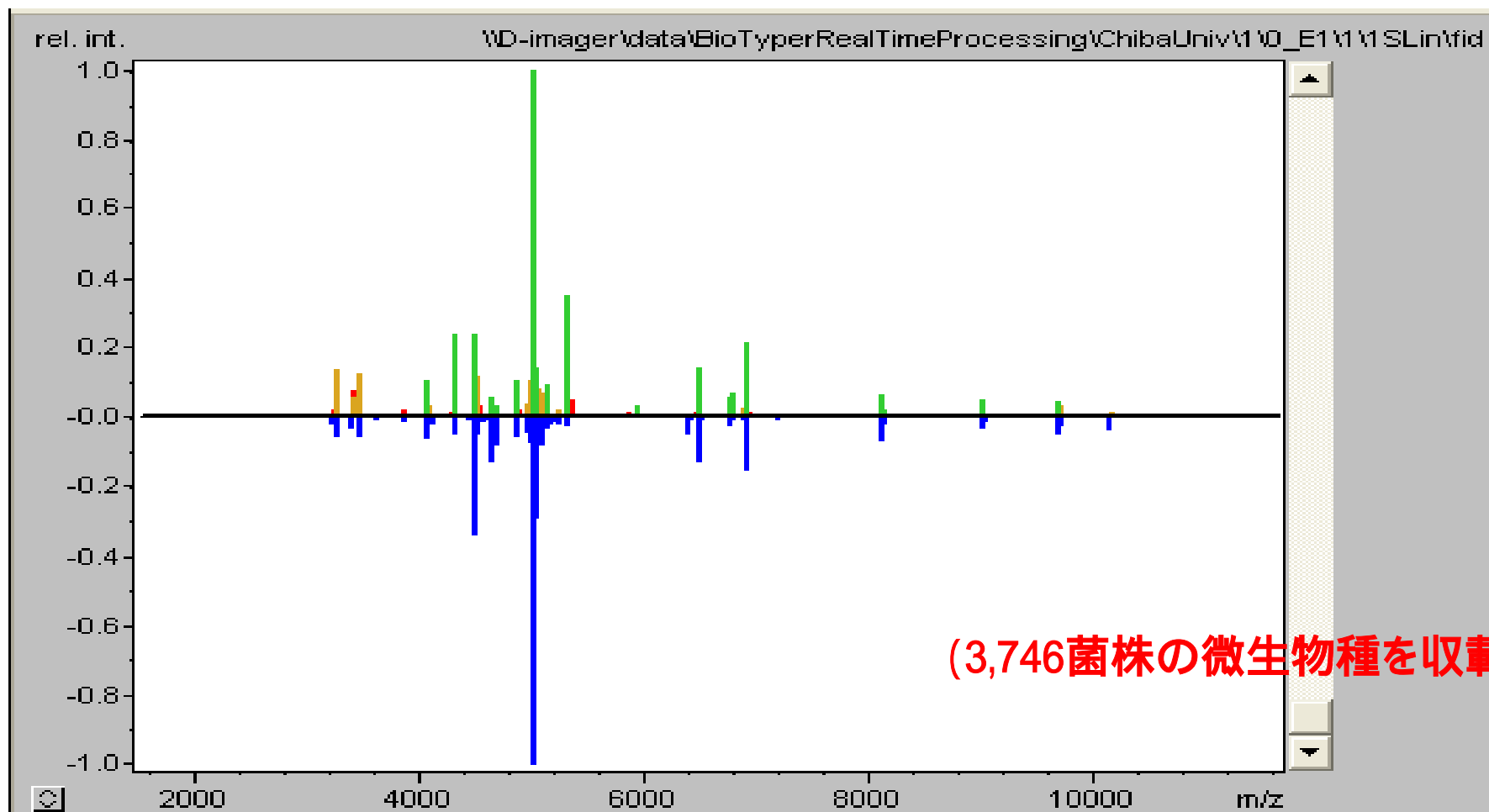
10000

12000

14000

m/z

# パターンマッチングにより同定



Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Escherichia coli MB11464-1_CHB	<a href="#">2.384</a>	<a href="#">562</a>
2 (++)	Escherichia coli ATCC 25922 THL	<a href="#">2.299</a>	<a href="#">562</a>



# 検討内容

1. タンパク質抽出試料による細菌同定
2. 直接コロニーから細菌同定
  - 再現性
  - 培養日数
  - 臨床分離株による細菌同定
3. 血液培養から細菌同定

# 対象検体

千葉大学医学部附属病院検査部で分離された39菌種50株

# 方法

1. 培養したコロニーを蟻酸で処理した後、アセトニトリルを加え、遠心後上清を試料とする
2. 試料をターゲットプレートに乗せ、CHCAマトリックス溶液を添加後、MALDI-TOF MSで測定
3. データ解析はMALDI BioTyper™ 2.0ソフトウェアを用い、ライブラリーとのパターンマッチングにより微生物の同定を行う

# サンプルの前処理

培地上のコロニー (5 ~ 10mg、菌数で $10^5$ 個程度) を掻き取り、300 $\mu$ l D.W.に混ぜ、その後900 $\mu$ l エタノールを加え、混合する。

遠心後、上清を捨て、50 $\mu$ l 70%蟻酸を加え、混合する。

50 $\mu$ l アセトニトリルを加え、混合後遠心。上清を試料とする。

1 $\mu$ l 試料をターゲットプレートに乗せ、乾燥した後、1 $\mu$ l  $\alpha$  シアノ 4 ヒドロキシケイ皮酸 ( $\alpha$  CHCA) マトリックス溶液を添加する。

乾燥後、MALDI-TOF MSで測定

No.	Species	MALDI biotyper	No. of isolates with results			
			No. of isolates	Matching at the species level	Matching at the genus level	Nonmatching
1	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	1	1		
2	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	1	1		
3	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	1	1		
4	<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1		1	
5	<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>	1	1		
6	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	1	1		
7	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	1	1		
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	2	2		
9	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	1	1		
10	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	2	2		
11	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	1		
12	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	2	2		
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2		
14	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	1		1	
15	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	1	1		
16	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	1		
17	<i>Moraxella(B.)catarrhalis</i>					
18	<i>Pasteurella multocida</i>					
19	<i>Plesiomonas shigelloides</i>					
20	<i>Propionibacterium acnes</i>					
21	<i>Proteus mirabilis</i>					
22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>					
23	<i>Salmonella</i> sp.					
24	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	1	1		
25	<i>Shigella</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>	1			1
26	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	4		
27	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	1		
28	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	2	2		
29	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	2	2		
30	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1		1	
31	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	2		
32	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	1		
33	<i>Vibrio cholerae non-OI(NAG)</i>	<i>Vibrio albensis</i>	1		1	
34	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio furnissii</i>	1		1	
35	<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	1	1		
36	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1		
37	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	1	1		
38	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1		
39	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	1		
			50	44	5	1

種レベルの同定: 89.8%  
 属レベルの同定: 98.0%

# 検討内容

1. タンパク質抽出試料による細菌同定
2. 直接コロニーから細菌同定
  - 再現性
  - 培養日数
  - 臨床分離株による細菌同定
3. 血液培養から細菌同定

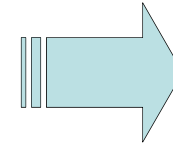
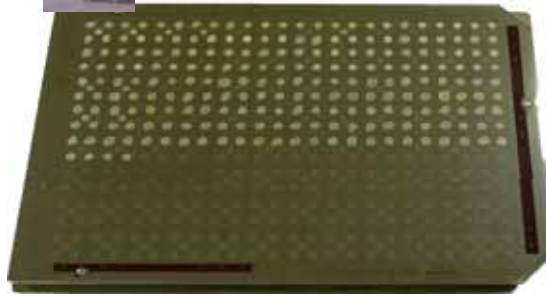
# 方法

マトリックスを添加

コロニーを釣菌



ターゲットプレートに薄く塗布



ターゲットプレート

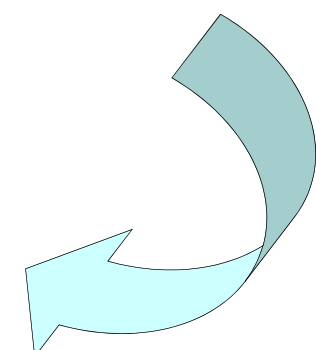
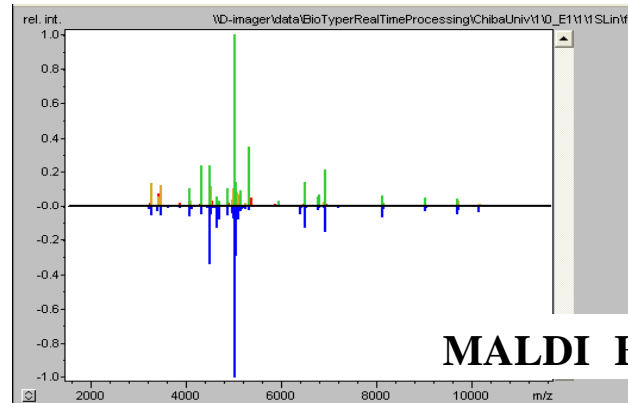
## 同定結果

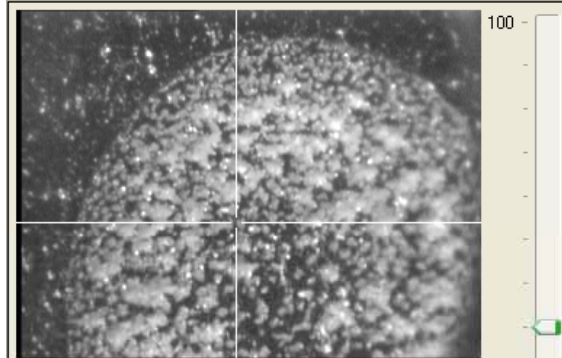
Detected Species	Log...
● Staphylococcus haemolyticus DSM 20...	2.354
● Staphylococcus haemolyticus 10024 C...	2.309
● Staphylococcus haemolyticus DSM 20...	2.301
● Staphylococcus haemolyticus DSM 20...	2.174
● Staphylococcus haemolyticus Mb1880...	2.102
● Staphylococcus haemolyticus 19 ESL	2.095
● Staphylococcus haemolyticus DSM 20...	1.813
● Staphylococcus capitis ssp capitis DS...	1.634
● Staphylococcus capitis ssp capitis DS...	1.455
● Staphylococcus simulans DSM 20723 ...	1.451

## 同定判定

同定レベル	Score value
種	2.000 - 2.500
属	1.700 - 1.999
同定不可	0.000 - 1.699

## パターンマッチング



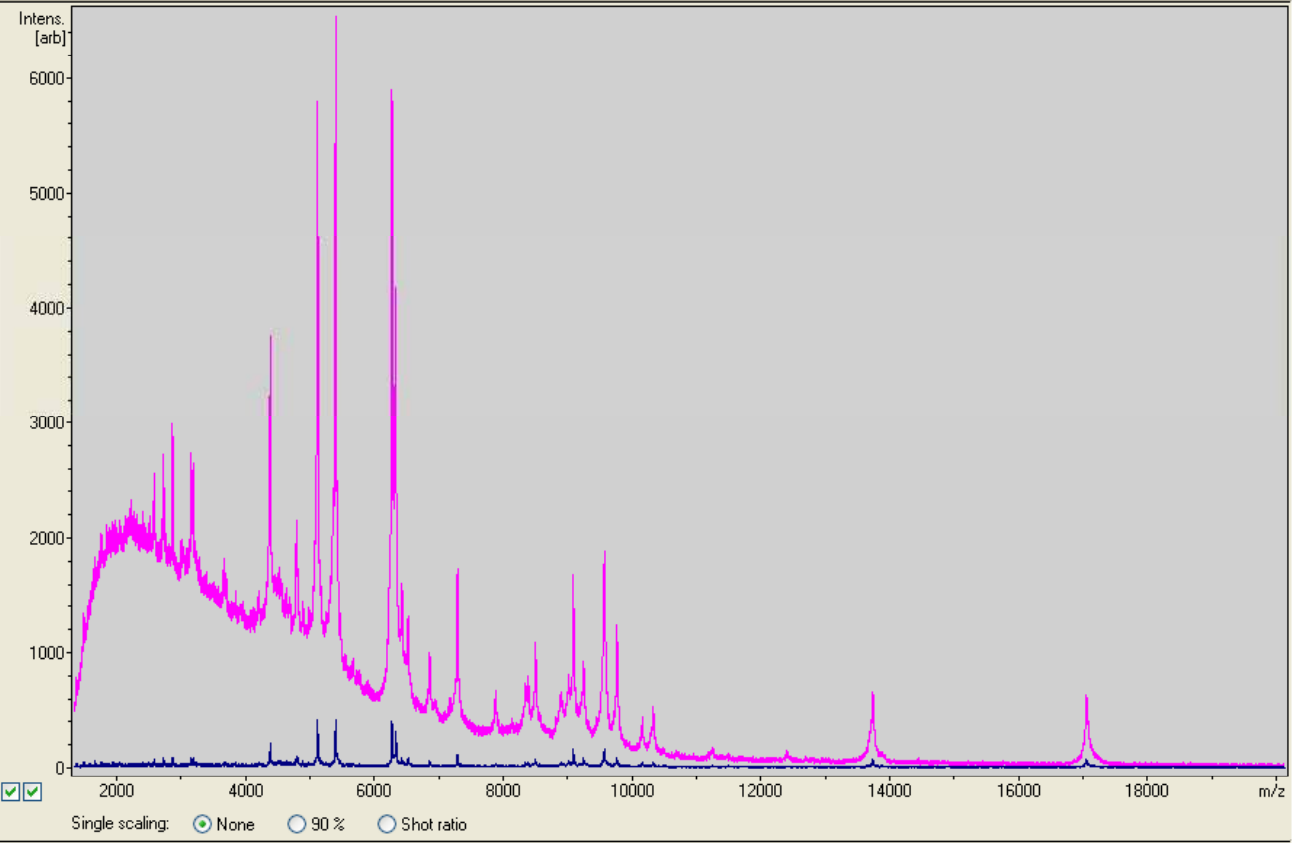


Clear Sum Start Save  
Undo Add Save As...  
Shots: 40 / 50 Added: 560 Freq: 20.0 30 %

	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19	21	23
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
I	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
K	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
M	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
O	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Chip: 0  
Chip: 1

Spot: 017:1 Geometry: MTP BigAnchor 384  
Carrier: T\_0254454\_0000144\_17  
flexControl: BTS\_FC.par Select Method



Single scaling:  None  90 %  Shot ratio

AutoXecute Sample Carrier Spectrometer Detection Processing Setup Calibration Status

Method: BioTyper Edit... New... Run method on current spot

Run: D:\Methods\AutoXSequences\b9f39459-c8a Load... Edit... New... Start automatic Run

Show Output Settings... Pause Run

Prepared For Calibration MS Measured MS/MS Measured Aborted Flatline Spectrum

## MALDI BioTyperによるマッチングの結果

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">1671</a> (++)	Mycobacterium fortuitum	<a href="#">2.031</a>	Mycobacterium fortuitum	<a href="#">1.82</a>
<a href="#">1671</a> (+)	Mycobacterium fortuitum	<a href="#">1.911</a>	Mycobacterium fortuitum	<a href="#">1.887</a>
<a href="#">1782</a> (+++)	Escherichia coli	<a href="#">2.359</a>	Escherichia coli	<a href="#">2.178</a>
<a href="#">1782</a> (+++)	Escherichia coli	<a href="#">2.4</a>	Escherichia coli	<a href="#">2.237</a>
<a href="#">2073</a> (-)	not reliable identification	<a href="#">1.58</a>	not reliable identification	<a href="#">1.579</a>
<a href="#">2073</a> (++)	Acinetobacter genomospecies	<a href="#">2.084</a>	Acinetobacter genomospecies	<a href="#">2.03</a>
<a href="#">2078</a> (+)	Acinetobacter genomospecies	<a href="#">1.756</a>	not reliable identification	<a href="#">1.674</a>
<a href="#">2078</a> (+)	Acinetobacter genomospecies	<a href="#">1.899</a>	Acinetobacter genomospecies	<a href="#">1.802</a>



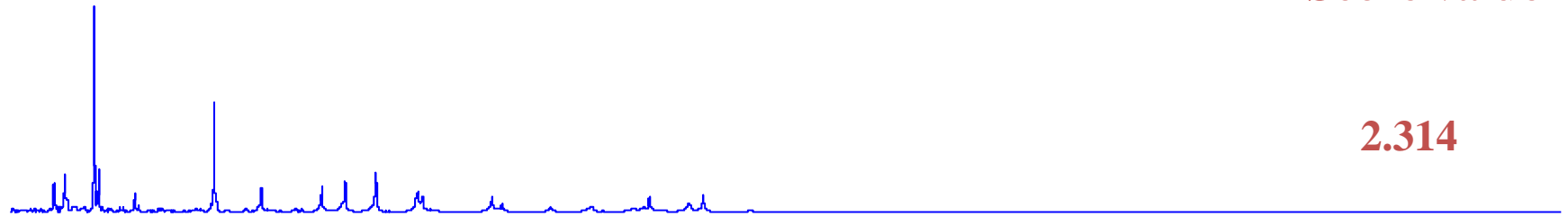
# 検討内容

1. タンパク質抽出試料による細菌同定
2. 直接コロニーから細菌同定
  - 再現性
  - 培養日数
  - 臨床分離株による細菌同定
3. 血液培養から細菌同定

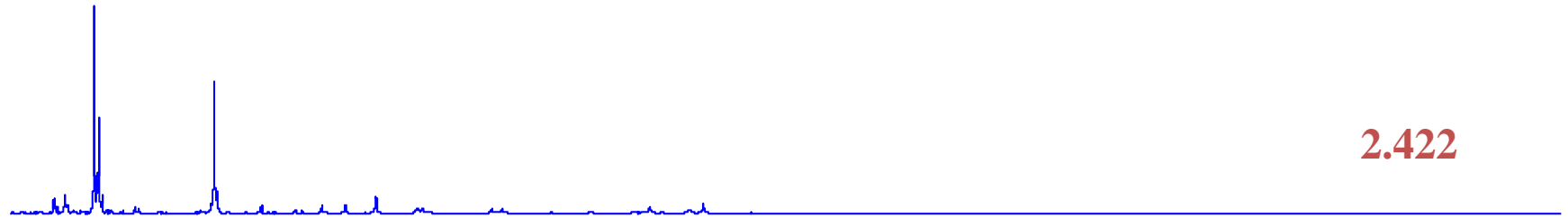
# 再現性1

*Escherichia coli*

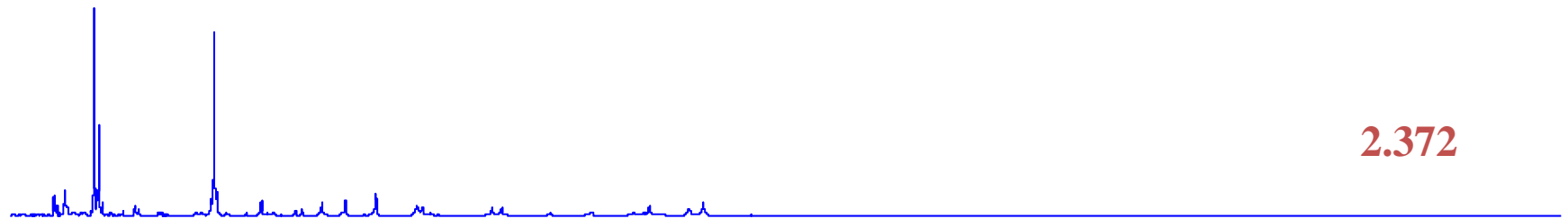
Score value



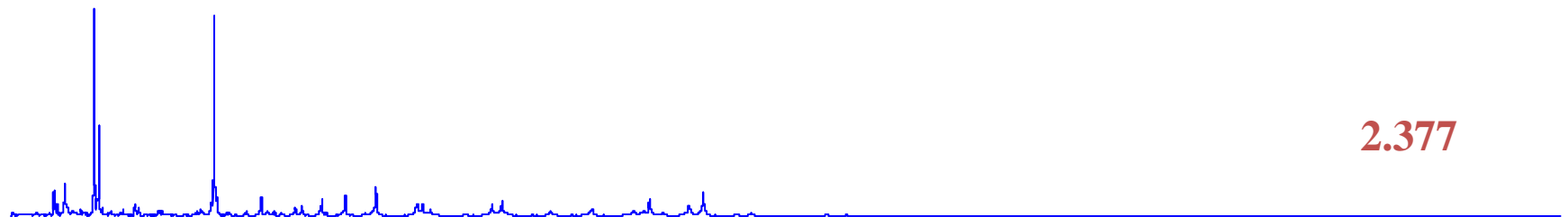
2.314



2.422



2.372



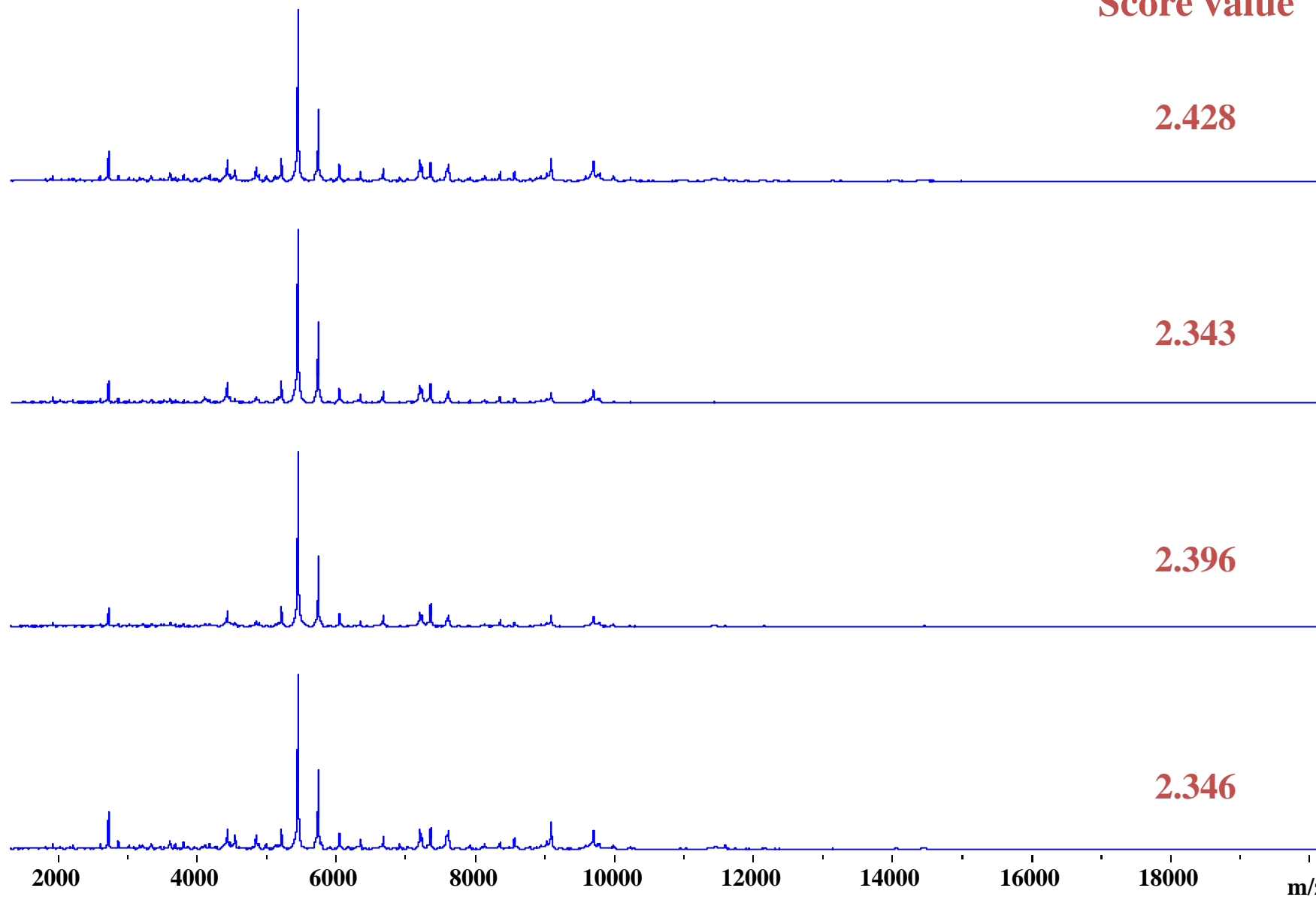
2.377

2000 4000 6000 8000 10000 12000 14000 16000 18000 m/z

# 再現性2

*Pseudomonas aeruginosa*

Score value

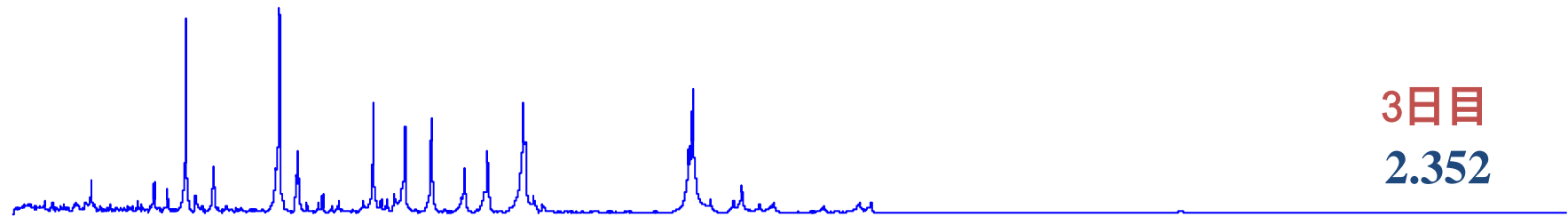
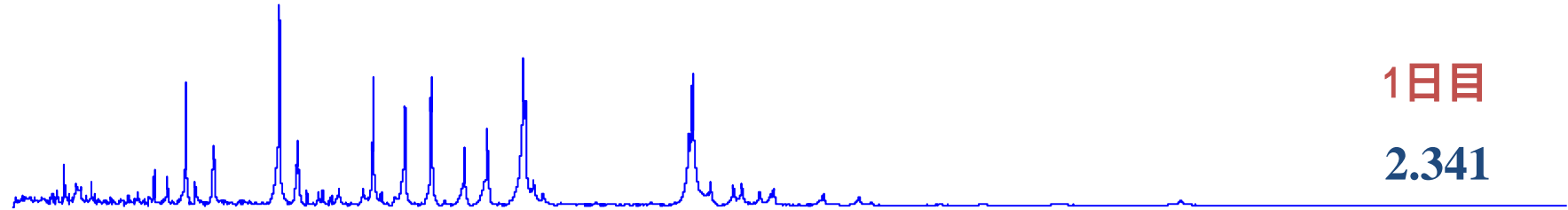


# 検討内容

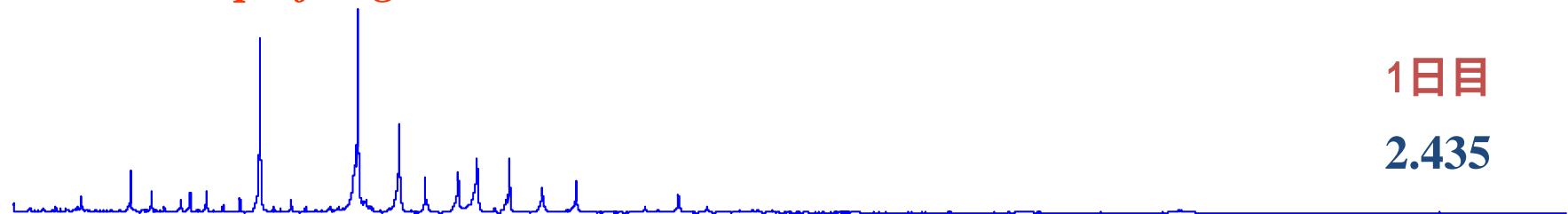
1. タンパク質抽出試料による細菌同定
2. 直接コロニーから細菌同定
  - 再現性
  - **培養日数**
  - 臨床分離株による細菌同定
3. 血液培養から細菌同定

# 培養日数の影響

*Prevotella buccae*



*Clostridium perfringens*



2000 4000 6000 8000 10000 12000 14000 16000 18000 m/z

# 検討内容

1. タンパク質抽出試料による細菌同定
2. 直接コロニーから細菌同定
  - 再現性
  - 培養日数
  - 臨床分離株による細菌同定
3. 血液培養から細菌同定

# 【結果1】腸内細菌(ビブリオを含む)

菌名	株数	一致	属一致	不一致	同定不能
<i>Citrobacter braakii</i>	1	1			
<i>Citrobacter freundii</i>	9	9			
<i>Edwardsiella tarda</i>	3	3			
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8	8			
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	8	<i>Enterobacter kobei</i> (1) <i>Enterobacter ludwigii</i> (2) <i>Enterobacter asburiae</i> (1)		
<i>Escherichia coli</i>	44	44			
<i>Escherichia vulneris</i>	1	1			
<i>Klebsiella oxytoca</i>	11	10		<i>Raoultella ornithinolytica</i> (1)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22	21			1(ムコイド株)
<i>Morganella morganii</i>	3	3			
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1			
<i>Proteus mirabilis</i>	6	6			
<i>Proteus vulgaris</i>	6	6			
<i>Providencia rettgeri</i>	1	1			
<i>Serratia marcescens</i>	7	7			
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	1			
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	1	1			
<i>Aeromonas caviae</i>	1	1			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1			
<i>Aeromonas hydrophila</i> group	5	5			
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1(NAG)	1	0	<i>Vibrio albensis</i> (1)		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1	1			
合計	146	139	5	1	1

## 【結果2】ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌

菌名	株数	一致	不一致	同定不能
<i>Acinetobacter sp.</i>	3	3		
<i>Alcaligenes faecalis</i>	2	2		
<i>Delftia acidovorans</i>	1	1		
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1	1		
<i>Myroides odoratus</i>	4	4		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38	37		1(ムコイド株)
<i>Rothia dentocariosa</i>	1	1		
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	3	2		1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18	13	<i>Pseudomonas beteli</i> (2) <i>Pseudomonas hibiscicola</i> (2) <i>Pseudomonas geniculata</i> (1)	
合計	71	64	5	2



## MALDI BioTyperによるマッチングの結果

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<a href="#">H21</a> ( ++ )	Pseudomonas hibiscicola	<a href="#">2.22</a>	Pseudomonas beteli	<a href="#">2.008</a>
<a href="#">H22</a> ( ++ )	Pseudomonas hibiscicola	<a href="#">2.212</a>	Stenotrophomonas maltophilia	<a href="#">2.095</a>

# MALDI BioTyperによるマッチングの詳細

## H21

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value
1 ( ++ )	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> LMG 980T HAM	<a href="#"><u>2.22</u></a>
2 ( ++ )	<i>Pseudomonas beteli</i> LMG 978T HAM	<a href="#"><u>2.008</u></a>
3 ( + )	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 058_Galv14 NFI	<a href="#"><u>1.933</u></a>
4 ( + )	<i>Pseudomonas geniculata</i> LMG 2195T HAM	<a href="#"><u>1.908</u></a>

### 【結果3】ブドウ球菌

菌名	株数	一致
<i>Staphylococcus aureus</i>	44	44
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	3
<i>Staphylococcus caprae</i>	1	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	30	30
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7	7
<i>Staphylococcus hominis</i>	3	3
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	1
合計	91	91

## 【結果4】レンサ球菌

菌名	株数	一致	属一致	同定不能
<i>Enterococcus avium</i>	2	2		
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	4	0	<i>Enterococcus phoeniculicola</i> (4)	
<i>Enterococcus faecalis</i>	31	31		
<i>Enterococcus faecium</i>	16	16		
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	1		
<i>Enterococcus raffinosus</i>	3	3		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	2	2		
<i>Streptococcus anginosus</i>	3	3		
<i>Streptococcus bovis</i>	1	0	<i>Streptococcus pasteurianus</i> (1)	
<i>Streptococcus constellatus</i>	1	1		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	3	3		
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	1		
<i>Streptococcus mitis</i>	1	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (1)	
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2	1	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (1)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	9	8		1(Δコイド株)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	3		
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	1		
<i>Granulicatella adiacens</i>	4	4		
合計	88	80	7	1

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 ( ++ )	Enterococcus phoeniculicola DSM 14726T DSM	<a href="#">2.071</a>	<a href="#">154621</a>
2 ( + )	Enterococcus casseliflavus DSM 7371 DSM	<a href="#">1.995</a>	<a href="#">37734</a>
3 ( + )	Enterococcus casseliflavus DSM 7372 DSM	<a href="#">1.995</a>	<a href="#">37734</a>
4 ( + )	Enterococcus casseliflavus DSM 20382 DSM	<a href="#">1.948</a>	<a href="#">37734</a>
5 ( + )	Enterococcus casseliflavus DSM 20680T DSM	<a href="#">1.857</a>	<a href="#">37734</a>
6 ( + )	Enterococcus cecorum DSM 20683 DSM	<a href="#">1.733</a>	<a href="#">44008</a>

## 【結果5】嫌気性菌

菌名	株数	一致	属一致	同定不能
<i>Bacteroides fragilis</i>	9	9		
<i>Bacteroides ovatus</i>	1	1		
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	6	5	<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	
<i>Bacteroides vulgatus</i>	3	3		
<i>Clostridium bifermentans</i>	2	2		
<i>Clostridium clostridiiforme</i>	1	0		1
<i>Clostridium difficile</i>	7	7		
<i>Clostridium perfringens</i>	7	7		
<i>Clostridium sporogenes</i>	2	2		
<i>Finegoldia magna</i>	2	2		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1	1		
<i>Fusobacterium varium</i>	2	2		
<i>Gemella haemolysans</i>	1	1		
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	1		
<i>Parvimonas micra</i>	1	1		
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	2	0	<i>Peptoniphilus harei</i> (1)	1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	4	3		1
<i>Prevotella buccae</i>	3	3		
<i>Prevotella disiens</i>	1	1		
<i>Prevotella intermedia</i>	2	1	<i>Prevotella nigrescens</i> (1)	
<i>Veillonella</i> sp.	1	0	<i>Veillonella dispar</i> (1)	
合計	59	52	4	3

## 【結果6】その他

菌名	株数	一致	属一致
<i>Bacillus cereus</i>	5	5	
<i>Bordetella parapertussis</i>	1	0	<i>Bordetella bronchiseptica</i> (1)
<i>Campylobacter jejuni</i>	2	2	
<i>Capnocytophaga sp.</i>	2	0	<i>Capnocytophaga sputigena</i> (1) <i>Capnocytophaga canimorsus</i> (1)
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	1	
<i>Corynebacterium striatum</i>	4	4	
<i>Eikenella corrodens</i>	2	2	
<i>Haemophilus influenzae</i>	18	18	
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	5	5	
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	10	9	<i>Haemophilus parahaemolyticus</i> (1)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	0	<i>Lactobacillus gasseri</i> (1)
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	1	
<i>Moraxella(B.)catarrhalis</i>	4	4	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2	2	
<i>Pasteurella multocida</i>	1	0	<i>Pasteurella canis</i> (1)
合計	59	53	6

# 16S rRNAとの比較

日常検査法	MALDI biotyper	16S rRNA
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter ludwigii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Vibrio cholerae</i> non-O1(NAG)	<i>Vibrio albensis</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pseudomonas beteli</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterococcus phoeniculicola</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	<i>Streptococcus pasteurianus</i>
<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	<i>Capnocytophaga canimorsus</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i> or <i>Bordetella parapertussis</i>



# まとめ

- 日常検査法との比較では、種レベルの一致は479/514 (93.1%) で属レベルの一致は501/514 (97.4%) であった。
- 16S rRNAとの比較では日常検査法より優れている場合もみられた。
- *Enterobacter cloacae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus casseliflavus*において属レベルの同定は一致したが、種レベルの同定では不一致がみられた。
- $\alpha$ -streptococcusの一部で*Streptococcus pneumoniae*と誤同定される場合がある。
- 今回、成績には示していないが*Shigella* spp.は*Escherichia coli*と同定されるため注意が必要である。
- *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*のムコイド株では同定不能となることがある。
- 嫌気性菌では同定不能となる菌株が多かった。

# 課題

本法は簡便かつ迅速に菌種を同定できることが示され、新たな迅速同定法として期待される。しかし、一部の菌種ではデータベースの改良が必要と思われた。また、真菌や抗酸菌ではコロニーを直接塗布する方法では不十分であり、日常検査法として導入するためには、さらなる改良が必要と思われた。

# 検討内容

1. タンパク質抽出試料による細菌同定
2. 直接コロニーから細菌同定
  - 再現性
  - 培養日数
  - 臨床分離株による細菌同定
3. 血液培養から細菌同定

# 方法

1. 生化学用採血管(インセパックII)に陽性の血液培養液を3mL入れる
2. 3000rpm, 5分遠心後、上清を捨てる
3. 分離剤上に集積した細菌を回収
4. D.W、エタノールで細菌を洗淨
5. MALDI-TOF MSで測定

まだ、80%位しか同定できず、改良の余地がある。