

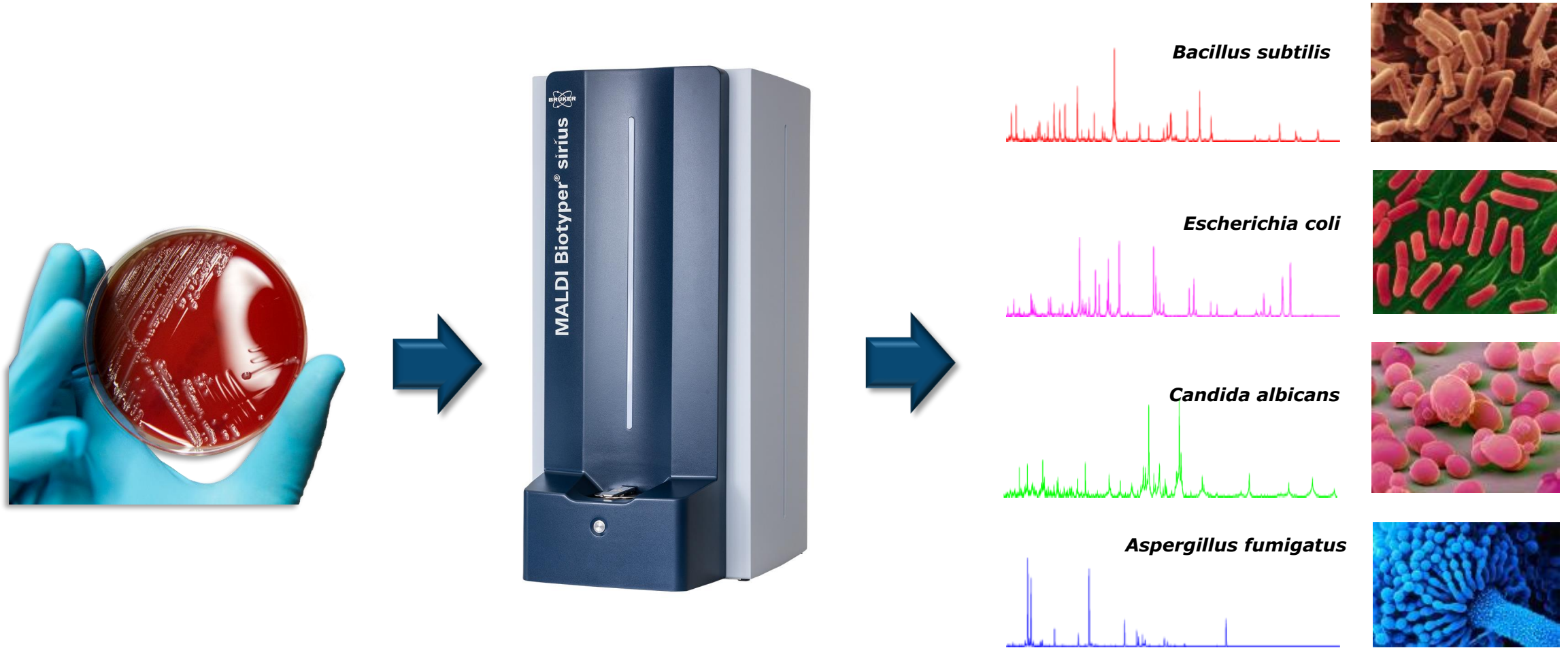
MALDI-TOF MSを用いた細菌同定 - MALDIバイオタイパー-

2023年10月20日 第24回 遺伝子・プロテオミクス技術セミナー 実技編



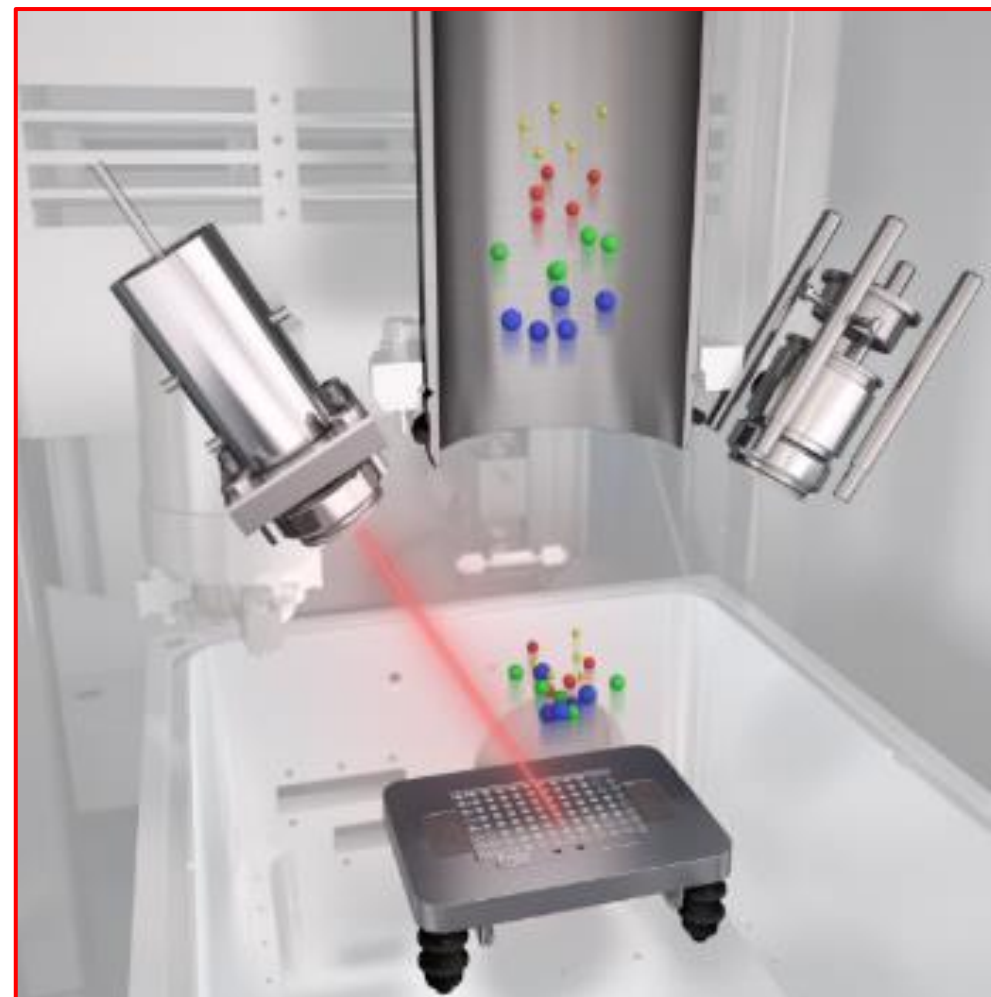
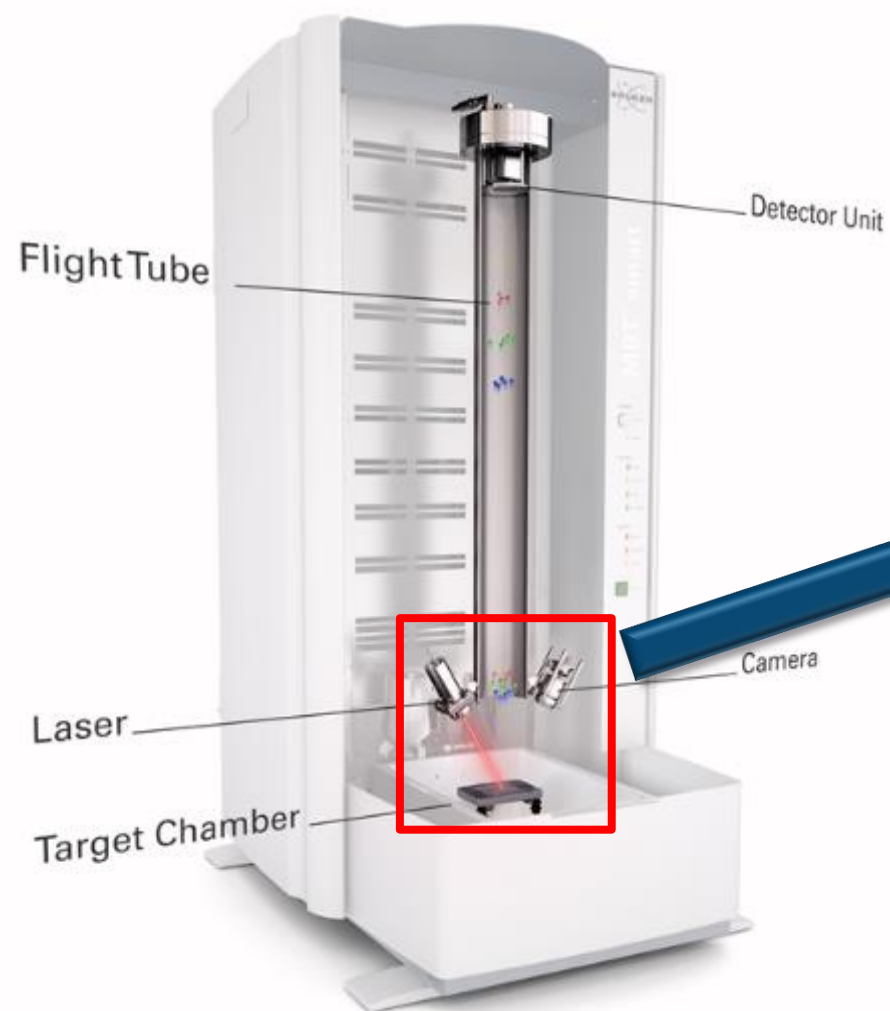
ブルカージャパン株式会社
Microbiology & Diagnostics

グラム陰性/陽性細菌、酵母様真菌、糸状菌などがもつ特徴的なタンパク質を質量分析することにより同定します。



MALDIバイオタイパーの基本原理

MALDI-TOF MS [MALDI-TOF質量分析法]



MALDIバイオタイパーの基本原理

MALDI-TOF MS [MALDI-TOF質量分析法]

MALDI-TOF MS ; 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

マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 ; Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization

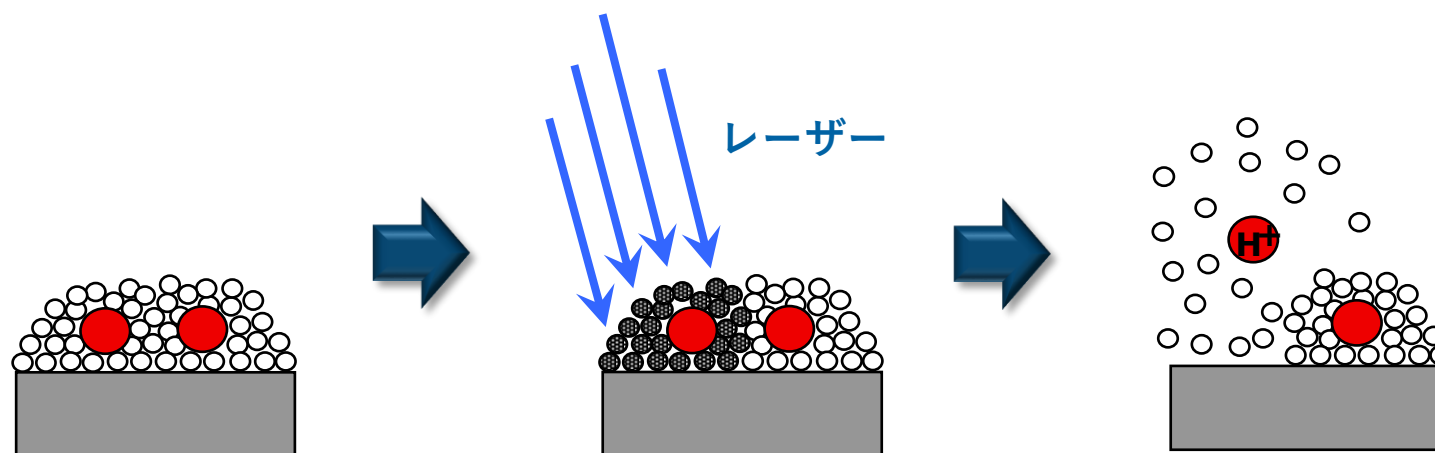
全ての質量分析計は試料をイオン化するイオン化部とイオンを分離する質量分析部からなります。

MALDIはタンパク質のイオン化に適したイオン化法の一つです。

マトリックスと試料の
混合結晶

レーザーによる
マトリックスの励起

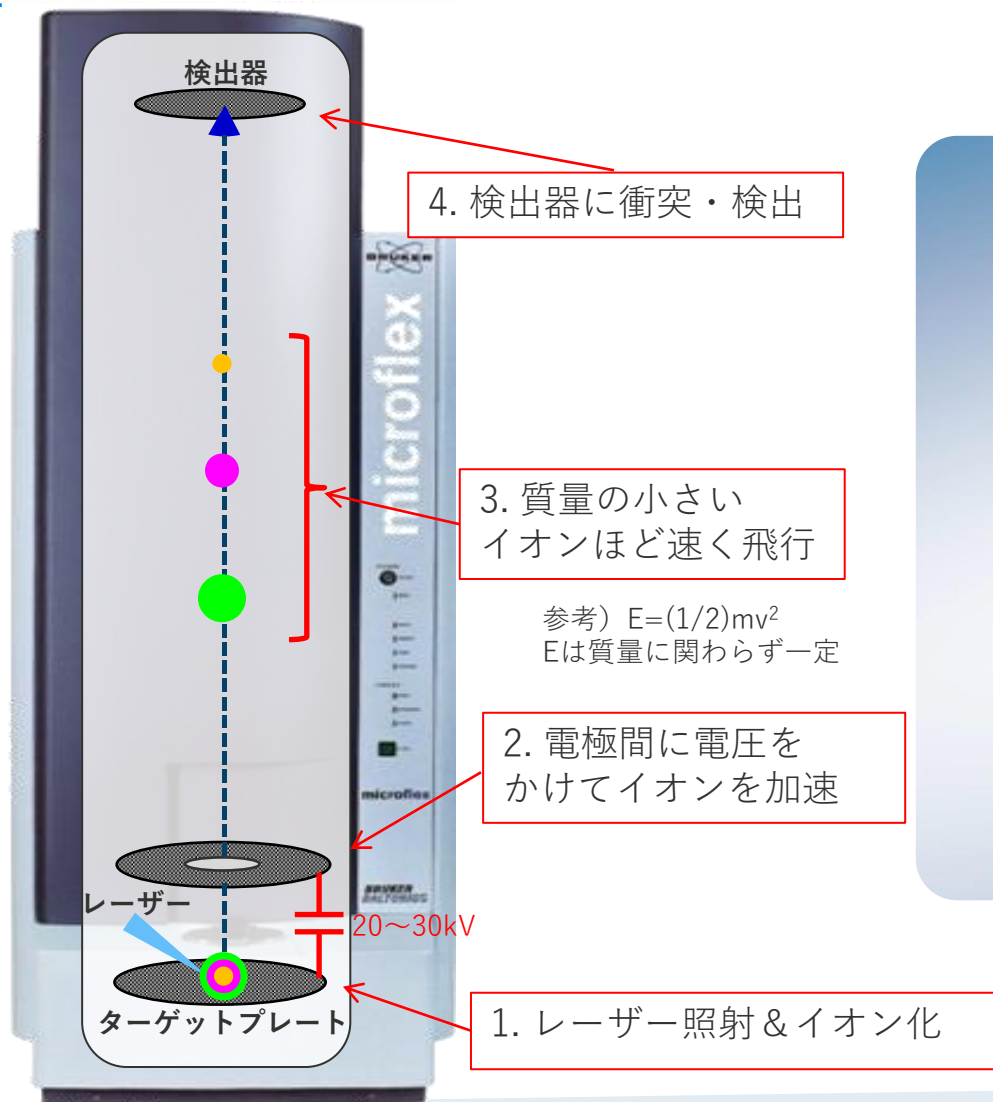
脱離および
イオン化（プロトン化）



マトリックスによりソフトなイオン化、多価イオンを生成しにくい

MALDIバイオタイパーの基本原理

MALDI-TOF MS [MALDI-TOF質量分析法]

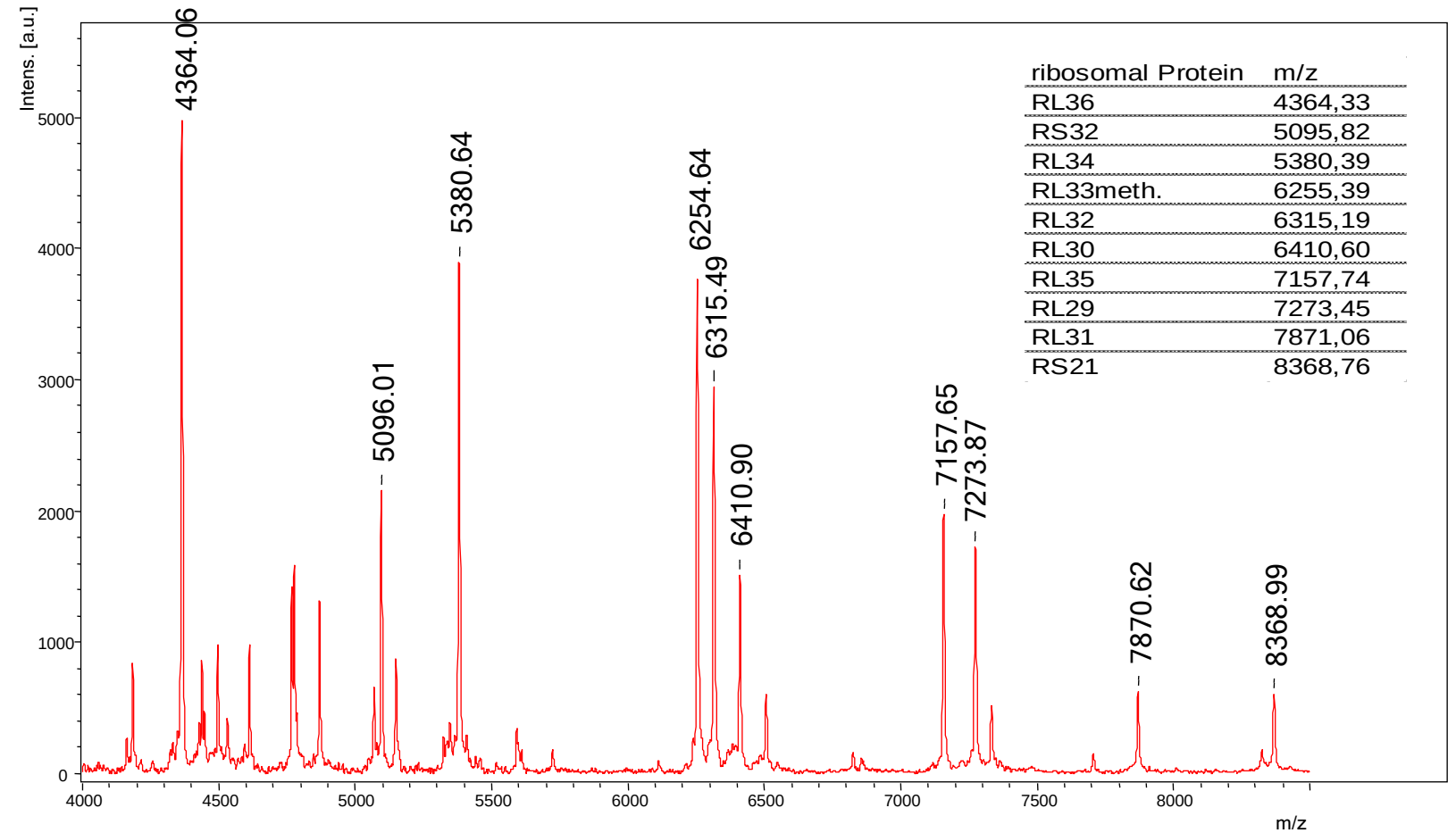


MALDIバイオタイパーの基本原理

質量スペクトル

菌株に含まれる主なタンパク質
(リボゾームタンパク質)ピーク
パターンを再現性よく同定しま
す。

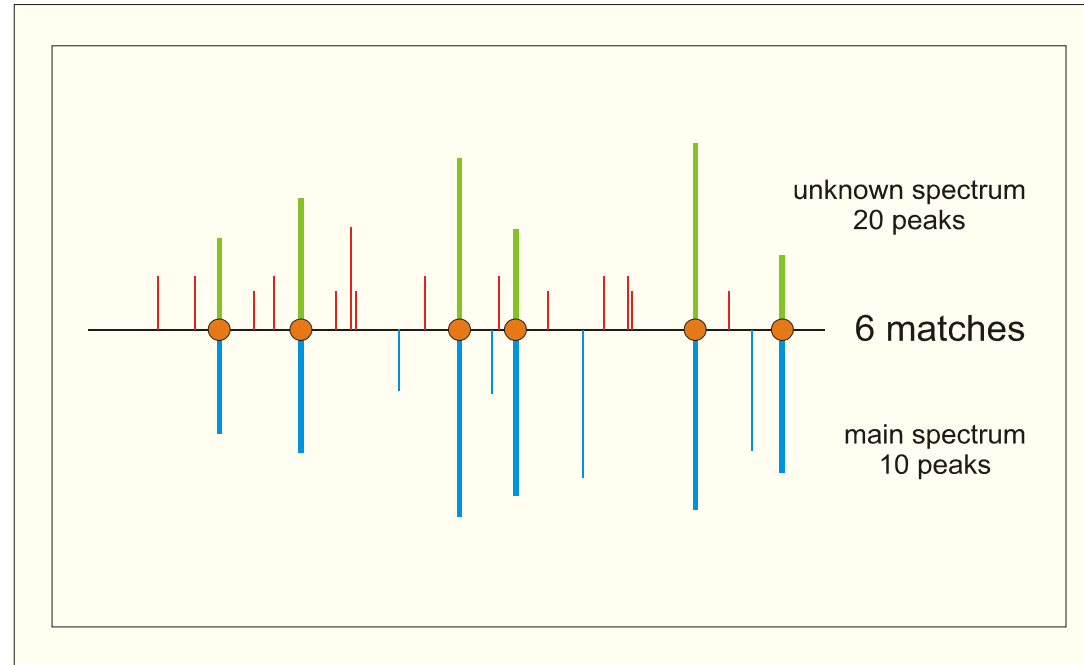
測定質量範囲:2,000-20,000 Da



MALDIバイオタイパーによる同定の原理

MSPコンセプト-パターンマッチングによるスコア計算-

4,000種以上のライブラリに対し、試料菌株のスペクトルをマッチングさせます。



独自のアルゴリズムでスコアを評価し、近似性の高い菌株から順に表示します。

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.000 - 3.000	High Confidence Identification	(+++)	green
1.700 - 1.999	Low Confidence Identification	(+)	yellow
0.000 - 1.699	No Organism Identification Possible	(-)	red

	スコア	2.0 – 3.0
	スコア	1.70 – 1.99
	スコア	0 – 1.69

MALDIバイオタイパーによる同定 同定結果の解釈

各試料に対しスコアバリューをもとにした上位10候補のランキングリストを確認することができます。

このランキングリストから同定結果の信頼性を評価することができるため、最終的な菌名を判断する重要な情報となります。

	高い信頼性
	低い信頼性
	同定不能

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value
1 (++)	Candida tropicalis DSM 4238 DSM	2.267
2 (++)	Candida tropicalis ATCC 13803 THL	2.185
3 (++)	Candida tropicalis DSM 9419 DSM	2.142
4 (++)	Candida tropicalis DSM 7524 DSM	2.105
5 (++)	Candida tropicalis DSM 5991 DSM	2.041
6 (++)	Candida tropicalis VML	2.035
7 (+)	Candida tropicalis DSM 1346 DSM	1.955
8 (+)	Candida tropicalis DSM 70151 DSM	1.952
9 (+)	Candida tropicalis RV_03 VML	1.766
10 (-)	Ochrobactrum gallinifaecis DSM 15295T HAM	1.255

MALDIバイオタイパーによる同定 難同定の菌株への対応

Matched Pattern ▼	Comment ▼
Acinetobacter pittii 69 HCB	Species of this genus have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.
Enterobacter cloacae DSM 30060 DSM	is a member of Enterobacter cloacae complex
Escherichia coli DH5alpha BRL	closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment
Enterobacter cloacae MB_8779_05 THL	is a member of Enterobacter cloacae complex
Klebsiella oxytoca VA20879_09 ERL	Klebsiella oxytoca and species ornithinolytica / planticola / terrigena of the genus Raoultella have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.
Pseudomonas putida B401 UFL	is a member of Pseudomonas putida group

レポートの中に表示されるマッチングヒントの例

これらの分類が難しい菌株やスペクトルのパターンが非常に近いもの等においては、同定結果のレポート中に”マッチングヒント”としてコメントが加えられます。最終的な同定の判断材料となるコメントが含まれますので、常に確認することをお勧めします。

MALDIバイオタイパーによる分析 リファレンスライブラリ

Bruker MBT Compass Library:

2023年

✓ 11,897 MSPs

✓ 4,274 菌種

糸状菌 Ver5.0

✓ 779 MSPs

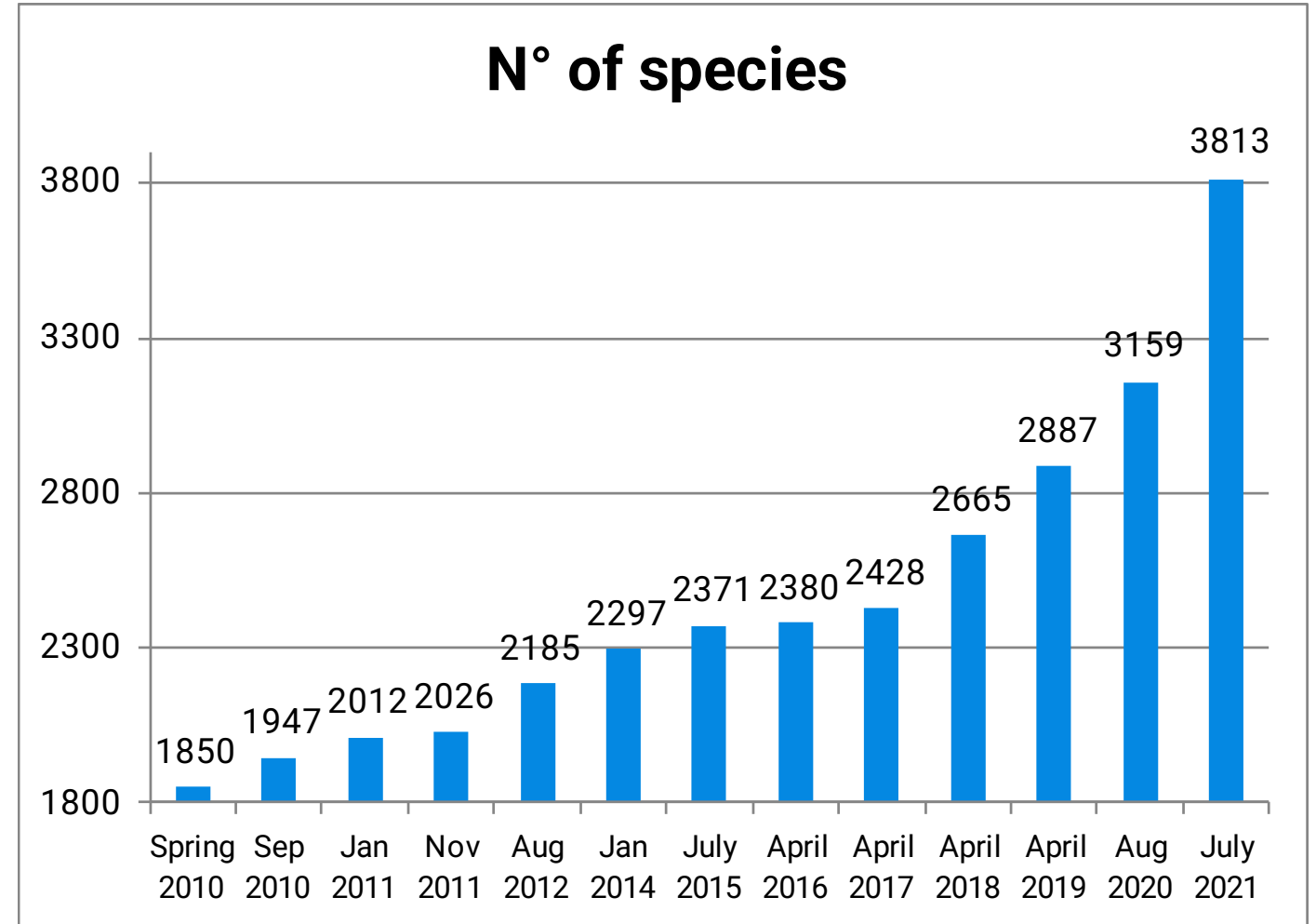
✓ 222 菌種グループ

抗酸菌 Ver7.0

✓ 1,069 MSPs

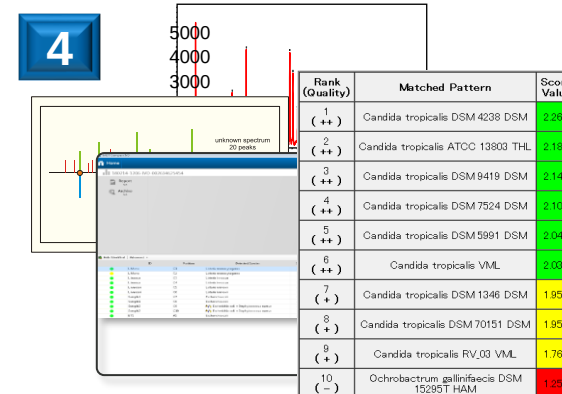
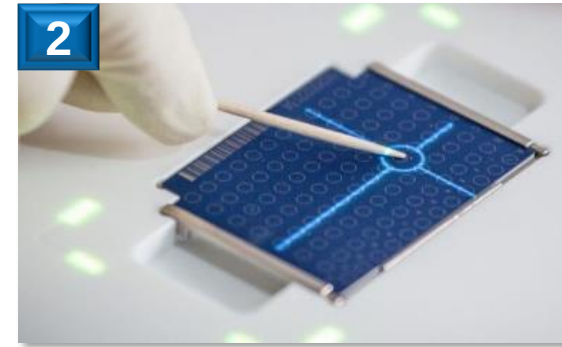
✓ 182 菌種

その他、ユーザーライブラリの作成や、
Web上でのCDC MicrobeNet ライブラリも使用可能



MALDIバイオタイパーによる分析 分析試料装填と分析

1. 未知試料を釣菌
2. ターゲットプレートに試料と試薬を塗布
3. MALDIバイオタイパーにて分析
4. パターンマッチングによりライブラリーと照合し菌種の判明
5. 同定結果を最終判断



96試料を約40分以内で分析可能

MALDIバイオタイパー 専用アクセサリー・消耗品

●マトリックス試薬

Matrix HCCA potioned

包装：250 μ L x 10本

品番：8255344

備考：溶媒の準備が必要



●キャリブレーションスタンダード:

Bacterial Test Standard (BST)

包装：50 μ L x 5本

品番：8255343

備考：試薬のため培養不要



●ディスポーザブルターゲット:

Disposable MBT Biotarget 96

包装：20枚

品番：1840375

備考：シングルユース96スポット



MALDIバイオタイパー ターゲットプレート

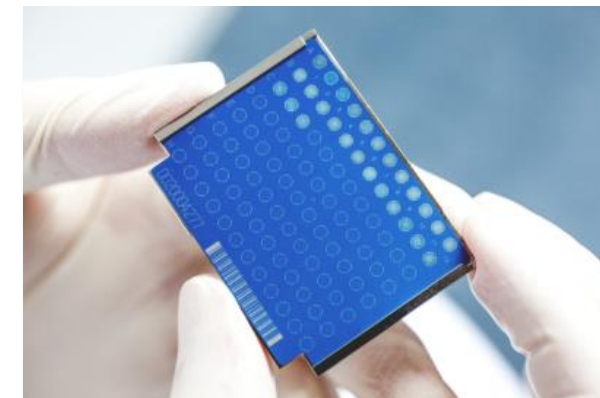
ターゲットプレートは数種類から選択が可能

Biotarget 96 (シングルユース)

1枚ごとに異なるバーコードでトレーサビリティを支援します。

全てのスポットを利用する事が出来、スポットを無駄にすることがありません。

アンカーチップ™により効果的な液体濃縮により、サンプル前処理を簡便にします。

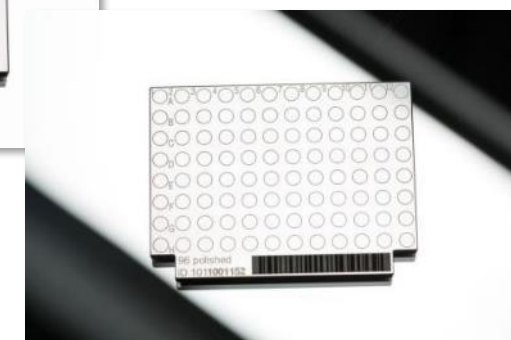
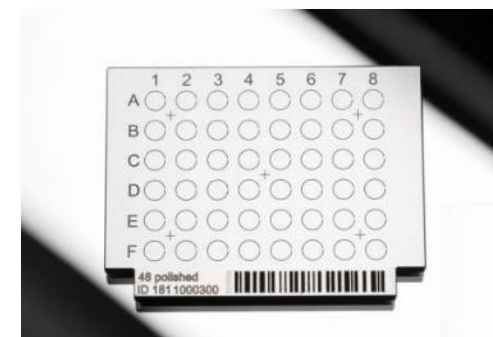


polished steel 48/ polished steel 96 (リユース)

表面を研磨しているPolished steelターゲットです。

バリデーションされたターゲット洗浄手順: 80% トリフルオロ酢酸を使用します。

48wellターゲットのみ：キャリブレーションスタンダードを載せるスポット(+マーク)があります。



MALDIバイオタイパーによる分析 容易かつ迅速な標準的分析試料の調製法

次の3方法はMALDIバイオタイパーでの分析において標準的な試料調製法です。
寒天培地上に単離されたコロニーや集菌された菌株の分析に用います。

●セルスメア法

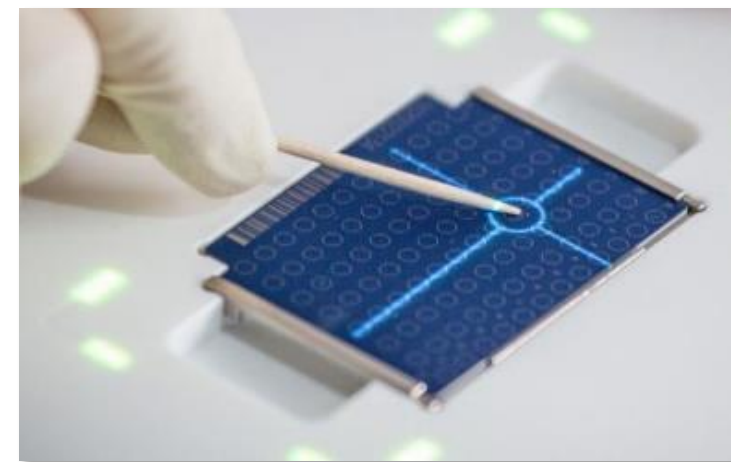
ターゲットプレートに試料を直接塗布
対象；グラム陰性菌と、ほとんどのグラム陽性菌

●ギ酸オンプレート法(スメア・ギ酸法)

ターゲットプレートに試料を直接塗布後、70%ギ酸を上乗せ添加
対象；酵母様真菌など細胞壁が強固な菌株

●エタノール/ギ酸抽出法

菌体からタンパク質を抽出して分析
対象；セルスメア法、ギ酸オンプレート法で同定が困難な菌株



MALDIバイオタイパーの分析試料調製方法

①セルスメア法

◎作業工程

寒天培地上のコロニーから釣菌



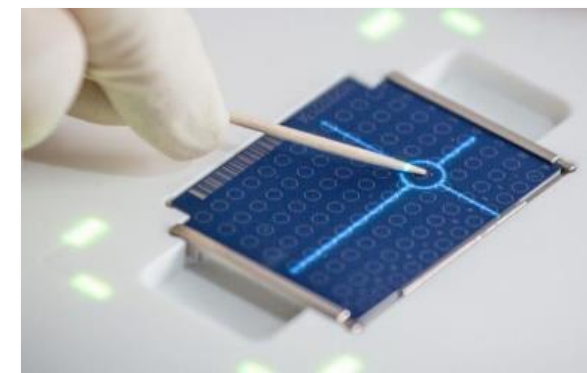
ターゲットプレートに塗布



マトリックスを1uL添加し、乾燥



MALDIバイオタイパー に装填



👉塗布時のPoint

- ・菌量は少量でOK
- ・培地をひっかかない：コロニーが薄く広がっているときは白金耳で菌を集めてからつまようじでピックアップ
- ・菌を塗布後、マトリックスは30分以内を目安に添加
- ・液体の試薬・検体は必ず自然乾燥で乾かす

MALDIバイオタイパーの分析試料調製方法

②ギ酸オンプレート法(スメア・ギ酸法)

◎作業工程

寒天培地上のコロニーから釣菌



ターゲットプレートに塗布



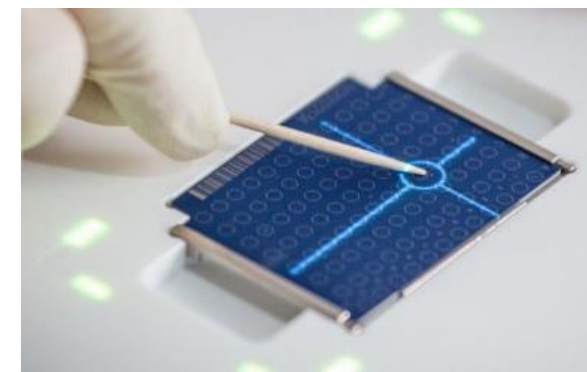
70%ギ酸を1 μ L添加し、乾燥



マトリックスを1 μ L添加し、乾燥



MALDIバイオタイパー に装填



👉ギ酸オンプレート法が有効な菌種

酵母様真菌、嫌気性菌、ムコイド型コロニーを形成する菌、カサカサコロニーの菌など

MALDIバイオタイパーの分析試料調製方法

③エタノール/ギ酸抽出法

◎作業工程

寒天培地上のコロニーから釣菌



dH₂O 300 μ Lに懸濁



13,000 r.p.m.で2分間遠心分離



上清を廃棄、70%ギ酸とアセトニトリルを添加



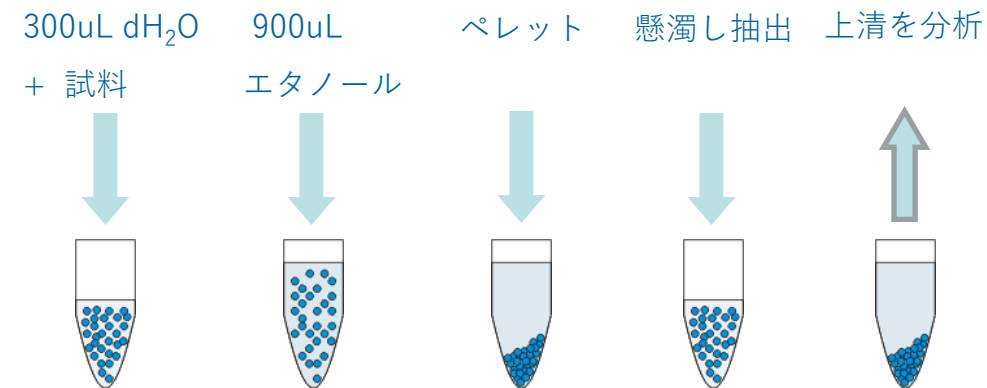
13,000 r.p.m.で2分間遠心分離



上清1 μ Lをターゲットプレートに添加し、乾燥、
マトリックスを1 μ L添加し、再度乾燥



MALDIバイオタイパーに装填



👉 本法は、セルスメア法、ギ酸オンプレートで分析が難しい場合に適応します。
細胞内のタンパク質を抽出し、直接、分析する方法となります。

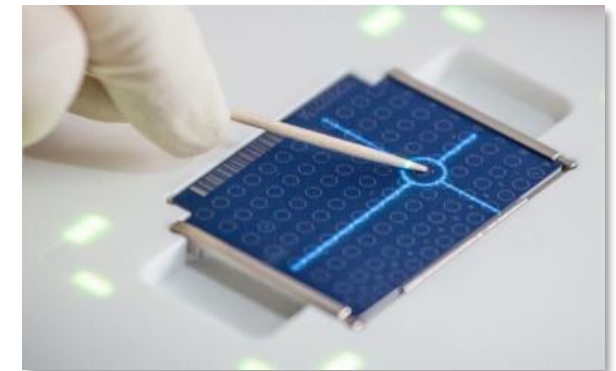


血液培養ボトルからの直接同定 MALDI Sepsityper kit

本法は、血培陽性ボトルから検出された菌を迅速に同定するソリューションです。

MALDI Sepsityper kitは、血培陽性ボトル中の菌を簡便に集菌することができる前処理キットです。

集菌した菌は、セルスメア法、ギ酸オンプレート法、エタノール/ギ酸抽出法により試料調製することが可能です。



7-17分間で分析試料の調製が可能

血液培養陽性後 30分以内に同定可能

血液培養ボトルからの直接同定 MALDI Sepsityper kit

◎作業工程

陽性ボトルから培養液1mLをチューブに分取



Lysis Bufferを200uL添加し、10秒間攪拌



13,000 r.p.m.で2分間遠心分離後、上清を除去



Washing Bufferを1mL添加し、よく攪拌



13,000 r.p.m.で1-2分間遠心分離後、上清を除去



沈査を回収

沈査をセルスメア法、ギ酸オンプレート法、エタノール/ギ酸抽出法などで分析試料の調製を行いMALDIバイオタイパーに装填する。



#8270170 MALDI Sepsityper kit 50tests
Lysis buffer, Washing buffer, Tube
試薬調製不要

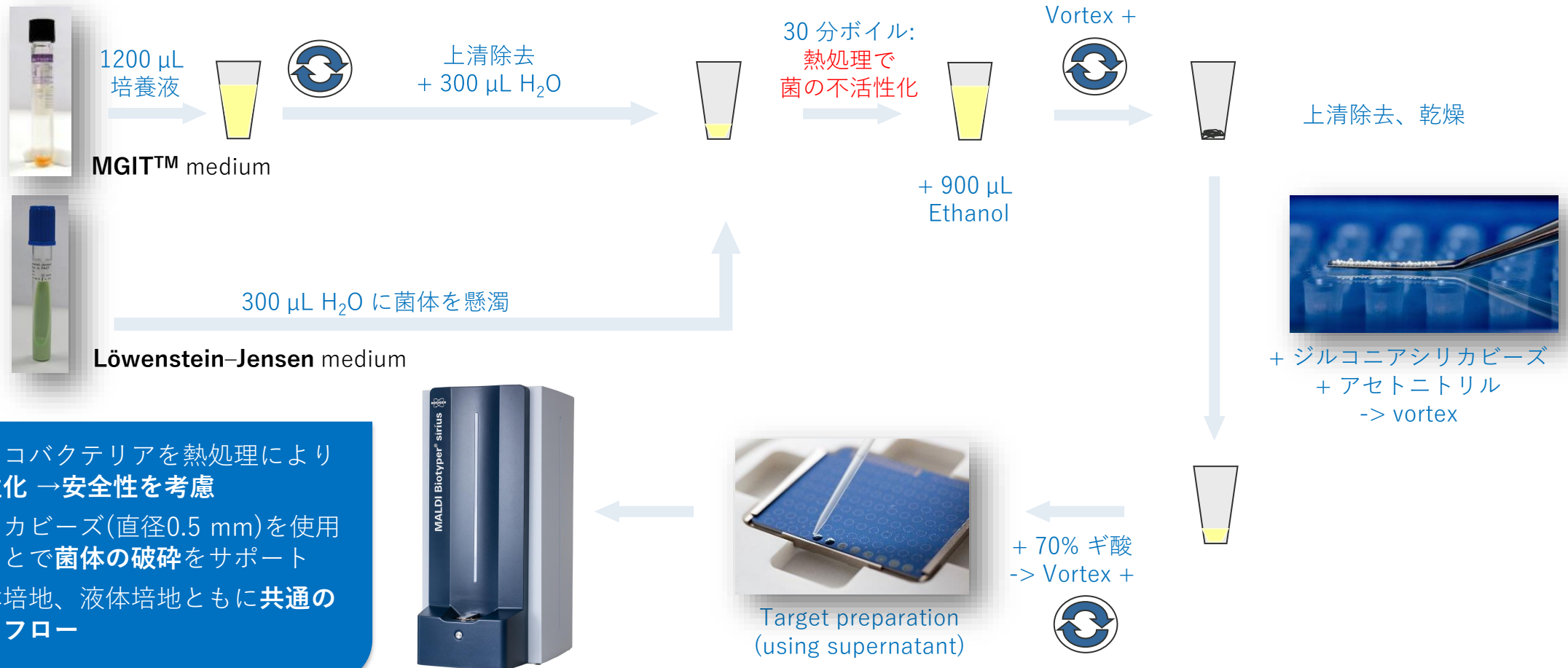
MALDIバイオタイパーと Sepsityper kitを導入した検査工程

	1日目	2日目	3日目	4日目
従来法	検体到着 血液培養開始	血液培養陽性 グラム染色 性状確認試験	同定試験開始	同定最終報告
MALDIバイオタイパー法	検体到着 血液培養開始	血液培養陽性 同定最終報告	 時間・コスト削減 抗菌薬の適正選択介入	

※血液培養が24時間で陽性となった場合です。
※従来法よりサブカルチャー工程は除いています。

MALDIバイオタイパーの分析試料調製方法

抗酸菌の同定



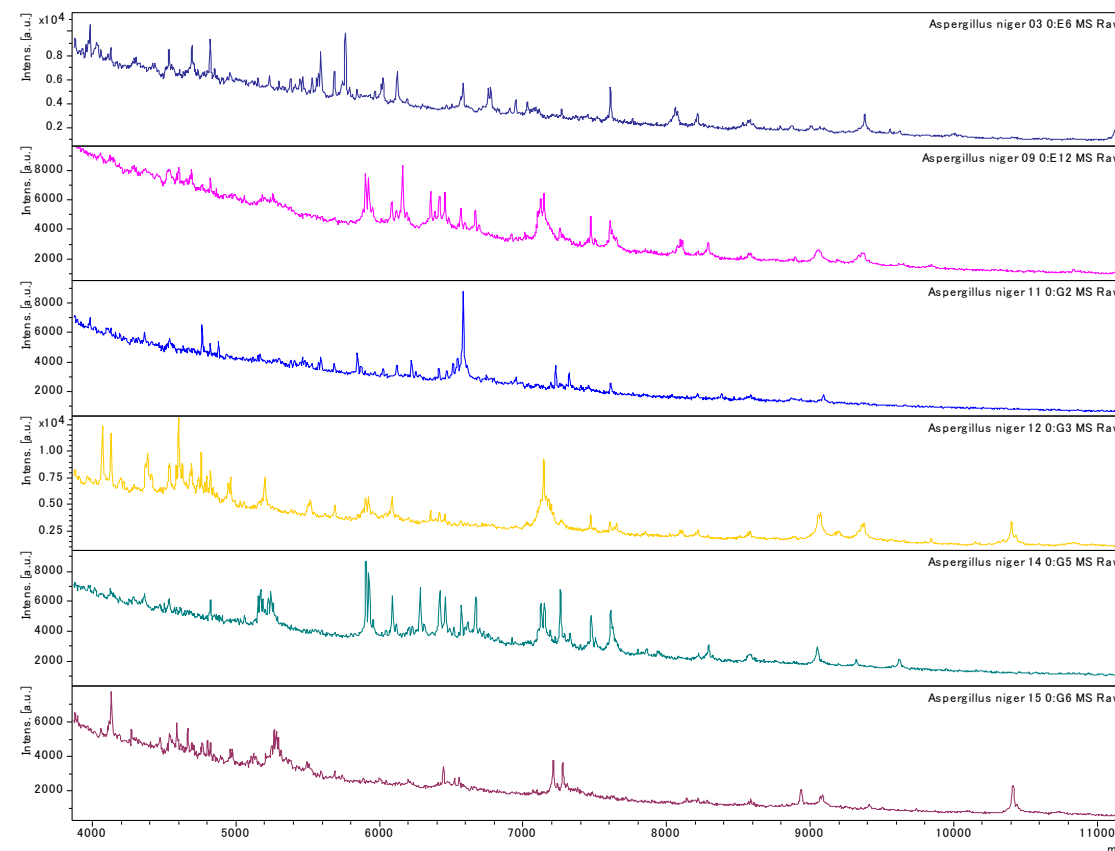
- ・マイコバクテリアを熱処理により不活性化 → 安全性を考慮
- ・シリカビーズ(直径0.5 mm)を使用することで菌体の破碎をサポート
- ・個体培地、液体培地ともに共通のワークフロー

MALDIバイオタイパーの分析試料調製方法

糸状菌の同定

糸状菌同定の難点

菌糸、分生子、孢子など生育状態の違いによって発現タンパクが異なりスペクトルに変化が生じ、再現性が低かった。



MALDIバイオタイパーの分析試料調製方法

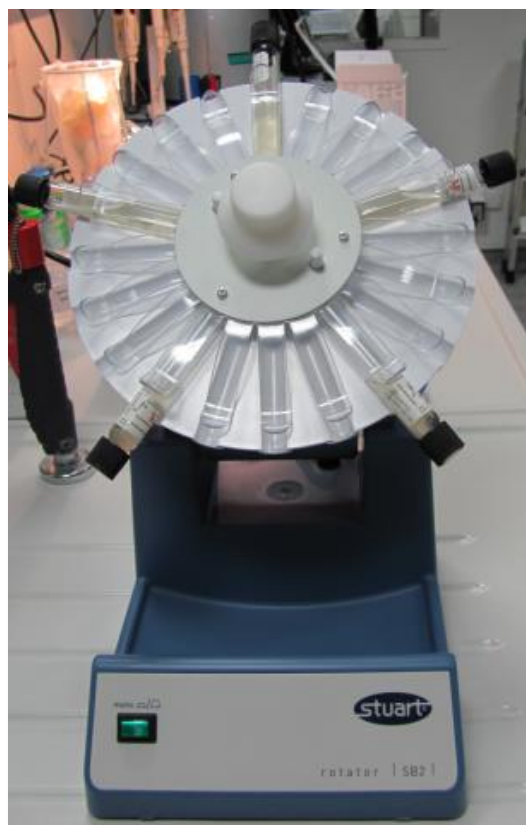
糸状菌の同定

均一な菌体を得るためにローテーターを用いて液体回転培養をします。

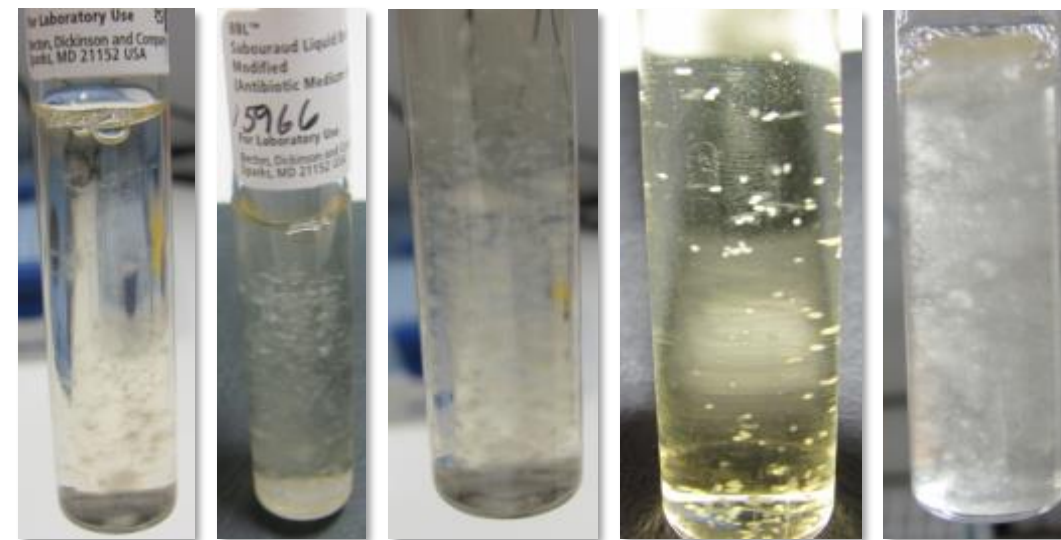
この培養方法により再現性の高いライブラリー登録試料の作製が可能となりました。

糸状菌同定の培養試料としても利用できます。

※ローテーターなどは適した培養温度を維持するためにふ卵器内に設置します。



液体培養を行った糸状菌の菌体



MALDIバイオタイパーによる分析

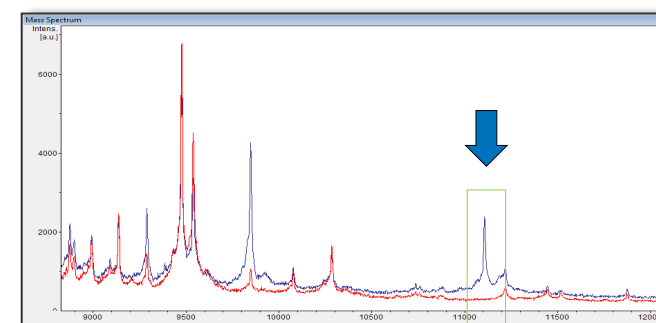
薬剤耐性の分析



MALDIバイオタイパーで細菌の薬剤耐性を検出するソリューションには、2つの方法があります。

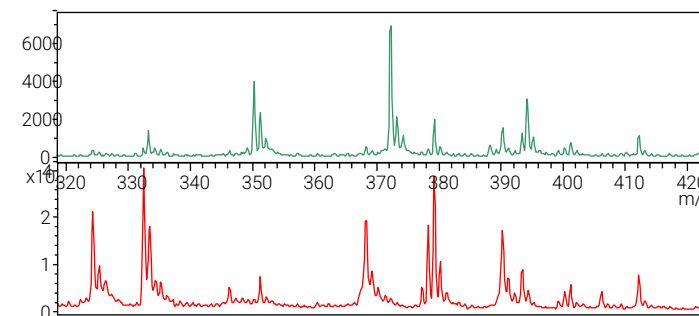
薬剤耐性関連ピークによる耐性菌の検出

- 耐性菌に特異的なタンパク質のピークを検出します。
- 機能拡張ソフトウェアによって自動的に行われます。



薬剤の分解による耐性菌の検出

- 分解される薬剤を検出します。
- 試薬キットを使用し薬剤耐性を検出します。



MALDIバイオタイパーによる耐性菌の分析

薬剤耐性関連ピークによる耐性菌の検出

本法は、機能拡張ソフトウェアをMALDIバイオタイパーシステムにインストールすることにより、耐性菌の因子のピークを自動的に探索し、耐性菌の可能性の有無を報告します。

拡張機能、MBTサブタイピングモジュールは、**対象菌種がスコア緑で同定**された場合、目的のピーク(もしくはピークパターン)を自動で探索し、検出された場合のみレポートへ表示します。

本機能を使用するにあたり、特別な前処理や試料調製は必要ありません。

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
0_A7 (+++)(A)	KP-M-93 chrom (standard)	Klebsiella pneumoniae <u>presumptive KPC</u>	2.47	Klebsiella pneumoniae	2.38
0_A8 (+++)(A)	KP-M-94 chrom (standard)	Klebsiella pneumoniae <u>presumptive KPC</u>	2.49	Klebsiella pneumoniae	2.40
0_A9 (+++)(A)	KP-M-94 chrom (standard)	Klebsiella pneumoniae <u>presumptive KPC</u>	2.48	Klebsiella pneumoniae	2.37

Subtyping Result	Comment
KPC	classification as KPC on the basis of specific marker peaks (11109)

MALDIバイオタイパーによる耐性菌の分析

MBTサブタイピングモジュールによる耐性菌の検出

MBTサブタイピングモジュールにより拡張される機能

Result of first calculation (ID)	Result of second calculation (MBT Subtyping)
<i>Staphylococcus aureus</i>	PSM-mec由来タンパク質ピークの検出によりMRSAの推定
<i>Bacteroides fragilis</i>	cfiA由来タンパク質ピークの検出によりMBL産生 <i>B. fragilis</i> の推定
腸内細菌目細菌	bla _{KPC} 由来タンパク質ピークの検出によりKPCの推定
<i>Listeria species</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> とその近縁種の鑑別
<i>Mycobacterium chimaera</i> /intracellulare complex	<i>M. chimaera</i> / <i>M. intracellulare</i> の鑑別
<i>Elizabethkingia species</i>	<i>Elizabethkingia anopheles</i> / <i>E. meningoseptica</i> / <i>E. miricola</i> の鑑別

拡張機能MBTサブタイピングモジュールは、腸内細菌目細菌のbla_{KPC}や*Staphylococcus aureus*のPSM-mec、*Bacteroides fragilis*のcfiAの存在を同定の結果を受けて自動的に迅速検出し、報告するため“早期警戒システム”として機能します。

腸内細菌目細菌の検討においてBla_{KPC}遺伝子を有するカルバペネム耐性株をMBTサブタイピングモジュールで検出することができます。分析したスペクトルの中から特異的なピークの有無を検出しました。



Mass Spectrum

Intens. [a.u.]

6000

4000

2000

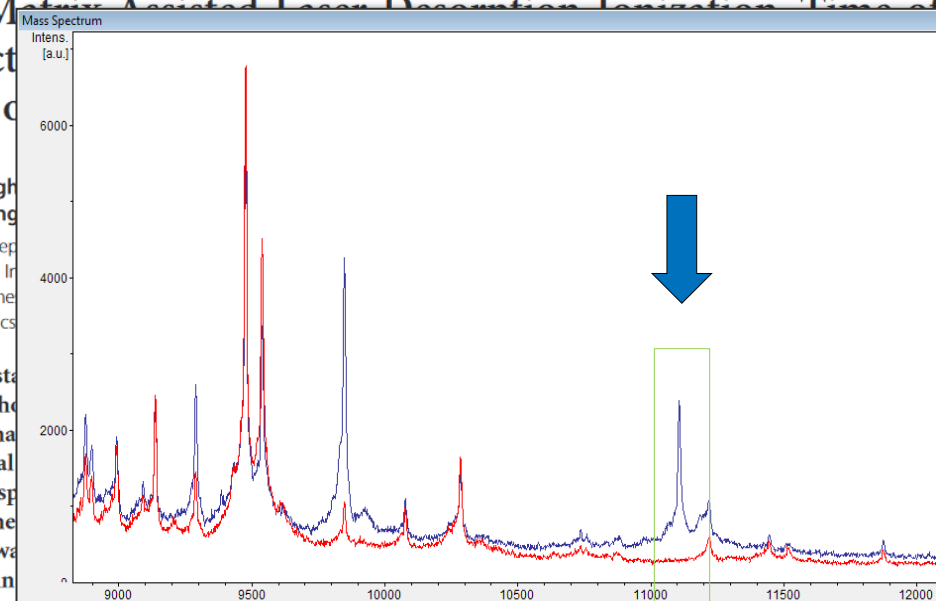
0

0 100 200 300 400 500 600 700 800 900 1000

Mass (amu)

Anna F. Lau,^a Hongh
Marjan Gucek,^d Jung

Carbapenem-resistant health. Rapid methods we demonstrate that using a commercial kit in this case, we retrospectively that occurred at the pKpQIL plasmid was peak was present in whole-genome sequencing the gene characterization onstrates the presence useful in tracking of was accomplished in the potential clinical



Yong Chen,^d
Baker^a
Line Department,
eases, National
da, Maryland, USA^d;

to public
ol efforts. Here,
is possible
(MS) system. In
RE outbreak
e *bla_{KPC}*
This plasmid
ults from
olates. Notably,
se analysis dem-
IS peak may be
OF MS method
emonstrating

Klebsiella pneumoniae:

- BLUE: KPC with *bla*_{KPC} related peak
- RED: ESBL

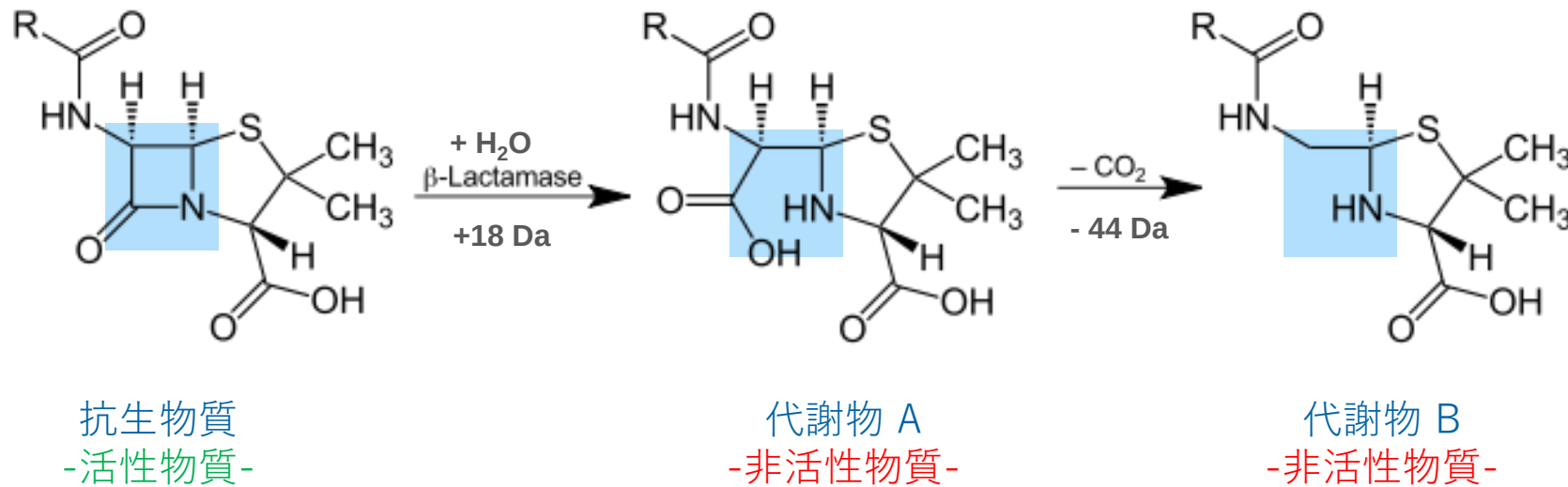
the potential clinical utility for real-time plasmid tracking in an outbreak.

MALDIバイオタイパーによる耐性菌の分析

薬剤の分解による耐性菌の検出

Selective Testing of Antibiotic Resistance – Beta Lactamase

β -lactam 系抗菌剤耐性菌の選択試験



β -lactam 系抗菌剤の β -lactamase 酵素による加水分解

これらの質量シフトは、MALDI-TOF MSで検出が可能です。

MALDIバイオタイパーによる耐性菌の分析 薬剤の分解による耐性菌の検出 MBT STAR-BL

MBT STAR-Carba 薬剤パウチ 20~58(最大)試料



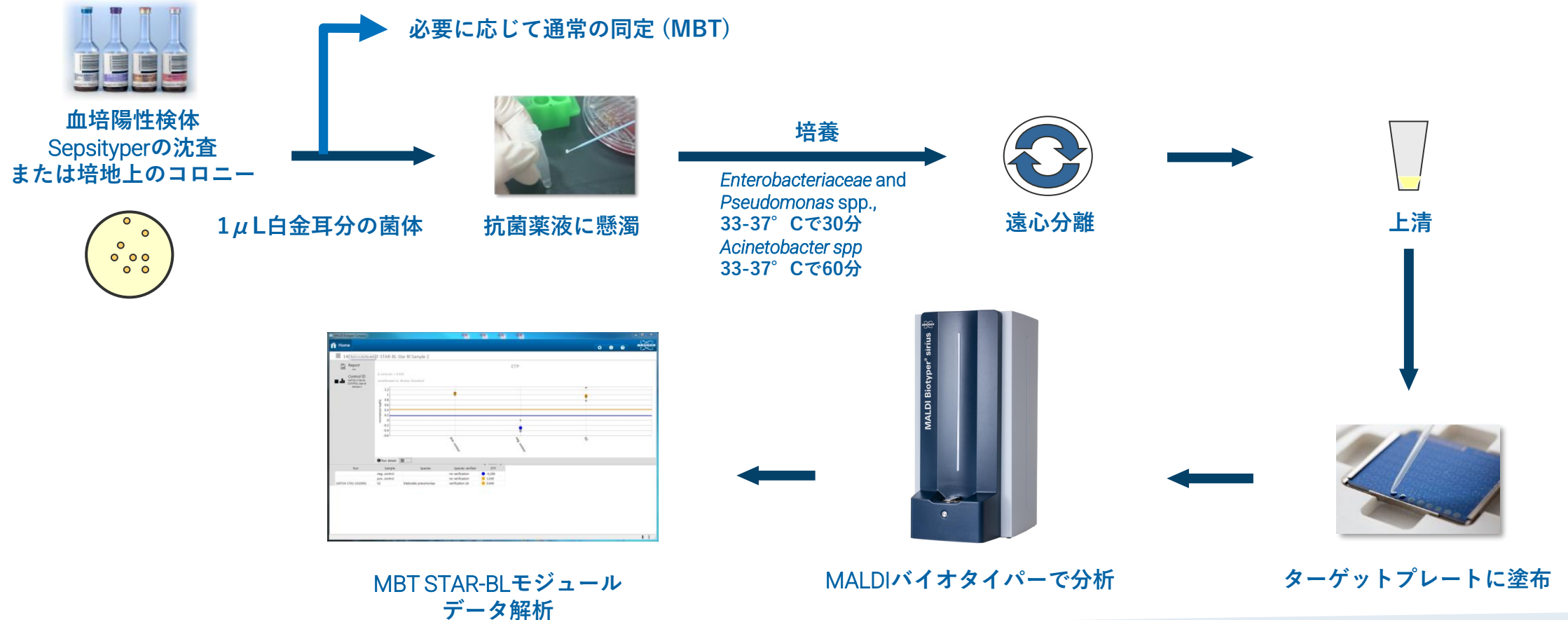
MBT STAR-Cepha 薬剤プレート 96 ウェルプレート



抗菌薬と溶解緩衝液がセットになっているため秤量が不要です。
低分子領域測定用キャリブレーションスタンダードが含まれます。

MALDIバイオタイパーによる耐性菌の分析 薬剤の分解による耐性菌の検出 MBT STAR-BL

MBT STAR-Carba/ Cepha kitの作業手順



MALDIバイオタイパーによる耐性菌の分析 コンビネーションワークフローの所要時間



MALDI バイオタイパー sirius および MALDI バイオタイパー sirius one

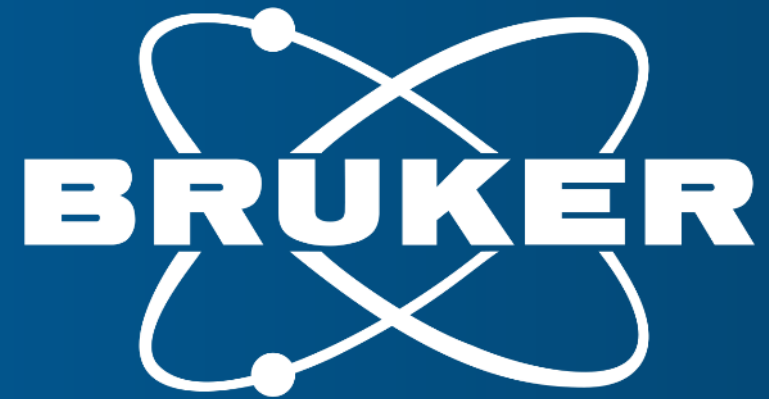
MALDI バイオタイパー sirius



高静粛性
コンパクト
軽い本体

MALDI バイオタイパー sirius one





Innovation with Integrity

