

[原 著]

質量分析装置 MALDI バイオタイパーによる *Streptococcus* 属菌を対象とした  
同定性能の検討

太田悠介<sup>1)</sup>・松本竹久<sup>2)</sup>・春日恵理子<sup>2)</sup>・堀内一樹<sup>2)</sup>  
根岸達哉<sup>2)</sup>・矢口ともみ<sup>2)</sup>・名取達矢<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 信州大学大学院医学系研究科保健学専攻

<sup>2)</sup> 信州大学医学部附属病院臨床検査部

(平成 26 年 10 月 1 日受付, 平成 26 年 12 月 2 日受理)

今回、迅速且つ簡便な同定検査が可能となる微生物同定システムの MALDI バイオタイパー (Bruker Daltonics) を用いて、*Streptococcus* 属菌を対象とした同定性能の検討を行った。本装置による同定検査では、遺伝子学的検査結果と比較し、On plate 法とエタノール・ギ酸抽出法のいずれの抽出法においても属レベルで 100%、菌種レベルで 81.5% の同定一致率を示した。本システムにて同定が不一致となった菌種は、16S rRNA 遺伝子配列が近似する *Streptococcus mitis* group に含まれる菌種、あるいは同定解析ソフトウェア MALDI バイオタイパー 3.1 (Bruker Daltonics) のリファレンスライブラリの中に含まれる登録数が少ない菌種であった。質量分析による鑑別が困難であった *S. mitis* group の同定は、オプトヒンテストや胆汁酸溶解テスト等の追加検査が必要と考える。本装置はリファレンススペクトラ数が少ない菌種の同定精度が低いため、同定が困難であった菌株もしくは Score Value が 2.0 未満であった菌株のマススペクトルをリファレンススペクトラとして登録し、各菌種の登録菌種数を充実させる必要がある。

**Key words:** MALDI バイオタイパー, *Streptococcus* 属

序 文

近年、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を利用した新たな微生物同定機器が臨床現場に普及し始めている<sup>1)</sup>。本装置は、菌体内での発現量が多く保存性の高いリボソームタンパク質を短時間で分析できる能力を持ち、正確性が高く迅速な同定検査が可能となる<sup>2)</sup>。

*Streptococcus* 属菌は、種々の疾患を引き起こす菌種を含む临床上重要な細菌であり、*Streptococcus* 属菌の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統分類では、大きく  $\beta$ -haemolytic group, *Streptococcus anginosus*

group, *Streptococcus bovis* group, *Streptococcus mitis* group, *Streptococcus mutans* group, *Streptococcus salivarius* group に分類される<sup>3)</sup>。しかし、生化学的性状に基づく本属菌の同定は、菌種レベルでの鑑別が困難な場合が多く、同定精度の高い検査法の開発が望まれている<sup>4)~6)</sup>。

今回、*Streptococcus* 属菌を対象とした MALDI バイオタイパー (Bruker Daltonics) の同定性能の検討を行ったので報告する。

材料及び方法

1. 対象菌株

信州大学医学部附属病院臨床検査部にて検査を行い、Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>) を用いた 16S rRNA 遺伝子の相同性解析により、98.7% 以上の相同性を示す菌種が存在した *Streptococcus* 属菌 17 菌種 135 株を対象とした。

著者連絡先：(〒390-8621) 長野県松本市旭 3-1-1  
国立大学法人信州大学医学部附属病院  
松本竹久  
TEL: 0263-37-3493  
FAX: 0263-37-5316  
E-mail: ggatcc@shinshu-u.ac.jp

Table 1. Oligonucleotide primers for PCR for species identification of streptococci

Amplicon	Primer	Primer sequence (5'-3')	PCR product size	PCR program	Cycles	Reference
16S rRNA	27-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1506 bp	94°C 30 sec, 57°C 30 sec, 72°C 90 sec	30	7)
	1494-R	TACGGCTACCTTGTTACGAC				
recA	recA-2F	GCCTTYATCGATGCBGARCA	313 bp	94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min	40	8)
	recA-5R	GTTTCCGGRTTDCRAACAT				

## 2. 遺伝子学的検査

ヒツジ血液寒天培地 (BD) 上に生育したコロニーより DNA を抽出し, 16S rRNA 遺伝子と *recA* の DNA シークエンスを行った。解析に使用したプライマーを Table 1 に示す。シークエンス反応には Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life technologies) を用い, 解析は ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Life technologies) により行った。得られた DNA 配列を BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/>) と Ribosomal Database Project によりアラインメント解析を行った。

## 3. 生化学的検査

*S. mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus tigurinus* と遺伝子学的検査にて菌種の決定が困難であった *S. mitis* group の菌を対象とし, オプトヒンテストと胆汁酸溶解テストを行った。

### 1) オプトヒンテスト

ヒツジ血液寒天培地に被検菌株を塗抹後, オプトヒン含有ディスク (日本製薬) を置き, 35°C, 好気条件下で一晩培養後に阻止円を測定し, 直径 18 mm 以上を感性, 14 mm 以下を耐性として評価した。

### 2) 胆汁酸溶解テスト

ヒツジ血液寒天培地にて純培養した菌株を, 生理食塩水により均等な浮遊液 (McFarland No. 1.0) とした後, 2 本の試験管に等量ずつ分注し, 一方に 10% デオキシコール酸ナトリウム (Wako) を数滴, 他方は対象として生理食塩水を同量加え, 35°C で 30 分放置し菌浮遊液が透明になった場合を胆汁酸溶解陽性とし, 胆汁酸溶解陰性の場合は培養時間を 2 時間に延長し再度判定を行った。

## 4. MALDI バイオタイパーによる同定検査

### 1) On plate 法

ヒツジ血液寒天培地にて 35°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 24 時間培養を実施し, 得られたコロニーをターゲットプレートに塗布した。70% ギ酸 (Wako) を 1 μL 滴下し乾燥させ, α-cyano-4 hydroxycinnamic acid (CHCA) マトリックス試薬 (Bruker Daltonics) を 1 μL 滴下

した。乾燥後, 装置に導入し 2 重測定を行い, その平均値を算出した。

### 2) エタノール・ギ酸抽出法

1 白金耳量程度の発育コロニーを 300 μL の蒸留水に懸濁し, 99.5% エタノール (ナカライテスク) 900 μL を加え攪拌した後, 16060 g にて 2 分間遠心し, 上清を除去した。ペレットに 70% ギ酸を 30 μL 加え混和した後, アセトニトリル (Wako) を 30 μL 加えて混和した。16060 g にて 2 分間遠心し, 上清 1 μL をターゲットプレートに滴下し乾燥させ, 乾燥後のスポットに CHCA マトリックス試薬を 1 μL 滴下した。乾燥後, 装置に導入し 2 重測定を行い, その平均値を算出した。

### 3) MALDI バイオタイパーの評価方法

マススペクトルの取得は flexControl ソフトウェア (Bruker Daltonics) にて行い, 菌種同定は MALDI バイオタイパー 3.1 ソフトウェア (Bruker Daltonics) を使用した。MALDI バイオタイパーによる同定結果の信頼性の指標として Score Value を用い, Score Value 2.0 以上を菌種レベルの一致, Score Value 1.7 以上 2.0 未満を属レベルの一致, Score Value 1.7 未満を分類不能として評価し, 最も上位に挙げられた菌種を同定菌とした。

## 結 果

遺伝子学的検査結果と MALDI バイオタイパーの同定結果を Table 2 に示す。遺伝子学的検査にて *Streptococcus* 属菌 135 株は, *Streptococcus agalactiae* 34 株, *Streptococcus dysgalactiae* 7 株, *Streptococcus pyogenes* 7 株, *S. anginosus* 11 株, *Streptococcus intermedius* 3 株, *Streptococcus constellatus* 8 株, *Streptococcus gallolyticus* 2 株, *Streptococcus infantarius* 1 株, *Streptococcus pneumoniae* 24 株, *S. mitis* 3 株, *S. oralis* 5 株, *Streptococcus sanguinis* 6 株, *Streptococcus gordonii* 4 株, *S. tigurinus* 2 株, *Streptococcus infantis* 1 株, *S. mitis* group 1 (*S. pneumoniae* or *S. mitis*) 12 株, *S. mitis* group 2 (*S. pneumoniae*

Table 2. Accuracy of MALDI Biotyper identification of streptococcal isolates

16S rRNA and recA sequence	n	MALDI Biotyper							
		Direct transfer formic acid extraction				Ethanol-formic acid extraction			
		Score value (s)		Agreement for identification		Score value (s)		Agreement for identification	
		Range	Median	Genus	Species	Range	Median	Genus	Species
<i>Streptococcus agalactiae</i>	34	2.034 ~ 2.37	2.154	34	34	2.04 ~ 2.442	2.243	34	34
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7	2.073 ~ 2.409	2.213	7	7	2.103 ~ 2.304	2.172	7	7
<i>Streptococcus pyogenes</i>	7	2.049 ~ 2.447	2.155	7	7	2.18 ~ 2.427	2.369	7	7
<i>Streptococcus anginosus</i>	11	2.013 ~ 2.428	2.199	11	11	1.773 ~ 2.356	2.135	11	11
<i>Streptococcus intermedius</i>	3	1.843 ~ 1.912	1.869	3	3	1.801 ~ 1.949	1.832	3	3
<i>Streptococcus constellatus</i>	8	2.04 ~ 2.322	2.217	8	8	1.899 ~ 2.413	2.134	8	8
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	2	2.304 ~ 2.454	2.379	2	2	2.274 ~ 2.399	2.337	2	2
<i>Streptococcus infantarius</i>	1	1.995	1.995	1	0	1.876	1.876	1	0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24	1.833 ~ 2.446	2.162	24	24	2.063 ~ 2.388	2.247	24	24
<i>Streptococcus mitis</i>	3	2.03 ~ 2.181	2.125	3	0	2.08 ~ 2.25	2.176	3	0
<i>Streptococcus oralis</i>	5	1.861 ~ 1.937	1.9	5	0	1.707 ~ 2.21	1.976	5	0
<i>Streptococcus sanguinis</i>	6	1.935 ~ 2.231	2.082	6	6	2.021 ~ 2.169	2.107	6	6
<i>Streptococcus gordonii</i>	4	2.012 ~ 2.185	2.11	4	4	2.077 ~ 2.204	2.12	4	4
<i>Streptococcus tigurinus</i>	2	2.022 ~ 2.208	2.115	2	0	2.163 ~ 2.18	2.172	2	0
<i>Streptococcus infantis</i>	1	1.895	1.895	1	0	1.823	1.823	1	0
<i>S. mitis</i> group 1 ( <i>pneumoniae/mitis</i> )	12	1.94 ~ 2.357	2.161	12	0	1.961 ~ 2.246	2.164	12	0
<i>S. mitis</i> group 2 ( <i>pneumoniae/mitis/pseudopneumoniae</i> )	1	2.177	2.177	1	0	2.202	2.202	1	0
<i>Streptococcus mutans</i>	2	2.015 ~ 2.108	2.062	2	2	2.023 ~ 2.087	2.055	2	2
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	2.056 ~ 2.172	2.114	2	2	2.154 ~ 2.304	2.229	2	2

or *S. mitis* or *Streptococcus pseudopneumoniae*) 1 株, *S. mutans* 2 株と *S. salivarius* 2 株に分類された。遺伝子学的検査にて *S. mitis*, *S. oralis* 及び *S. tigurinus* と同定された株は, いずれもオプトヒンテスト耐性と胆汁酸溶解テスト陰性を示した。遺伝子学的検査にて菌種レベルでの鑑別が困難であった事から *S. mitis* group と分類された 13 株は, オプトヒンテスト耐性と胆汁酸溶解テスト陰性を示し, nonpneumococcal streptococci と分類された。

MALDI バイオタイパーの検査結果は, On plate 法とエタノール・ギ酸抽出法のいずれの抽出法を実施した場合でも遺伝子学的同定検査結果と 100% (135/135 株) で属一致, 81.5% (110/135 株) で菌種一致を示した。遺伝子学的検査にて *S. infantarius* と *S. infantis* に同定された株は, MALDI バイオタイパーでは Score Value が 1.7 以上 2.0 未満でそれぞれ *Streptococcus lutetiensis* と *Streptococcus peroris* に同定された。遺伝子学的検査と生化学的検査にて *S. mitis*, *S. oralis*, *S. tigurinus* と nonpneumococcal streptococci に分類された 23 株は, エタノール・ギ酸抽出後の測定

で *S. peroris* と同定された *S. oralis* 1 株を除き, MALDI バイオタイパーでは全ての株で *S. pneumoniae* と同定された。MALDI バイオタイパーにて遺伝子学的検査結果と菌種一致を示した株のうち, *S. anginosus* 1 株, *S. intermedius* 3 株, *S. constellatus* 1 株, *S. pneumoniae* 2 株と *S. sanguinis* 2 株は, Score Value が 1.7 以上 2.0 未満であった。また Score Value が 2.0 以上で *S. dysgalactiae* と同定された 7 株の内 3 株は, *S. pyogenes* も Score Value 2.0 以上に挙げられた (Table 3)。

## 考 察

*Streptococcus* 属菌を対象とした MALDI バイオタイパーの同定検査では, On plate 法とエタノール・ギ酸抽出法のいずれの抽出法を行っても遺伝子学的検査結果と 81.5% の菌種一致を示し, 多くの *Streptococcus* 属菌の鑑別に有用と考えられた。Schulthess ら<sup>9)</sup> は, MALDI バイオタイパー 3.3.1.0 ソフトウェアを使用した *Streptococcus* 属菌の同定検査にて菌種レベルで 74.7% の同定一致を示したと報告しており, 本検

Table 3. MALDI Biotyper identification of *Streptococcus dysgalactiae*

Strain	Direct transfer formic acid extraction				Ethanol-formic acid extraction			
	The highest score as species identification		The second score as species identification		The highest score as species identification		The second score as species identification	
	Identification	Score	Identification	Score	Identification	Score	Identification	Score
SH3126	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.155	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.031	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.155	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.031
SH3142	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.135	<i>Streptococcus equi</i>	1.649	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.179	<i>Streptococcus equi</i>	1.778
SH3263	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.113	<i>Streptococcus equi</i>	1.758	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.151	<i>Streptococcus canis</i>	1.751
SH3266	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.199	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.925	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.176	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.985
SH3473	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.301	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.96	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.304	<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.954
SH3967	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.409	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.022	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.135	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.073
SH5165	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.216	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.127	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2.103	<i>Streptococcus pyogenes</i>	2.087

討結果と同様の同定一致率であった。また *Streptococcus* 属菌の生化学的性状を調べる API 20 Strep (bioMérieux), API Rapid ID 32 Strep (bioMérieux), BD Phoenix (BD) や Vitek 2 (bioMérieux) による同定検査は 26~79% の同定能を示すと報告されており<sup>4)~6)</sup>、本装置による同定検査は生化学的同定検査よりも高い同定性能と考えられた。

本研究にて同定一致を示した *Streptococcus* 属菌種の割合は 70.6% (12/17 菌種) であった。一方で Kärpänöja ら<sup>10)</sup> は *Streptococcus* 属菌の基準菌株の内、93.6% (44/47 菌種) について同定が可能であったと報告しており、リファレンスライブラリに未登録である *Streptococcus inae* に加え、*S. infantarius* と *S. mitis* の同定が困難であったことや本検討では菌種同定に至らなかった *S. oralis* と *S. infantis* が同定可能だったことを報告している。

本検討にて同定不一致となった株の 88% (22/25 株) は *S. mitis* group に属する菌種であった。また Werno ら<sup>11)</sup> と Schulthess ら<sup>9)</sup> も *S. mitis* group の同定検査については、菌種レベルの鑑別が困難であったと報告している。*S. mitis* group は、rRNA 遺伝子配列が近似した集団であるため、バクテリアのリボソームサブユニットタンパク質を主な標的とした MALDI バイオタイパーによる解析能では鑑別が困難であったと考えられる。本検討結果も踏まえ、*S. pneumoniae* やその類縁菌種が疑われた際は、本装置による解析に加えオプトヒンテストや胆汁酸溶解テストなどの追加検査を行う必要があると考える。*S. mitis* group の他に、

MALDI バイオタイパーにて同定不一致や Score Value 2.0 未満の低スコアを示した *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus* と *S. infantarius* の 4 菌種は、MALDI バイオタイパー 3.1 ソフトウェアにおけるリファレンススペクトラ数が、それぞれ 2 株、1 株、2 株と 1 株であり、*S. agalactiae* (9 株) や *S. pyogenes* (8 株) と比較し登録数が少なかった。その為、現行の MALDI バイオタイパーでは一部の菌種に対するリファレンススペクトラ数が少ないため、高い Score Value が得られなかったと考えられる。今後同定精度を上げるためには、同定が困難であった菌株もしくは Score Value が 2.0 未満であった菌株のリファレンススペクトラを登録し、MALDI バイオタイパーのリファレンスライブラリを充実させる必要があると考える。

MALDI バイオタイパーにて *S. dysgalactiae* と同定された内の 3 株は、次候補に Score Value 2.0 以上で *S. pyogenes* が挙げられた。また Schulthess ら<sup>9)</sup> が報告した MALDI バイオタイパーを使用した *S. dysgalactiae* の同定検査の中では、最も高い Score Value で挙げられた菌名が遺伝子学的検査結果と 100% 一致を示したと報告していることから、*S. dysgalactiae* が Score Value 2.0 以上且つ第一候補に挙げられた場合には同定菌名と決定できるかもしれない。その為、今後より多くの *S. dysgalactiae* の検査データを蓄積する必要がある。現段階において *S. dysgalactiae* と *S. pyogenes* が Score Value 2.0 以上に挙げられた株については追加検査としてバシトラシン感受性やピロリドニ

ルアリルアミダーゼ活性を確認した方が良いと考える。

今回、MALDI バイオタイパーは、*Streptococcus* 属菌の同定検査において高い同定性能を示し、臨床的に有用な同定機器であると考えられた。しかし現在のところ本システムは *Streptococcus* 属菌について遺伝子学的に近縁な菌種間の鑑別やリファレンススペクトラの少ない菌種の同定が困難であり、今後は菌種同定解析ソフトウェアについて、より詳細なスペクトル解析を可能とするアルゴリズムの設定や更なるリファレンスライブラリの充実が望まれる。

利益相反：申告すべき利益相反なし

## 文 献

- 1) Welker, M. 2011. Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* 11: 3143-3153.
- 2) 寺本華奈江, 佐藤浩昭. 2008. 質量分析法によるバクテリアの迅速同定・分類法の進歩. *日本質量分析学会* 56 (3): 83-90.
- 3) Versalovic, J, KC. Carroll, G Funke, et al. 2011. *Manual of clinical microbiology*. vol. 1. 10th ed. p. 610-615. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 4) Tales, C, A Smith, G Ramage, et al. 2011. Identification of clinically relevant viridans group streptococci by phenotypic and genotypic analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 243-250.
- 5) Gavin, P.J, J.R Warren, A.A Obias, et al. 2002. Evaluation of Vitek 2 System for Rapid Identification of Clinical Isolate of Gram-Negative Bacilli and Members of the Family *Streptococcaceae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21: 869-874.
- 6) Davies, A.P, M Reid, S.J Hadfield, et al. 2012. Identification of Clinical Isolates of  $\alpha$ -Haemolytic Streptococci by 16S rRNA Gene Sequencing, Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Using MALDI Biotyper, and Conventional Phenotypic Methods: a Comparison. *J. Clin. Microbiol.* 50 (12): 4087-4090.
- 7) 松本竹久, 松田和之, 本田孝行. 2010. 16S rRNA 遺伝子配列を利用した菌種同定. *検査と技術* 11: 1053-1058.
- 8) Zbinden, A., N. Köhler, G.V. Bloemberg. 2011. *recA*-Based PCR Assay for Accurate Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Other Viridans Streptococci. *J. Clin. Microbiol.* 49 (2): 523-527.
- 9) Schulthess, B, K Brodner, V.G Bloemberg, et al. 2013. Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Comparison of Different Preparation Methods and Implementation of a Practical Algorithm for Routine Diagnostics. *J. Clin. Microbiol.* 51 (6): 1834-1840.
- 10) Kärpänoja, P, I Harju, K Rantakokko-Jalava, et al. 2014. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of viridans group streptococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 33 (5): 779-788.
- 11) Werno, A.M, M Christner, T.P Anderson, et al. 2012. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal Streptococci of the *Streptococcus mitis* Group by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50 (9): 2863-2867.

## Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of streptococci

Yusuke Ota<sup>1)</sup>, Takehisa Matsumoto<sup>2)</sup>, Eriko Kasuga<sup>2)</sup>, Kazuki Horiuchi<sup>2)</sup>, Tatsuya Negishi<sup>2)</sup>,  
Tomomi Yaguchi<sup>2)</sup>, Tatsuya Natori<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Health and Medical Sciences, Shinshu University, Nagano, Japan

<sup>2)</sup>Department of Laboratory Medicine, Shinshu University Hospital, Nagano, Japan

The performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems were evaluated in the identification of streptococci. A total of 135 clinical isolates were analyzed using a Bruker MALDI Biotyper system. This system correctly identified 100% (135/135) of *Streptococcus* isolates to the genus-level and 81.5% (110/135) to the species-level for two sample preparation methods (on-plate formic acid preparation and ethanol-formic acid extraction). Several bacterial species could not be identified to the species-level by this system because of few number of reference spectra in current reference library. It is necessary to improve reference library in MALDI Biotyper for the more accurate identification of clinically significant *Streptococcus* strains.