

# 質量分析法を用いた基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ産生菌検出法の構築に関する検討

池ヶ谷佳寿子<sup>1,2)</sup>・松村有里子<sup>2)</sup>・島 圭介<sup>3)</sup>・岩澤 篤郎<sup>2)</sup>・木村 哲<sup>2)</sup>・土屋 憲<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 静岡市立清水病院検査技術科\*

<sup>2)</sup> 東京医療保健大学大学院医療保健学研究科

<sup>3)</sup> 島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター

受付日：2018年5月2日 受理日：2018年8月28日

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計 (MALDI-TOF MS) を用いた微生物同定法が臨床応用され、低コストで迅速性と正確性に優れた微生物同定が実現した。さらに薬剤耐性菌の早期検出に向けた研究が行われている。カルバペネマーゼ産生菌に対して、抗菌薬とその加水分解産物を MALDI Biotyper で捉えることにより検出できることが報告されているが、VITEK<sup>®</sup> MS で検討された報告は少ない。本研究は、基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBLs) の検出を目的として、VITEK<sup>®</sup> MS を用い、cefotaxime (CTX) を基質として加水分解産物の確認を試みた。供試菌株は *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup> (感性株)、*E. coli* NCTC 13462 (*bla*<sub>CTX-M</sub> group 2 産生株) および *Klebsiella pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> BAA-1705<sup>™</sup> (KPC 産生株) とした。CTX を生理食塩水で溶解し、35°C、60 分間反応後のマススペクトルは、455.77 Da (プロトン付加体) と 477.85 Da (ナトリウム付加体) のシグナルが確認された。2-cyano-4-hydroxycinnamate (CHCA) の 2 量体のシグナル強度を用いて標準化した相対シグナル強度  $I_{456}$  および  $I_{478}$  と CTX 量との間に直線関係が認められた。CTX と *E. coli* NCTC 13462 の菌懸濁液を混和後のマススペクトルには、369.86 Da と 413.74 Da の新たなシグナルが観察された。カルバペネマーゼ産生菌でも同様のシグナルが確認された。以上のことから、VITEK<sup>®</sup> MS においても CTX と  $\beta$  ラクタマーゼによる反応生成物を捉えることにより ESBLs の検出が可能であることが確認された。さらに、MALDI-TOF MS で検出可能な化合物は、シグナル強度を標準化することで CTX に対する ESBLs 産生菌の薬剤感受性を推察できる可能性が示唆された。

**Key words:** antibiotics, antibiotic resistance, MALDI-TOF MS, cefotaxime, hydrolysis

## はじめに

現在、カルバペネマーゼ産生菌<sup>1)</sup>や基質特異性拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBLs) 産生菌<sup>2)</sup>などの薬剤耐性菌が世界的拡散をみせている。日本では、ESBLs 産生菌の分離頻度の増加が顕著である<sup>3)</sup>。ESBLs はペニシリン系薬のみならず、 $\beta$  ラクタマーゼに安定な広域スペクトルのセファロsporin系薬をも加水分解するため、感染症治療の難渋化につながるこ

から問題視されている。また、ESBLs 産生菌の多くがヒトの腸管に定着する腸内細菌科細菌であることから耐性遺伝子が拡散することも ESBLs 産生菌の急激な増加の一因と考えられている。そのため、ESBLs 産生菌は排泄介助や糞便処理などによっても拡散する可能性があり、感染対策上の重要性が指摘されている。

近年、微生物の同定検査にマトリックス支援レー

\*静岡県静岡市清水区宮加三 1231

ザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry : MALDI-TOF MS) が導入され, 細菌同定検査の迅速化が実現した。体外診断用医療機器として, わが国で利用できる MALDI-TOF MS 装置は VITEK<sup>®</sup> MS (bioMérieux) と MALDI Biotyper (Bruker Japan) が承認・市販されている。MALDI-TOF MS の菌種同定に要する時間は, 数分であり, その結果は 16S rRNA 遺伝子配列に基づく結果との一致率が高い<sup>4)</sup>。また, 従来の菌種同定方法と比較して低コストで検査結果を得ることができる。さらに近年では, MALDI-TOF MS を薬剤耐性菌の検出に応用する研究が行われ<sup>5,6)</sup>, メチシリン耐性菌やバンコマイシン耐性菌, カルバペネマーゼ産生菌などの検出法が報告されている。過去の研究で使用された機種は主として MALDI Biotyper であり<sup>5,7,8)</sup>, VITEK<sup>®</sup> MS が使用された報告は少ない<sup>9)</sup>。

以上の背景から, ESBLs 産生菌を VITEK<sup>®</sup> MS により検出する方法を構築することを目的として本研究を実施した。

## I. 材料と方法

### 1. 供試菌株

供試菌株は *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup> (感性株), *E. coli* NCTC 13462 (*bla*<sub>CTX-M</sub> group 2 産生株) および *Klebsiella pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> BAA-1705<sup>TM</sup> (KPC 産生株) を用い, ポアメディア<sup>®</sup> ハートインフュージョン寒天培地 (栄研化学) に塗抹後, 35℃, 大気下で一晩培養した。

### 2. 薬剤感受性検査

薬剤感受性検査は Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)<sup>10)</sup> の方法に準じ, 微量液体希釈法にて最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。薬剤感受性検査の精度管理株は, *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup> を用いた。

### 3. MALDI-TOF MS 用試料の調製

供試菌株を滅菌食塩水で McFarland No. 1.0 の濁度に調製した後, 薬剤感受性キットであるドライブプレート '栄研' DPD-1 (栄研化学) の cefotaxime (CTX) (32 μg/mL) ウエルに 100 μL 接種した。35℃ の大気下で 60 分間接触させた後, 各ウエルの上清を試料として MALDI-TOF MS 分析に供した。

## 4. 質量分析

### 1) マススペクトル (MS) 測定

試料 4 μL をターゲットスライド (bioMérieux) に滴下して乾燥後, マトリックス溶液として 2-cyano-4-hydroxycinnamate (CHCA) のアセトニトリル溶解液を 1 μL 重層して自然乾燥し, MALDI-TOF MS 測定試料とした。測定には, VITEK MS<sup>®</sup> Plus (SARAMIS<sup>®</sup> Premium Database version : 4.10, システムバージョン : 4.0.0.14, bioMérieux) 装置を用い, リニアモードで質量範囲 150~1,000 Da の positive イオンスペクトルを検出した。質量は, CHCA のピークである 190.05 Da ([M+H]<sup>+</sup>) と 379.09 Da ([2M+H]<sup>+</sup>) を用いて校正した。

### 2) プロダクトイオンスペクトル (MS/MS) 測定

MS/MS 測定は, AXIMA<sup>®</sup> Confidence (島津製作所) 装置で行い, CHCA (5 mg) をアセトニトリル/0.1% トリフルオロ酢酸 (1/1) 混合溶液 (1 mL) に溶解してマトリックス溶液とした。ターゲットスライドに, 試料 0.5 μL を滴下して自然乾燥し, マトリックス溶液 0.5 μL を重層して自然乾燥後, リフレクトロンモードで, 加速電圧を 20 kV として positive イオンスペクトルを検出した。

### 3) フローインジェクション分析

フローインジェクション分析には, 液体クロマトグラフィオントラップ—飛行時間型質量分析計 (Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Ion Trap-Time of Flight : LCMS-IT-TOF) (島津製作所) を用いた。McFarland No. 1.0 の濁度に調製した *E. coli* NCTC 13462 を CTX ウエルに接種して 1 時間大気下で反応後, その上清を 50% アセトニトリル水溶液で 10,000 倍希釈し, 0.20 μm メンブレンフィルターでろ過して測定用試料とした。液体クロマトグラフィーは, 流量 0.2 mL/min, 移動相 0.05% ギ酸とアセトニトリルの 1 : 1 混合溶媒とし, カラムは使用しなかった。先に調整した測定用試料は 1 μL 注入した。エレクトロスプレーイオン化法 (Electron Spray Ionization : ESI) にてイオン化し, 質量 200~600 Da の範囲で positive イオンスペクトルと negative イオンスペクトルを検出した。

## II. 結果

### 1. 薬剤感受性検査成績

微量液体希釈法による各抗菌薬に対する MIC 値を Table 1 に示す。*E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup> は, am-

Table 1. Results of antibiotic susceptibility testing for the test strains

	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	ATCC <sup>®</sup> 25922 <sup>TM</sup>	NCTC 13462	ATCC <sup>®</sup> BAA-1705 <sup>TM</sup>
ampicillin	4	$\geq 32$	$\geq 32$
cefotaxime	$\leq 1$	$\geq 64$	16
ceftazidime	$\leq 1$	4	32
cefepime	$\leq 1$	$\geq 64$	32
cefmetazole	$\leq 1$	$\leq 1$	32
imipenem	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	8
meropenem	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	16
gentamicin	$\leq 1$	$\geq 16$	0.5
amikacin	$\leq 2$	$\leq 2$	16
levofloxacin	$\leq 0.125$	0.5	$\geq 16$
ciprofloxacin	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$	$\geq 8$

picillin (ABPC), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (CFPM), cefmetazole (CMZ), imipenem (IPM), meropenem (MEPM), gentamicin (GM), amikacin (AMK), levofloxacin (LVFX), ciprofloxacin (CPF) に対していずれも感性を示した。*E. coli* NCTC 13462 は, CTX :  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$ , CAZ :  $4 \mu\text{g/mL}$ , CFPM :  $\geq 64 \mu\text{g/mL}$  と CMZ :  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ , IPM :  $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$ , MEPM :  $\leq 0.25 \mu\text{g/mL}$  の MIC 値を示し, 典型的な ESBLs 産生菌の感受性パターンであった。一方, *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> BAA-1705<sup>TM</sup> は, IPM :  $8 \mu\text{g/mL}$ , MEPM :  $16 \mu\text{g/mL}$  とカルバペネム系薬にも耐性を示した。

## 2. MALDI-TOF MS による CTX の分析

CTX を生理食塩水と 60 分間反応後の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 1 (a) に示す。379.00 Da に CHCA の 2 量体 [(CHCA)<sub>2</sub>] の分子イオンシグナル ([2M+H]<sup>+</sup>), 455.77 Da と 477.85 Da に CTX に由来する MS スペクトルが観測された。

次に, シグナル強度と CTX 量との関係について検討を行った。本検討では内部標準物質を用いていないため, 測定ごとのシグナル強度を直接比較することができない。そこで, (CHCA)<sub>2</sub> のシグナル強度を用いて各シグナル強度の標準化を試み, 相対シグナル強度 ( $I_x$  :  $x$  は質量数) とした。 $I_{456}$  および  $I_{478}$  の相対シグナル強度と CTX 量の関係を Fig. 2 に示す。ターゲットスライド上の CTX 量と  $I_{456}$  または  $I_{478}$  の間には直線関係が認められた。最小二乗法を用いて近似式を求めたところ, eq. (1) および eq. (2) が得られた。 $y$  は相対シグナル強度,  $x$  は CTX 量 ( $\mu\text{g/mL}$ ),  $R^2$  は決定係数である。

$$I_{456} ([M+H]^+) : y = 0.0277x + 0.3539 \quad (R^2 = 0.974) \quad \text{eq. (1)}$$

$$I_{478} ([M+Na]^+) : y = 0.0278x - 0.0857 \quad (R^2 = 0.979) \quad \text{eq. (2)}$$

## 3. MALDI-TOF MS による CTX の加水分解産物の検出

CTX を *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup> または *E. coli* NCTC 13462 の懸濁液と 60 分間反応後の MALDI-TOF MS スペクトルを Fig. 1 (b) および Fig. 1 (c) に示す。

*E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup> 懸濁液と CTX を反応させた際の MS スペクトル [Fig. 1 (b)] は, 生理食塩水との反応時と同様, 455.73 Da と 477.76 Da のシグナルが観測された。一方, *E. coli* NCTC 13462 の懸濁液と CTX を反応させた場合は, 456 Da と 478 Da 付近にシグナルは観察されず, 369.86 Da と 413.74 Da にシグナルが観測された [Fig. 1 (c)]。

$\beta$  ラクタマーゼによる CTX の加水分解産物の精密質量は 495.05 である。CTX の加水分解後の反応を Fig. 3 に示す。CTX が加水分解され, 精密質量 495.05 の構造 [Fig. 3 (b)] となり, 脱炭酸, 脱アセチル化, 縮合環化の過程を経て精密質量 396.06 の構造 [Fig. 3 (g)] となる。また, Fig. 3 (b) の構造から, 脱アセチル化の過程を経て精密質量 413.05 の構造 [Fig. 3 (d)] となる。MALDI-TOF MS 分析で得られた 370 Da と 414 Da のシグナルをプリカーサーイオンとして MS/MS 分析を行い, 得られた MS/MS スペクトルを Fig. 4 に示す。414 Da をプリカーサーイオンとしたとき, 126.14, 169.26, 201.16, 213.13, 259.15, 326.25, 352.37, 370.23 Da

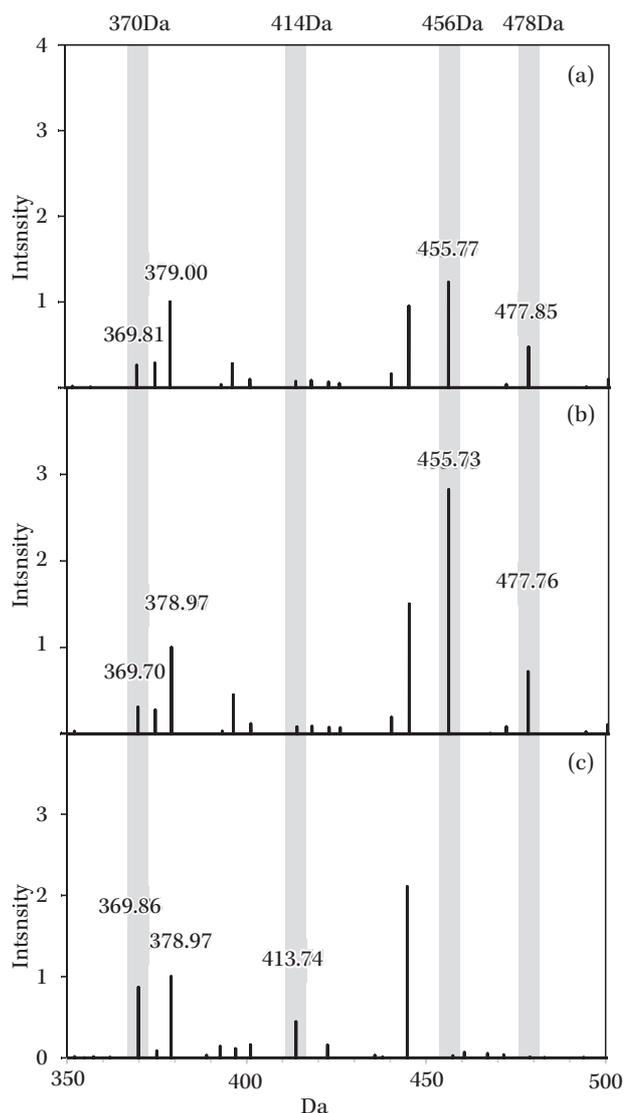


Fig. 1. MALDI-TOF MS spectra of the culture supernatant of a strain with cefotaxime for 60 min. (a) without strain, (b) *Escherichia coli* ATCC® 25922™, and (c) *E. coli* NCTC 13462.

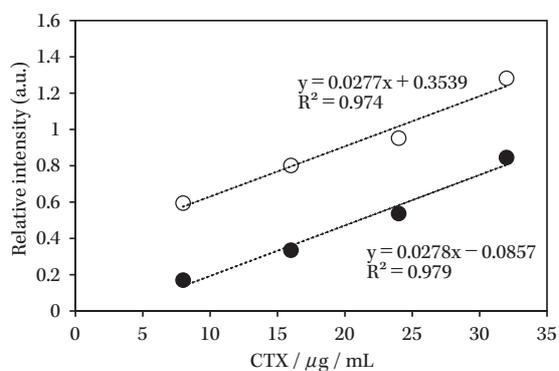


Fig. 2. Relationship between  $I_{456}$  (○) or  $I_{478}$  (●) and the cefotaxime content.

にフラグメントイオンが観測された [Fig. 4 (a) \*印]。一方、370 Da をプリカーサーイオンとしたとき、126.10, 169.12, 201.14, 213.14, 259.14, 326.18, 352.17 Da にフラグメントイオンが観測された [Fig. 4 (b) \*印]。

フローインジェクション分析による MS スペクトルを Fig. 5 に示す。Negative シグナルは観測されず、413.24 Da に positive シグナルが観測された。

ESBLs 産生菌における検討をもとに、他の  $\beta$  ラクターマーゼにおいても各相対シグナル強度の変化について *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ を用い

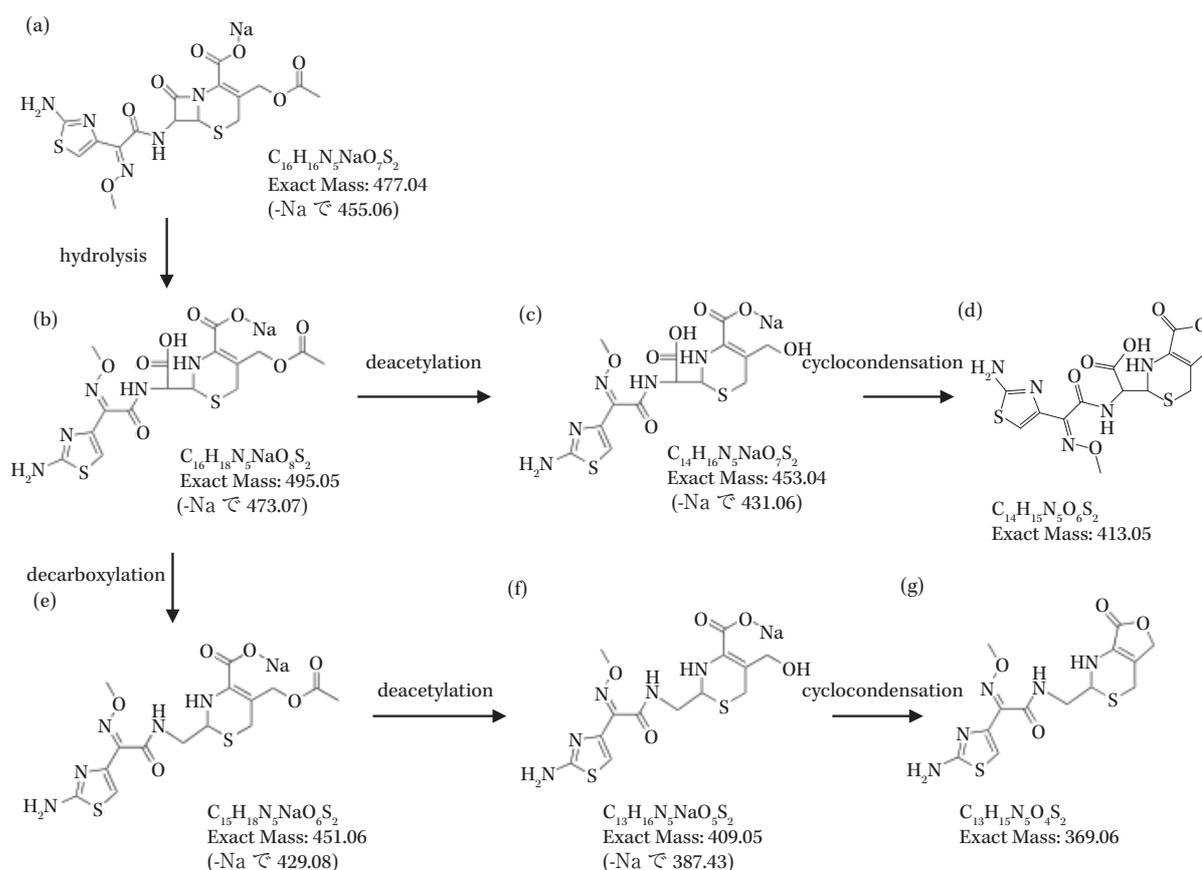


Fig. 3. Assumed reaction mechanism after hydrolysis of cefotaxime.

て検討した。*E. coli* NCTC 13462 と同様に 370 Da と 414 Da にシグナルが検出された。McFarland No. 0.5 の 10 倍希釈, McFarland No. 0.5, McFarland No. 1.0 の相対シグナル強度 ( $I_{370}$ ,  $I_{414}$ ,  $I_{456}$ ,  $I_{478}$ ) を Fig. 6 に示す。*E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup> では, CTX 由来の  $I_{456}$  および  $I_{478}$  と加水分解産物由来の  $I_{370}$  および  $I_{414}$  は, 菌液濁度が上昇しても相対シグナル強度に変化は認められなかった。一方, *E. coli* NCTC 13462 では, CTX 由来の  $I_{456}$  および  $I_{478}$  は, 菌液濁度の上昇にしたがって減少し, CTX 加水分解産物由来の  $I_{370}$  と  $I_{414}$  は菌液濁度の上昇とともに増加した。また, *K. pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> BAA-1705<sup>TM</sup> では, CTX 由来の  $I_{456}$  は菌液濁度が上昇すると減少したが,  $I_{478}$  に傾向は認められなかった。一方, CTX 加水分解産物に由来する  $I_{370}$  と  $I_{414}$  はいずれも菌液濁度の上昇とともに増加した。

### III. 考察

MALDI-TOF MS による薬剤耐性菌の迅速な検出には, 細菌が産生する酵素による抗菌薬の分解産

物の検出が有用である<sup>5)</sup>。今回われわれは, VITEK<sup>®</sup> MS を用いて CTX の分解産物を検出することにより, ESBLs 産生菌を検出する方法の構築を試みた。

*E. coli* NCTC 13462 の懸濁液と反応させた際の MS スペクトルでは, 456 Da と 478 Da 付近にシグナルは観測されず, 369.86 Da と 413.74 Da にシグナルが観測された。これは, *E. coli* NCTC 13462 が産生する加水分解酵素によって CTX の構造変化が起こり, 加水分解産物が観測されたものと推察された。しかし, CTX の加水分解後の構造について, 先行研究では<sup>11)</sup>詳細に解析されていない。 $\beta$  ラクタマーゼの加水分解反応による分解産物の精密質量は, 基質が CTX の場合は 495.05 となるが, MALDI-TOF MS で検出された質量数は 370 Da と 414 Da である。370 Da と 414 Da のシグナルを同定するために, MALDI-TOF MS 分析で得られた各シグナルをペアレントイオンとして MS/MS 分析を行った。370 Da をペアレントイオンとしたときのフラグメントイオンのパターンは, 414 Da をペアレントイ

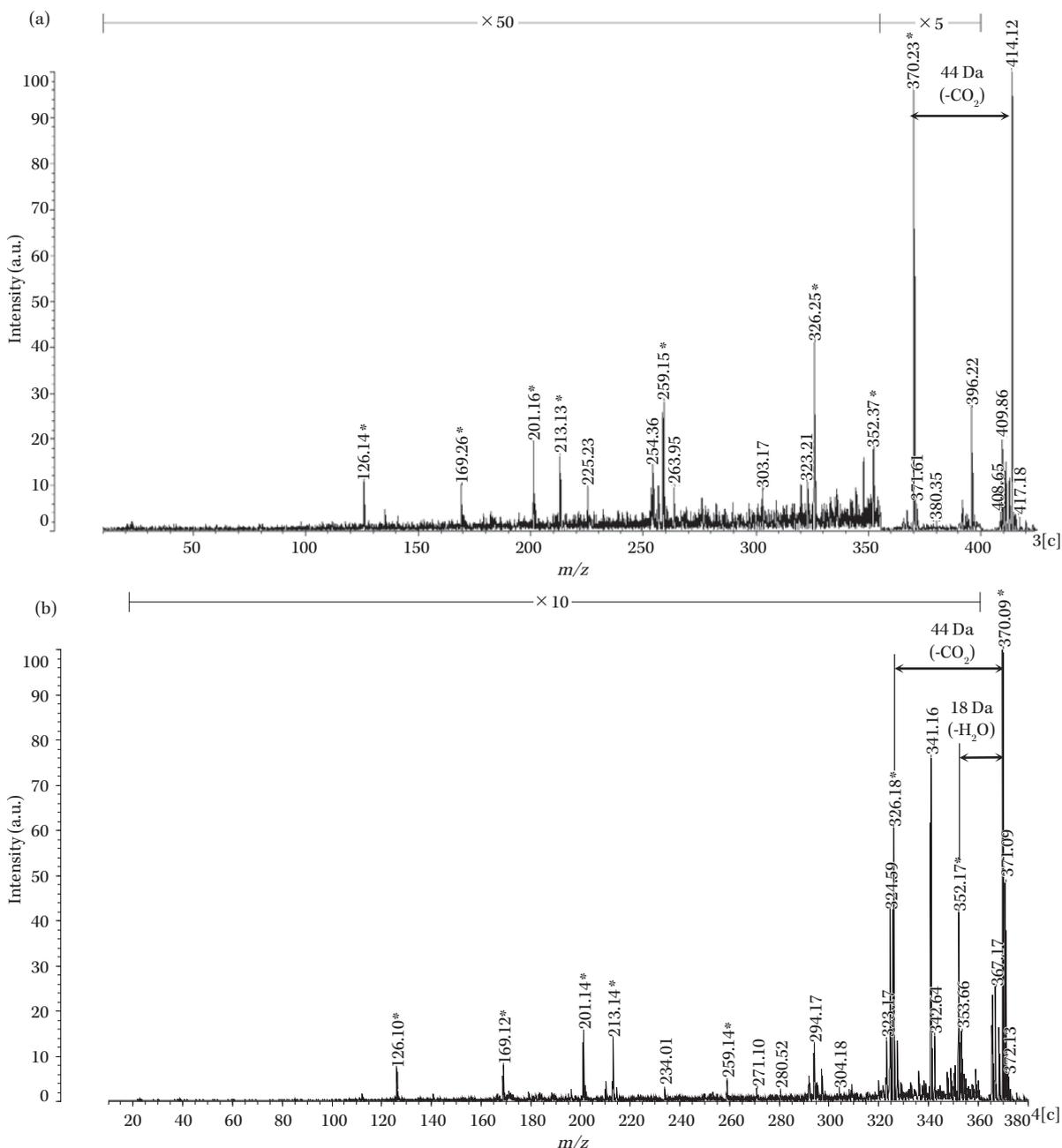


Fig. 4. Mass spectrometry/mass spectrometry spectra of hydrolyzed cefotaxime. The precursor ions were 414 Da (a) and 370 Da (b).

オンとして測定したときのパターンと同じであり、かつ、414 Da のフラグメントイオンに 370 Da に相当するフラグメントイオンが観測されたことから、370 Da の構造は 414 Da から生成したものであることが同定された。また、得られた MS/MS スペクトルからアミノ酸配列を解析し、構造推定すると、370 Da および 414 Da のシグナルを示す化合物はいずれも CTX 加水分解関連化合物であることが明らか

となった。

CTX 加水分解関連化合物である 370 Da および 414 Da の化合物が、どの段階で生成されるのか検討した。ESBLs 産生菌の *E. coli* NCTC 13462 と CTX を反応させたときの上清のフローインジェクション分析を行った。このとき、単独のシグナルしか観測されなかったことは、上清中に 413.24 Da の化合物しか存在しないことを意味しており、CTX

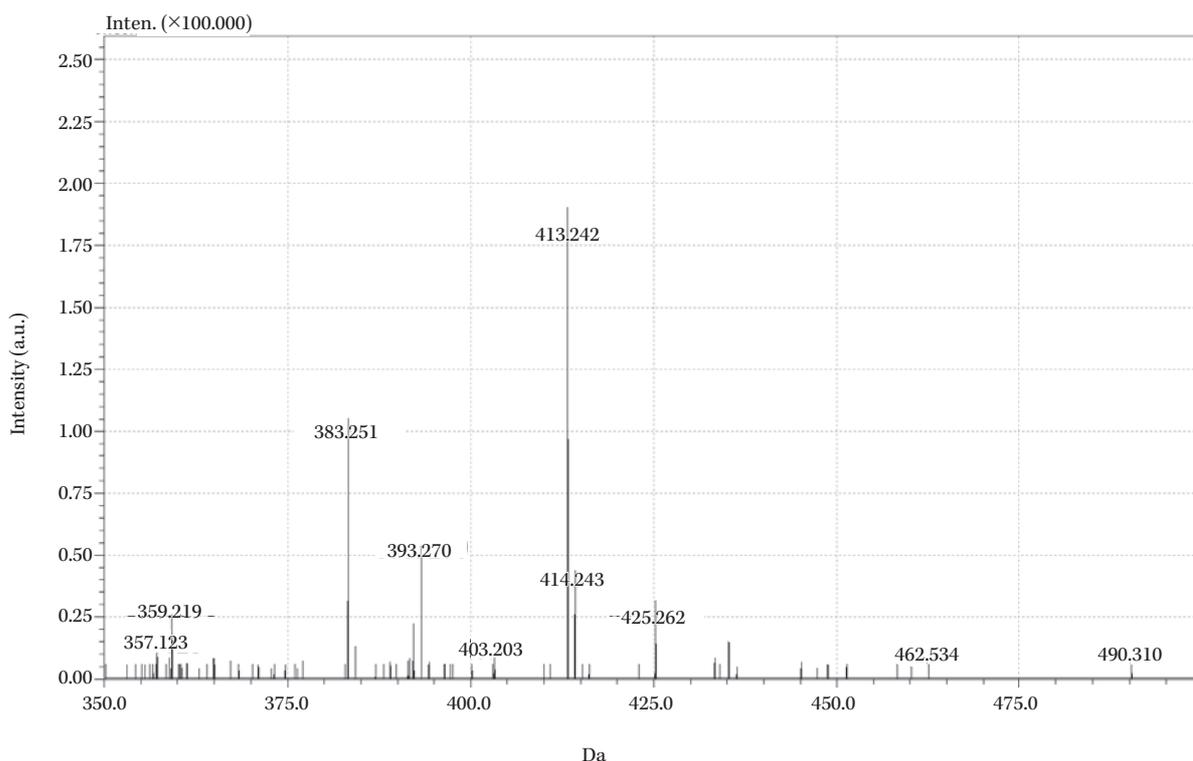


Fig. 5. Liquid chromatography-mass spectrometry spectra of the reaction solution of *Escherichia coli* NCTC 13462 with cefotaxime for 60 min.

の加水分解関連化合物は系内では Fig. 3 (d) の構造として存在することが示唆された。MALDI-TOF MS のイオン化法はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI) であり、試料とマトリックスとからなる混晶にレーザー光を照射すると、混晶のイオン化が瞬時に起こりマトリックスと試料間でのプロトン授受により試料がイオン化される原理である。一方、フローインジェクション分析におけるイオン化法は ESI であり、溶液状態の試料が気化する過程で溶媒から試料にプロトン ( $H^+$ ) が供給されることで試料がイオン化される原理である。本研究において、フローインジェクション分析により培養上清中には 414 Da の化合物のみ存在することが確認され、さらに MS/MS 分析から 370 Da の化合物は 414 Da の化合物から脱炭酸して生成したものであることが明らかになったことから、MALDI-TOF MS で検出された 370 Da の化合物は、MALDI によるイオン化の過程で生成したものと考えられる。CTX の加水分解関連化合物が MALDI-TOF MS 分析では Fig. 3 (d) と (g) の化合物として観測されたことに対し、フローインジェクション分析では

Fig. 3 (d) の化合物として観測されたことは、質量分析を行う際のイオン化法の違いによるものと考えられた。また、本実験において、*K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705™ でも *E. coli* NCTC 13462 と同様に CTX の加水分解関連化合物が確認されたことから、CTX を用いた MALDI-TOF MS による  $\beta$  ラクターマーゼの検出において、CTX の加水分解関連化合物の 370 Da と 414 Da のシグナルが適用可能であることが明らかとなった。

得られたシグナル強度の評価の方法として、既報では抗菌薬と (CHCA)<sub>2</sub> のシグナル強度の比を計算する、あるいは代謝産物と抗菌薬のシグナル強度の比を計算する手法が用いられている<sup>12,13)</sup>。本研究では、各シグナル強度と (CHCA)<sub>2</sub> のシグナル強度の比を計算し、シグナル強度の標準化を行った。近似式 eq.(1) および eq.(2) は決定係数が 0.97 以上であり、良い相関性を示した。このことは、これらの式を検量線として用いることで、測定サンプルから得られた相対シグナル強度から試料内の CTX 量を算出することができることを意味すると考えられた。さらに、未知化合物に対するシグナルについても、

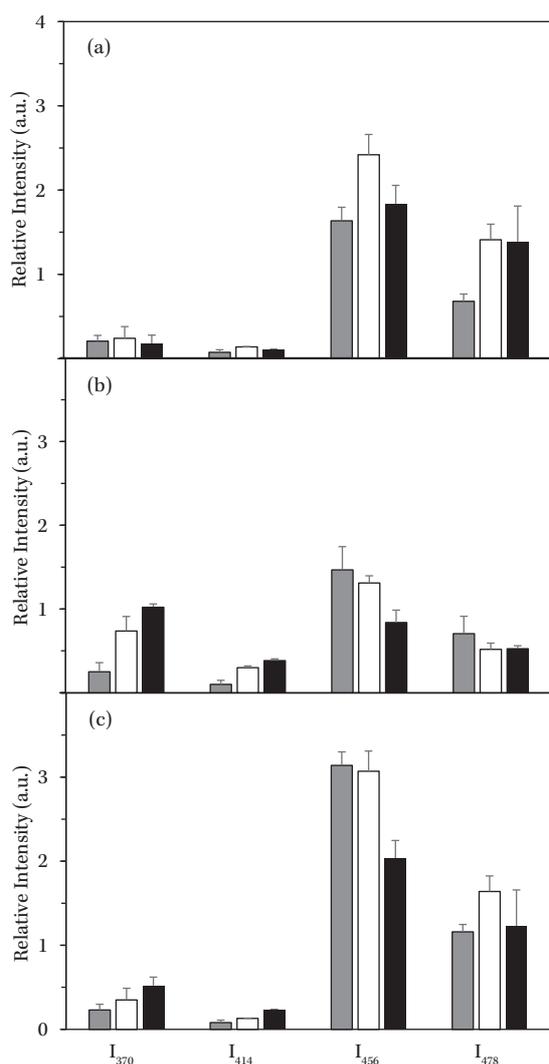


Fig. 6. Influence of bacterial concentration on the relative intensities ( $I_{370}$ ,  $I_{414}$ ,  $I_{456}$ ,  $I_{478}$ ) after 60 minutes' incubation with cefotaxime. Tenfold dilution of McFarland No. 0.5 (grey) ( $n = 3$ ), McFarland No. 0.5 (white) ( $n = 3$ ), and McFarland No. 1.0 (black) ( $n = 3$ ). (a): *Escherichia coli* ATCC® 25922™, (b): *E. coli* NCTC 13462, (c): *Klebsiella pneumoniae* ATCC® BAA-1705™. Data are represented as mean  $\pm$  standard deviations (error bars).

量の変化を比較できることが示唆されたことから、CTX や CTX の加水分解関連化合物の相対シグナル強度は、菌の産生する加水分解酵素によって起こる加水分解反応の程度が反映されているものと考えられた。

本研究の限界として、ESBLs 産生菌とカルバペネマーゼ産生菌の限られた菌株を用いた検討であり、他の  $\beta$  ラクタマーゼ産生菌に関する検討は行って

いないことが挙げられる。さらに、今後は臨床分離株を含む菌株を用いて感度・特異度あるいは陽性的中率や陰性的中率の検討が必要である。

#### おわりに

以上のことから、VITEK® MS と市販の微量液体希釈法による薬剤感受性検査キットを用いて、抗菌薬とその加水分解産物を捉えることが可能であり、検出されたシグナル強度を CHCA の 2 量体のシグナル強度で標準化することで、ESBLs 産生菌の検出が可能となることが示された。

#### 謝 辞

本研究は、YM が JSPS 科研費 JP17K18199 の助成を受けて実施しました。

利益相反自己申告：著者である島 圭介は、株式会社島津製作所の社員である。池ヶ谷佳寿子、松村有里子、岩澤篤郎、木村 哲、土屋 憲は、申告すべきものなし。

#### 文献

- 1) Nordmann P, Naas T, Poirel L: Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791-8
- 2) Doi Y, Iovleva A, Bonomo R A: The ecology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med* 2017; 24 (suppl\_1): S44-51
- 3) Yamasaki K, Komatsu M, Yamashita T, Shimakawa K, Ura T, Nishino H, et al: Production of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase and IMP-1 metallo beta-lactamase by five Gram-negative bacilli: survey of clinical isolates from seven laboratories collected in 1998 and 2000, in the Kinki region of Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 631-8
- 4) Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al: Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1169-75
- 5) Hrabák J, Chudáčková E, Walková R: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 103-14
- 6) Hooff G P, van Kampen J J, Meesters R J, van Belkum A, Goessens W H, Luider T M: Characterization of  $\beta$ -lactamase enzyme activity in

- bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res* 2012; 11: 79-84
- 7) Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudáková E, Bergerová T: Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3222-7
  - 8) Chan W S, Chan T M, Lai T W, Chan J F, Lai R W, Lai C K, et al: Complementary use of MALDI-TOF MS and real-time PCR-melt curve analysis for rapid identification of methicillin-resistant staphylococci and VRE. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 441-7
  - 9) Mirande C, Canard I, Buffet Croix Blanche S, Charrier J P, van Belkum A, Welker M, et al: Rapid detection of carbapenemase activity: benefits and weaknesses of MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 2225-34
  - 10) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second informational supplement M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2012
  - 11) Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M: Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 927-37
  - 12) Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel J M, Drissi M, et al: Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012; 7: e31676
  - 13) Lasserre C, De Saint, Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, et al: Efficient detection of carbapenemase activity in *enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2163-71

## MALDI-TOF mass spectrometry for detection and identification of extended-spectrum $\beta$ -lactamases

Kazuko Ikegaya<sup>1,2)</sup>, Yuriko Matsumura<sup>2)</sup>, Keisuke Shima<sup>3)</sup>,  
Atsuo Iwasawa<sup>2)</sup>, Satoshi Kimura<sup>2)</sup> and Ken Tsuchiya<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Clinical Laboratory, Shizuoka City Shimizu Hospital, 1231 Miyakami, Shimizu-ku, Shizuoka, JAPAN

<sup>2)</sup> Division of Infection Prevention and Control, Tokyo Healthcare University

<sup>3)</sup> Shimadzu Corporation

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been applied for microorganism identification, and is widely used in the field of clinical microbiology, with economic and diagnostic benefits. Recently, it has been used for the detection of antibiotic resistance by monitoring the hydrolysis of antibiotics. There are many reports of detection of carbapenemase with the MALDI Biotyper, however, there have been no studies using VITEK<sup>®</sup> MS. The aim of this work was to confirm the hydrolysis of cefotaxime (CTX) using VITEK<sup>®</sup> MS, in order to detect the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup> (sensitive strain), *E. coli* NCTC 13462 (*bla*<sub>CTX-M</sub> group 2-producing strain) and *Klebsiella pneumoniae* ATCC<sup>®</sup> BAA-1705<sup>™</sup> (KPC-producing strain) were used as the test strains. On the MS spectrum, signals at 455.77 Da (proton adduct) and 477.85 Da (sodium adduct) were observed after 60 minutes' incubation of CTX in saline at 36°C. A linear relationship was observed between the amount of CTX and the relative signal intensities at I<sub>456</sub> and I<sub>478</sub>, where the signal intensities were normalized using that of the dimer of 2-cyano-4-hydroxycinnamate (CHCA). Signals at 369.86 Da and 413.74 Da appeared when a bacterial suspension of *E. coli* NCTC 13462 was used. These phenomena were observed for the carbapenemase-producing bacteria. It was found that VITEK<sup>®</sup> MS is useful for detecting ESBLs by monitoring the reaction products of CTX with  $\beta$ -lactamase. It was also suggested that the antibiotic susceptibility of ESBL-producing bacteria to CTX can be estimated from the standardized signal intensities.