

[原 著]

当院における *Staphylococcus pseudintermedius* の分離状況および生化学的性状を用いた同定法の検討

佐々木潤平¹⁾・石垣しのぶ¹⁾・松村 充²⁾・浅原美和¹⁾・厚川喜子¹⁾

市川りさ¹⁾・上村佑太¹⁾・斧 康雄³⁾・古川泰司⁴⁾

¹⁾ 帝京大学医学部附属病院中央検査部

²⁾ 帝京大学医療技術学部臨床検査学科

³⁾ 帝京大学医学部微生物学講座

⁴⁾ 帝京大学医学部臨床検査医学

(平成 30 年 11 月 8 日受付, 平成 31 年 3 月 14 日受理)

Staphylococcus pseudintermedius は、多くの微生物同定自動分析器において菌種同定データベースに登録されていないため、正確な同定が困難である。今回、当院での本菌種の分離状況の調査と正確に同定するために有用な生化学的性状について検討した。2015 年 4 月から 2016 年 10 月の期間に質量分析装置 VITEK MS (ビオメリュー・ジャパン) で同定した *Staphylococcus* 属菌の中で *S. pseudintermedius* は 0.1% (4/3,737 株) の分離頻度であった。それ以前に、微生物同定自動分析器マイクロスキャン W/A 96Plus Pos Combo Panel 3.1J (W/A 96:ベックマン・コールター) で同定された *S. intermedius* 8 株を VITEK MS で再同定したところ、*S. pseudintermedius* が 1 株存在した。5 株の *S. pseudintermedius* の同定結果は、VITEK MS と 16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および *nuc* 遺伝子に対する PCR 法で一致した。しかし、W/A 96 で同定した場合、菌種同定データベースに登録されていないことから、全ての株が *S. intermedius* と誤同定された。この問題点を解決するため、*S. intermedius* と生化学的性状を比較したところ、*S. pseudintermedius* は血液寒天培地上で *S. aureus* 様の強い β 溶血を伴う集落、クランピング因子試験陰性、マンニト分解能遅分解、DNase 強陽性という特徴が見られた。よって、上記性状を鑑別することで、*S. pseudintermedius* が菌種同定データベースに登録されていない W/A 96 を使用している施設においても正確な同定につながる事が期待された。

Key words: *Staphylococcus pseudintermedius*, 生化学的鑑別性状

1. はじめに

Staphylococcus pseudintermedius は、獣医学領域において感染症の起原菌として知られているが¹⁾²⁾、近年、ヒトに対しても感染症を引き起こすことや、人獣共通感染症との関連性についても指摘されている^{3)~5)}。しかし、ヒトを対象とした本菌種の分離頻度に関する報告は少ない。また、本菌種のメチシリン耐性(感受性)を判定する薬剤感受性試験結果は、セフォキシチンよりも、オキサシリンが有用とのことから、CLSI M100-S26 (2016 年)でオキサシリンに対するブレイクポイントが新たに設定された⁶⁾⁷⁾。このことから、同定を正確に行うことは、本菌種のオキサシリンの薬剤感受性を正しく判定する上でも重要である。本菌種は、質量分析装置では同定可能との報告がある⁸⁾。しかし、質量分析装置 VITEK MS (ビオメリュー・ジャパン) の VITEK MS Version2.0

Knowledge Base での同定では *Staphylococcus intermedius* との鑑別が可能であったが、新たな VITEK MS Version3.0 Knowledge Base では鑑別ができない。さらに、多くの微生物同定自動分析器や微生物同定検査キットで本菌種は菌種同定データベースに登録されていないことや、生化学的性状や強い β 溶血を伴うなど集落性状も類似していることから、*Staphylococcus aureus* や *S. intermedius* と誤同定されているという問題がある^{9)~12)}。

そこで今回、当院における *Staphylococcus* 属菌の分離状況を集計し、本菌種の分離頻度を把握するとともに、菌種同定データベースに本菌種が登録されていない微生物同定自動分析器での誤同定を抽出するため、微生物同定自動分析器マイクロスキャン W/A 96 Plus (W/A 96:ベックマン・コールター) の Pos Combo Panel 3.1J により、本菌種に対する誤同定菌種として報告がある *S. aureus* および *S. intermedius* と同定された保存菌株を用いて、VITEK MS の VITEK MS Version2.0 Knowledge Base による再同定を実施した。また、本菌種を正確に同定するために、VITEK MS, 16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および thermostable nuclease (*nuc*) 遺伝子を標的とした本菌種に特異的なプライマーを用いた PCR 法¹³⁾にて *S. pseudintermedius* と同定された株を W/A

著者連絡先: (〒173-0003) 東京都板橋区加賀 2-11-1
帝京大学医学部附属病院中央検査部
佐々木潤平
TEL: 03-3964-9327
FAX: 03-3964-9327
E-mail: junpei@med.teikyo-u.ac.jp

Table 1. Isolation of *Staphylococcus* species

Species	Number of strains	Isolation rate (%)
<i>S. aureus</i>	2,263	60.6
<i>S. epidermidis</i>	910	24.4
<i>S. capitis</i>	180	4.8
<i>S. haemolyticus</i>	124	3.3
<i>S. lugdunensis</i>	91	2.4
<i>S. hominis</i>	72	1.9
<i>S. warneri</i>	30	0.8
<i>S. simulans</i>	21	0.6
<i>S. auricularis</i>	14	0.4
<i>S. saprophyticus</i>	10	0.3
<i>S. schleiferi</i>	7	0.2
<i>S. pseudintermedius</i>	4	0.1
<i>S. cohnii</i>	4	0.1
<i>S. saccharolyticus</i>	4	0.1
<i>S. sciuri</i>	2	0.1
<i>S. xylosus</i>	1	0.1

96 で再同定し評価した。そして、*S. aureus*, *S. intermedius* との生化学的性状の比較を行い、これら菌種との有用な鑑別点について検討を行ったので報告する。

II. 対象および方法

1. 当院の *Staphylococcus* 属菌の分離状況

2015 年 4 月～2016 年 10 月の期間に VITEK MS で菌種同定が行われた *Staphylococcus* 属菌 3,737 株 (1 患者 1 菌種につき 1 株) を対象とし、分離状況の集計を行った。また、*S. pseudintermedius* と同定された株は 16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および *nuc* 遺伝子に対する PCR 法を実施し、菌種の再確認を行った。そして、*S. pseudintermedius* と同定されたものについて臨床情報として、入院・外来の患者区別や診療科、検査材料、感染症の原因菌であったかを調査した。

2. W/A 96 により *S. aureus* や *S. intermedius* と同定されていた菌株中における *S. pseudintermedius* の抽出

2006 年 4 月～2013 年 3 月の期間に W/A 96 で同定され、凍結保存されていた *S. aureus* 314 株と *S. intermedius* 8 株を対象とした。方法は、凍結保存されていた菌株をヒツジ血液寒天培地 (ベクトン・ディッキンソン) に分離し、35℃、24 時間好気培養後、VITEK MS で再同定した。*S. pseudintermedius* と同定された株は 16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および *nuc* 遺伝子に対する PCR 法にて菌種の再確認を行った。また、*S. pseudintermedius* と同定されたものについて臨床情報として、入院・外来の患者区別や診療科、検査材料、感染症の原因菌であったかを調査した。

3. W/A 96 での同定と生化学的鑑別性状の検討

VITEK MS, 16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および *nuc* 遺伝子に対する PCR 法にて *S. pseudintermedius* と同定された臨床分離株 5 株を対象とし、W/A 96 で再同定を実施し、同定結果を確認した。

また、生化学的性状が類似するとされる *S. aureus* および *S. intermedius* との鑑別が可能かを確認するため、標準菌株の *S. aureus* (ATCC25923) および *S. intermedius* (ATCC

Table 2. Reidentification by VITEK MS in strains identified as *S. intermedius* and *S. aureus* by W/A 96

W/A 96	VITEK MS	Number of strains
<i>S. intermedius</i>	<i>S. caprae</i>	5
<i>S. intermedius</i>	<i>S. epidermidis</i>	1
<i>S. intermedius</i>	<i>S. aureus</i>	1
<i>S. intermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	1
<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	307
<i>S. aureus</i>	<i>S. caprae</i>	4
<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	2
<i>S. aureus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	1

29663) を比較対象として以下の検査を実施した。

1) 分離培地上の集落性状

ヒツジ血液寒天培地およびクロモアガー MRSA/スタッフアウレウス分画培地 (関東化学株式会社) に分離後、35℃、24～48 時間好気培養を行い集落性状の観察を行った。

2) クランピング因子の有無

PS ラテックス ‘栄研’ (栄研化学株式会社) を用いてラテックス凝集試験を行い、凝集が認められた場合をクランピング因子陽性とした。

3) VP (Voges-Proskauer) 反応、マンニット分解能、DNase 産生

マクファーランド濁度 No.0.5 に調製した菌液を VP 半流動培地 (栄研化学株式会社) に接種し、35℃にて 24 時間培養を実施し、VP 反応を確認した。また、集落を白金線で直接少量とり、マンニット食塩加寒天培地 (ベクトン・ディッキンソン)、DNA 培地 (栄研化学株式会社) に画線塗抹後、35℃にて 24～48 時間培養を実施し、マンニット分解能および DNase 産生能を確認した。

III. 結果

VITEK MS で同定した結果、*Staphylococcus* 属菌 3,737 株中最も多く分離された菌種は *S. aureus* 2,263 株 (60.6%)、次いで *S. epidermidis* 910 株 (24.4%) であり、*S. pseudintermedius* は 4 株 (0.1%) であった。(Table 1)。この 4 株は、16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および *nuc* 遺伝子に対する PCR 法にて全て *S. pseudintermedius* と同定された。4 株の臨床情報として、3 株は外来患者 (救急科、皮膚科、耳鼻咽喉科)、1 株は入院患者 (循環器内科) からの検出で、検査材料はそれぞれ喀痰、皮膚、耳漏、鼻腔粘液であった。検査材料が皮膚と耳漏の患者では、培養結果が *S. pseudintermedius* のみ検出されたこともあり、抗菌薬が処方されていた。喀痰から検出された患者は、状態が悪いことから抗菌薬が処方されていたが、本菌種が感染症の原因菌とは考えられていなかった。鼻腔粘液から検出された患者は、抗菌薬の処方なかった。

W/A 96 で同定された *S. aureus* 314 株、*S. intermedius* 8 株の保存菌株を VITEK MS にて再同定した結果、質量分析装置では *S. pseudintermedius* と同定された株が、*S. aureus* の中には存在しなかったが、*S. intermedius* の中に 1 株存在した (Table 2)。この株は 16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および *nuc* 遺伝子に対する PCR 法から、*S. pseudinterme-*

Table 3. Identification results of *S. pseudintermedius* 5 strains by W/A 96

Specimen	Bio type (Profile code)	Identification
Sputum	313377	<i>S. intermedius</i> (83.8%), <i>S. aureus</i> (16.1%)
Skin	313277	<i>S. intermedius</i> (99.9%)
Fixed pin	317267	<i>S. intermedius</i> (90.5%), <i>S. lugdunensis</i> (5.8%)
Nasal mucus	313277	<i>S. intermedius</i> (99.9%)
Otorrhea	317277	<i>S. intermedius</i> (66.5%), <i>S. aureus</i> (33.4%)

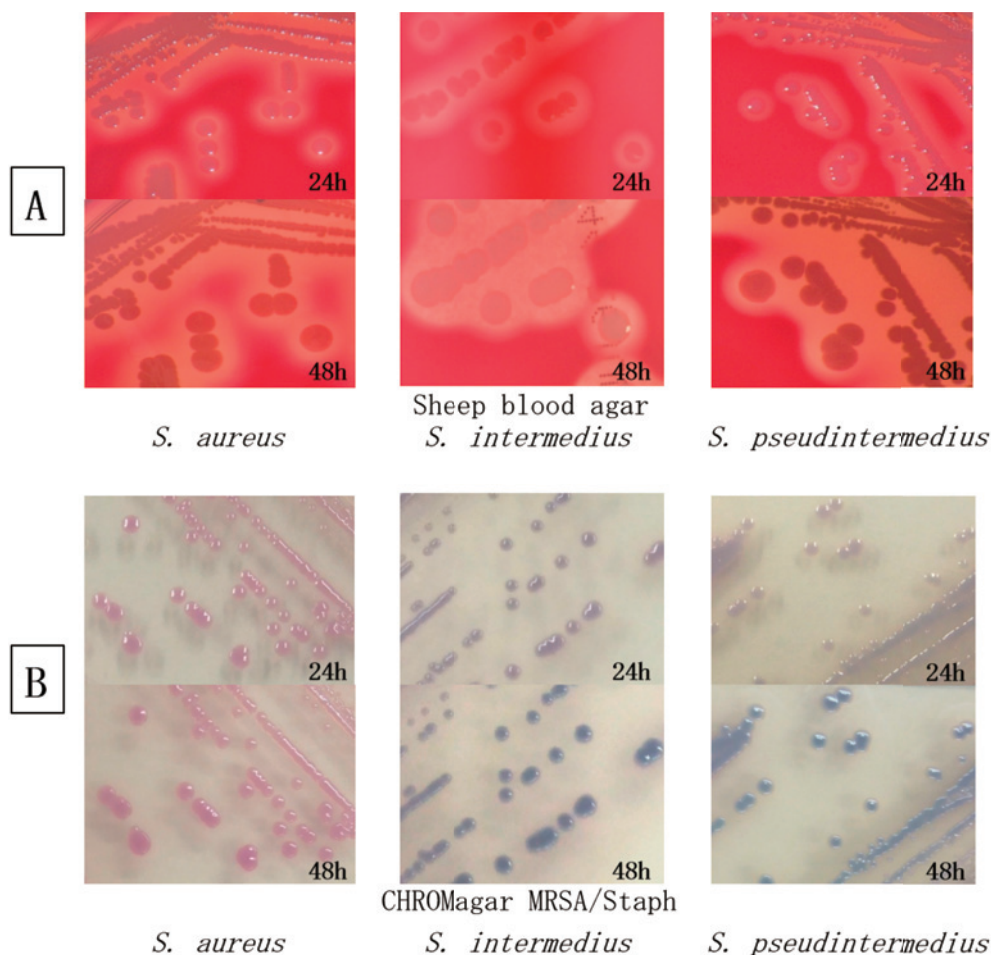


Figure 1. Comparison of colonies on sheep blood agar (Fig.1: A) and CHROMagar MRSA/Staph (Fig.1: B) for 24h and 48h culture

dius と同定された。この株の臨床情報として、入院患者（整形外科）からの検出で、検査材料は創外固定ピンであり、起因菌と推定し、抗菌薬が処方されていた。

VITEK MSで *S. pseudintermedius* と同定された5株をW/A 96で測定した結果、5株全てが同定確率83.9%, 99.9%, 90.6%, 99.9%, 66.5%で *S. intermedius* と同定された。また、同定確率が99.9%ではない3株は、次候補同定菌種として、*S. aureus* や *Staphylococcus lugdunensis* であった (Table 3)。生化学的性状からの鑑別を目的とした比較では、*S. aureus* (ATCC25923), *S. intermedius* (ATCC29663) および *S. pseudintermedius* の3菌種ともに、24時間培養のヒツジ血液寒天培地上で集落周囲に明瞭なβ溶血を示し、48時間培養の集落では、より大きく強いβ溶血を示した。ク

ロモアガー MRSA/スタッフアウレウス分画培地上での集落の色調は、24時間培養で *S. aureus* は藤色に対し、*S. intermedius* と *S. pseudintermedius* はやや青みを伴う紫色を呈し、*S. intermedius* と *S. pseudintermedius* は48時間培養でより青みが強くなった (Fig. 1)。クラumping因子試験の結果は、*S. aureus* は陽性を示したが、*S. intermedius* と *S. pseudintermedius* は陰性となった。VP反応は、24時間培養で *S. aureus* が陽性、*S. intermedius* は陰性、*S. pseudintermedius* は3株が陰性、2株が弱陽性となった (Fig. 2)。マンニット分解能は、*S. aureus* と *S. intermedius* は24時間培養で明瞭な陽性を示したが、*S. pseudintermedius* は陰性、48時間培養では陽性となり遅分解であった。DNase産生能については、24時間培養で *S. aureus* が陽性、*S. intermedius*

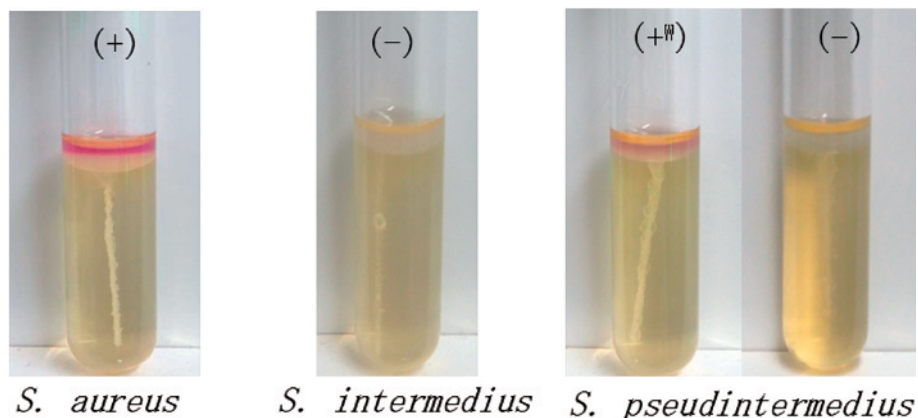


Figure 2. VP reaction
(+): Positive, (-): Negative, (+^W): Weak positive

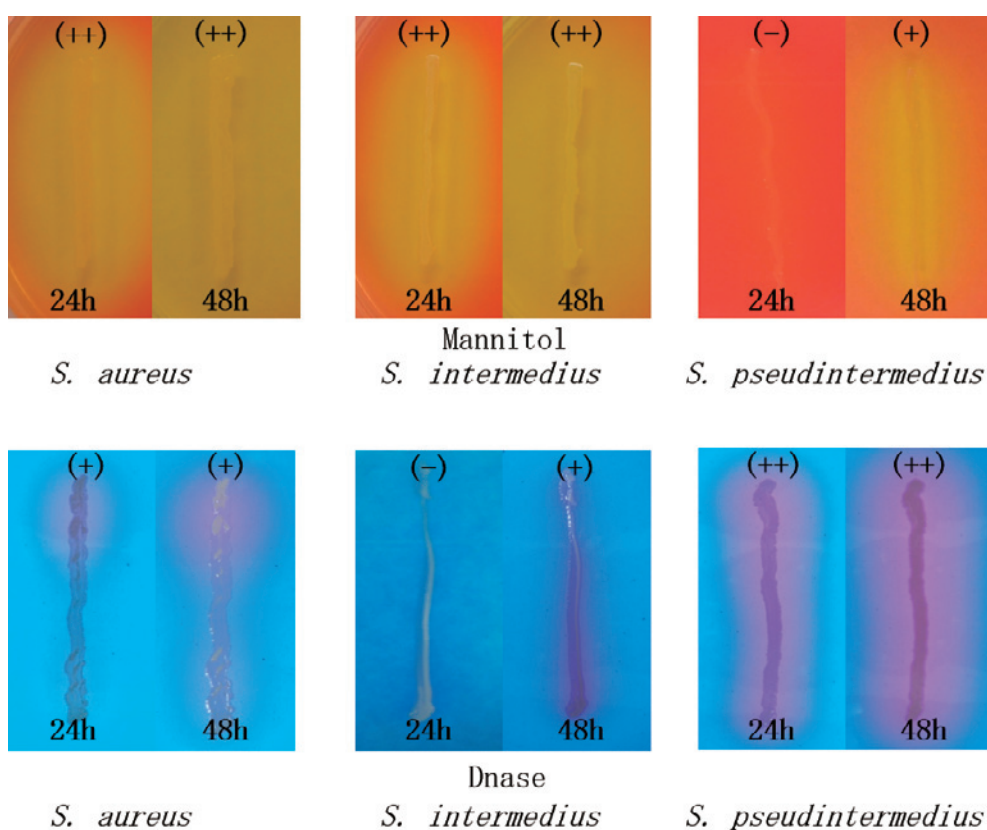


Figure 3. Mannitol fermentation and DNase production
(+ +): Strong positive, (+): Positive, (-): Negative

は陰性、*S. pseudintermedius* は強陽性を示し、48時間培養では *S. intermedius* は陽性となった (Fig. 3)。

IV. 考察

当院で分離された *Staphylococcus* 属菌 3,737 株の内訳は、*S. aureus* が 60.6% と最も多く、次いで *S. epidermidis* が 24.4%、*S. pseudintermedius* は 0.1% と少なく、*Staphylococcus schleiferi* や *Staphylococcus saccharolyticus* 等と同程度の分離頻度であった (Table 1)。*S. pseudintermedius* は獣

医学領域、特にイヌにおける常在菌かつ膿皮症などの各種感染症の起原菌として認識されているが¹⁾²⁾、ヒトの症例報告では動物接触歴はみられなかったものの、2006年に最初の報告がある³⁾。Savini らの報告⁴⁾では、人獣共通感染症のリスクについても述べられており、また近年、他にも同様の報告がされている⁵⁾¹¹⁾。本検討で *S. pseudintermedius* が分離された患者背景の解析では、動物接触歴は不明であったが、人獣共通感染症の報告もあるため、検査に際して患者背景から動物接触歴を確認することは本菌種を疑う手掛かりになると思わ

Table 4. Comparison of biochemical characteristics for differentiating *S. pseudintermedius*, *S. aureus* and *S. intermedius*

Species	Hemolysis on the sheep blood agar	Color on CHROMagar MRSA/Staph	Latex reagent for clumping factor	Mannitol fermentation 24h/48h	DNase production 24h/48h
<i>S. aureus</i>	++	Wisteria	+	++/++	+/+
<i>S. intermedius</i>	++	Blue purple	-	++/++	-/+
<i>S. pseudintermedius</i>	++	Blue purple	-	-/+	++/++

れた。また、本菌種が検出された患者で抗菌薬が処方された症例もあったが、感染症の原因菌とは限らない。今回、本菌種が分離された検査材料の多くでグラム染色が実施されておらず、実施できていれば原因菌の推定に役立っていたことも考えられる。

S. pseudintermedius が W/A 96 で他の菌種として誤同定されているか否かについて、VITEK MS による再同定で確認した結果、*S. intermedius* と同定されていた 8 株中に 1 株存在した。また、*S. intermedius* と同定されていた 8 株は、全て *S. intermedius* 以外の菌種であった (Table 2)。さらに、本検討で *S. pseudintermedius* と同定された 5 株に対する W/A 96 での同定結果は、同定確率 66.5%~99.9% で *S. intermedius* となった (Table 3)。同定確率が低かった株と、同定確率 99.9% の株とで異なる生化学的反応は、VP 反応やアルギニン分解能、マンノース分解能の項目であった。マイクロスクリーン Pos シリーズ確率表と照合すると、特に VP 反応やアルギニン分解能が陽性と判定された場合、*S. intermedius* となる同定確率は低くなり、*S. aureus* や他の菌が同定候補に挙がるものと思われた。同定確率に差は見られたものの、W/A 96 による *S. pseudintermedius* の同定では *S. intermedius* と誤同定されやすいと考えられた。しかし、実際には *S. intermedius* がヒト由来の検体からはほとんど分離されないことから、W/A 96 による同定で *S. intermedius* と同定された場合、*S. pseudintermedius* や他の *Staphylococcus* 属菌の可能性を考慮すべきと思われた。

また、VITEK MS では *S. pseudintermedius* と同定された 5 株全て 16SrRNA 遺伝子シーケンス解析および *nuc* 遺伝子に対する PCR 法でも同様の結果が得られた。しかし、現在 VITEK MS を使用する施設においては VITEK MS Version3.0 Knowledge Base による同定であると考えられ、*S. intermedius* との鑑別が必要となる。

生化学的性状を用いた鑑別性状の結果、分離培地上の特徴から *S. pseudintermedius* を疑うべき集落性状として、24 時間培養のヒツジ血液寒天培地上で集落周囲に明瞭な β 溶血を示すこと、48 時間培養のクロモアガー MRSA/スタッフアウレウス分画培地上の集落の色調が青紫色であることが分かった。しかし、*S. pseudintermedius* と他の菌種の鑑別において、ヒツジ血液寒天培地上の集落では *S. aureus* および *S. intermedius* との鑑別は難しいと考えられた。その一方で、クロモアガー MRSA/スタッフアウレウス分画培地上の集落の色調を観察することにより、同様の色調である *S. intermedius* との鑑別は困難であるが、藤色を示す *S. aureus* とは鑑別は可能と考えられた。生化学的鑑別性状の他の結果から、*S. pseudintermedius* に特徴的であった生化学的性状は、クラumping 因子試験陰性、マンニット分解能遅分解であるこ

と、DNase 産生能強陽性であることだった。生化学的性状においては、菌種が同じであっても菌株により反応が微妙に異なる場合があることも考えられるが、本検討からは *S. pseudintermedius* と *S. aureus* との鑑別には、クラumping 因子試験、マンニット分解能、DNase 産生能を、*S. intermedius* との鑑別には、マンニット分解能、DNase 産生能を確認することが有用と考えられた (Table 4)。また、これらの生化学的性状を確認することで、W/A 96 で *S. intermedius* と誤同定され VITEK MS の同定で *S. pseudintermedius* 以外の菌種であった *Staphylococcus caprae* や *S. epidermidis* においても (Table 2)、ヒツジ血液寒天培地上の集落で弱い β 溶血であることや、クロモアガー MRSA/スタッフアウレウス分画培地上の集落の色調が白色~薄桃色であることなどから、*S. pseudintermedius* との鑑別は可能であると考えられた。

現在、*S. pseudintermedius* の同定において、質量分析装置でも *S. intermedius* との鑑別は難しい。さらに、質量分析装置は導入コストが高く、現在も多くの施設では微生物同定自動分析器による同定が行われている。その場合、本菌種は菌種同定データベースに登録されていないため誤同定の可能性があり問題となる。今回の検討から、誤同定を防ぐためには、ヒツジ血液寒天培地上の集落が、*S. aureus* 様の β 溶血を示すにも関わらず、同定確率が低い場合や、*S. intermedius* と同定された場合において、クラumping 因子試験、マンニット分解能や DNase 産生能を追加試験として確認することが重要であると考えられた。これらの追加試験は本菌種を鑑別することに有用であったことから、質量分析装置での同定において *S. intermedius* との鑑別や、W/A 96 での同定を行う場合には、本菌種の生化学的性状を踏まえた追加試験を行うことで正確な同定につながることを期待された。

なお、本論文の要旨は第 28 回日本臨床微生物学会総会・学術集会 (長崎, 2017 年 1 月) において発表した。

利益相反: 申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) 石原加奈子. 2013. 獣医領域で分離される *Staphylococcus aureus* および *S. pseudintermedius* の特徴. MP アグロジャーナル 15: 29-33.
- 2) 伊從慶太. 2014. *Staphylococcus pseudintermedius* の Update. 獣医臨床皮膚科 20: 73-84.
- 3) Lieve, V.H, V Anne, B An, et al. 2006. First Case of *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Human. J.Clin. Microbiol. 44: 4609-4612.
- 4) Vincenzo, S, B Daniela, P Klaudia, et al. 2013. Methicillin-

- Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Infection in a Bone Marrow Transplant Recipient. *J.Clin. Microbiol.* 51: 1636-1638.
- 5) Arianna, P, D. N Serena, C Valentina, et al. 2015. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain. *BMC Microbiol.* 15: 109.
 - 6) Jennifer, R. S, H Andrew, B. D Joshua, et al. 2009. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *J.Vet. Diagn. Invest.* 21: 684-688.
 - 7) Wu, M. T., C.-A. D. Burnham, L. F. Westblade, et al. 2016. Evaluation of Oxacillin and Cefoxitin Disk and MIC Breakpoints for Prediction of Methicillin Resistance in Human and Veterinary Isolates of *Staphylococcus intermedius* Group. *J.Clin. Microbiol.* 54: 535-542.
 - 8) Paola, D, F Amy, B Cinzia, et al. 2011. Identification of *Staphylococcus intermedius* Group by MALDI-TOF MS. *Systematic and Applied Microbiol.* 34: 45-51.
 - 9) 笠井智子, 三枝早苗, 佐々木崇. 2010. 臨床検査機関でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) と同定された犬由来ブドウ球菌株の分類学的再検討. *獣医臨床皮膚科* 16: 119-124.
 - 10) Takashi, S, K Ken, T Yoshikazu, et al. 2007. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. *J.Clin. Microbiol.* 45: 2770-2778.
 - 11) Börjesson, S., E. Gómez-Sanz, K. Ekström, et al. 2015. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 34: 839-844.
 - 12) Somayaji, R., M.A.R. Priyantha, J.E. Rubin, et al. 2016. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn. Microbiol.Infect. Dis.* 85: 471-476.
 - 13) Takashi, S, T Sae, T Yoshikazu, et al. 2010. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. *J.Clin. Microbiol.* 48: 765-769.

Staphylococcus pseudintermedius isolation rate in our hospital and criteria for its accurate identification using biochemical tests

Junpei Sasaki¹⁾, Shinobu Ishigaki¹⁾, Mitsuru Matsumura²⁾, Miwa Asahara¹⁾, Yoshiko Atsukawa¹⁾,
Lisa Ichikawa¹⁾, Yuta Kamimura¹⁾, Yasuo Ono³⁾, Taiji Furukawa⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Teikyo University Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory Science, Faculty of Medical Technology, Teikyo University

³⁾Department of Microbiology & Immunology, Teikyo University School of Medicine

⁴⁾Department of Laboratory Medicine, Teikyo University School of Medicine

Correct identification of *Staphylococcus pseudintermedius* using a bacterial identification automatic analyzers is difficult. In fact, its misidentification as *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus intermedius* has been reported. In this study, we determined the isolation rate of *S. pseudintermedius* in our hospital and established criteria for distinguishing *S. pseudintermedius* from other staphylococci based on biochemical characteristics. The isolation rate of *S. pseudintermedius* using VITEK MS from April 2015 to October 2016 was 0.1% (4/3,737 strains). Furthermore, when 8 strains previously identified as *S. intermedius* using Microscan WalkAway 96 were reanalyzed using VITEK MS, 1 was identified as *S. pseudintermedius*. The 5 strains identified as *S. pseudintermedius* using VITEK MS matched those identified using 16S rRNA gene sequencing and PCR method targeting thermostable nuclease (*nuc*) gene. When these 5 *S. pseudintermedius* strains were analyzed by MicroScan WalkAway 96, all were misidentified as *S. intermedius*. Comparison of the biochemical characteristics of the various species revealed that *S. pseudintermedius* was negative for the latex reagent for clumping factor, but positive for slow mannitol fermentation and high DNase production. These findings suggest that it is possible to correctly identify *S. pseudintermedius* based on the above biochemical characteristics, even in laboratories that use MicroScan WalkAway 96 without matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.