

[短 報]

Vitek MS による *Enterobacter cloacae* complex の識別能の検討

松井理乃<sup>1)</sup>・細田卓也<sup>1)</sup>・和久田光毅<sup>1)</sup>・土井洋平<sup>2) 3)</sup>・鈴木匡弘<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 藤田医科大学病院臨床検査部

<sup>2)</sup> 藤田医科大学医学部微生物学講座

<sup>3)</sup> 藤田医科大学医学部感染症科

(令和2年7月14日受付, 令和2年12月24日受理)

*Enterobacter cloacae* complex に属する主要な菌種には *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. nimipressuralis* などがある。これらの菌種は生化学的性状での鑑別が困難であるため、検査室からは慣例的に *E. cloacae* complex として報告されてきた。微生物検査室において質量分析装置 (MALDI-TOF MS) が普及したことにより、生化学的性状では分類できなかった菌種についても種名が出力されるようになった。そこで本研究では、2014年1月から2018年8月の間に当院で各種臨床検体から分離され凍結保存されていた *E. cloacae* complex 54株を用い、VITEK MS による菌種同定結果と、全ゲノム解析による菌種同定結果の比較を行った。*E. cloacae* complex 臨床分離株 54株のうち、VITEK MS と Average Nucleotide Identity 法で菌種同定が完全一致したものは1株、VITEK MS が複数菌種をレポートした中に一致した菌種が含まれたものが8株で、一致率は合わせて17%にとどまった。このことから、VITEK MS で同定される *E. cloacae* complex については、現時点では菌種ではなく *E. cloacae* complex として報告することが適切と考えられる。

**Key words:** 質量分析, 全ゲノム解析, 菌種同定

近年わが国ではカルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) の検出が問題視されている。CRE の中でもカルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) の適切な感染対策や治療を行う上で、菌名の正確な同定は必須である。*Klebsiella pneumoniae* が CPE の大半を占める国外と異なり、日本で最も多く検出される CRE は *K. aerogenes* および *Enterobacter cloacae* complex であり、それぞれ CRE の約3割を占めていることから、*E. cloacae* complex の正確な同定が望まれる<sup>1)</sup>。

*Enterobacter* 属には22菌種が報告されているが、そのうち *E. cloacae* complex に属する菌種としては *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis* がある。さらに *E. hormaechei* の亜種として *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii*, *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, *E. hormaechei* subsp. *oharae*, *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* が命名されている<sup>2)</sup>。このうちカルバペネマーゼ産生 *E. cloacae* complex については *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* と *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* が多くを占めることも報告されている<sup>3) 4)</sup>。これらの菌種は生化学的性状での鑑別が困難であることから、臨床検査においては慣例的に *E. cloacae* complex と報告さ

れてきた<sup>5)</sup>。近年、臨床微生物検査室に質量分析装置 (MALDI-TOF MS) が普及したことで、今まで生化学的性状では分類できなかった菌種の同定も可能になり、*E. cloacae* complex に属する菌種についてもより詳細な菌種名が出力されるようになった。その一方で、質量分析装置による同定結果の正確性に関する報告は少なく、同定結果の信頼性に関する知見が不足している。当院では2017年に質量分析装置である VITEK MS を導入した。そこで本研究では、当院で臨床検体から分離された *E. cloacae* complex 臨床菌株を用い、VITEK MS による菌種同定結果と、全ゲノム解析による菌種同定結果の比較を行った。

当病院にて2014年1月から2018年8月の間に各種臨床検体から分離され、Microscan Walkaway 96 SI (ベックマン・コールター株式会社) の Neg Comb 6.11J パネルによって、*E. cloacae* complex と同定された54株を対象とした。供試菌株は全て凍結保存されていた。同一患者から複数の分離株が得られた場合については1株のみを採用した。

凍結菌株は、血液寒天培地で24時間分離培養したものを、さらに血液寒天培地に植え継ぎ24時間培養し、測定に用いた。VITEK MS (バイオメリュー・ジャパン株式会社) を使用し、得られたマススペクトルを専用の解析ソフト Myla ver.4.3 で解析し菌種同定を行った。マトリックスには、MS-CHCA マトリックス試薬 (バイオメリュー・ジャパン株式会社) を使用し、サンプル調製は VITEK MS の説明書に従った。すなわち純培養を爪楊枝で少量とり、VITEK MS-DS ターゲットスライドのスポットに薄く均一になるように塗布した。その後、専用マトリックス試薬を1μL 添加し、十分に乾燥

著者連絡先：(〒470-1192) 愛知県豊明市杣掛町田楽ケ窪1番地 98  
藤田医科大学医学部微生物学講座  
鈴木匡弘  
TEL: 0562-93-2433  
FAX: 0562-93-4003  
E-mail: masa-szk@fujita-hu.ac.jp

Table 1. Species identification of *E. cloacae* complex clinical isolates by VITEK MS and WGS

Identification by ANI	# of isolates	Identification by VITEK MS
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	31	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (30) <i>E. cloacae</i> / <i>E. hormaechei</i> / <i>E. asburiae</i> (1)
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	12	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (8) <i>E. cloacae</i> / <i>E. hormaechei</i> / <i>E. asburiae</i> (1) <i>E. hormaechei</i> (1) No results reported (2)
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>	1	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (1)
<i>E. asburiae</i>	6	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (6)
<i>Enterobacter</i> species Close to <i>E. asburiae</i>	2	<i>E. kobei</i> (2)
<i>E. roggenkampii</i>	1	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (1)
<i>E. ludwigii</i>	1	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (1)

させたあと、測定を行った。単回測定を基本としたが、菌名が得られなかった場合は、同日中に再測定を行った。その際、VITEK MSの説明書に従い、前述と同じ方法で再度測定を実施した。

全ゲノムシーケンスは以下の方法で行った。すなわち、被検株のゲノムDNAをDNeasy Blood and Tissue Kit (キアゲン)で抽出し、Nextera XT DNA Library Prep Kit (イルミナ)でライブラリーを作成した。シーケンスはMiSeq (イルミナ)でペアエンド法で行った。さらにA5-miseq Ver. 20160825を用い得られたDNA配列からコンティグを作成した<sup>6)</sup>。全ゲノムシーケンスデータを用いた菌種同定にはAverage Nucleotide Identity (ANI法)を用いた<sup>7)</sup>。ANI法では、全ゲノム配列を理論上1,000塩基程度ずつに切断し、類縁種のゲノム配列と比較し菌株間のゲノム配列の類似度をコンピューター上で計算する。そこで95%以上の一致を得られたものを同一菌種、98%以上の一致を得られたものを同一亜菌種とみなす方法である<sup>8)</sup>。Reference strainのゲノム塩基配列情報として*E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* LMG27195 (CP017183), *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* DSM14563 (CP007186), *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* strain DSM 16691 (CP017179), *E. hormaechei* subsp. *oharae* strain DSM 16687 (CP017180), *E. cloacae* ATCC 13047 (CP001918), *E. asburiae* strain ATCC 35953 (CP011863), *E. ludwigii* strain EN-119 (CP017279), *E. kobei* DSM27110 (SAMEA104113917), *E. roggenkampii* DSM16690 (CP017184), *E. cancerogenus* ATCC33241 (SAMEA104113916), *E. mori* LMG25706 (SAMN02471025), *E. soli* ATCC BAA-2102 (SAMN04875425), *E. bugandensis* EB-247 (NZ\_LT992502), *Lelliottia nimipressuralis* SGAir0187 (CP025034)を用いた。また、*E. asburiae*に近縁な種としてDSM\_13645 (CP017181)も用いた (*Enterobacter* sp. Close to *E. asburiae*)。

結果をTable 1に示す。被検株54株中44株がANI法により*E. hormaechei*と同定され、このうち31株が*E. hormaechei* subsp. *hoffmannii*、12株が*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*と同定された。*E. hormaechei*と同定された44株中、VITEK MSでは39株が*E. hormaechei*とは別種である*E. cloacae*/*E. asburiae*と同定された。残り5株のうち2株は*E. cloacae*/*E. hormaechei*/*E. asburiae*、1株は*E. hor-*

*maechei*と同定され、2株は同定不能であった。したがって、VITEK MSで*E. hormaechei*であることが示唆されたのは他の菌種の可能性も同時にレポートされた3株のみで、亜種に関する情報は全く得られなかった。また、ANI法で*E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis*と同定された1株はVITEK MSでは別種の*E. cloacae*/*E. asburiae*と同定された。

一方ANI法で*E. asburiae*と同定された被検株6株はVITEK MSにより全て*E. cloacae*/*E. asburiae*と同定された。ANI法で*Enterobacter* sp. Close to *E. asburiae*と同定された被検株2株はVITEK MSでは共に*E. kobei*と同定された。ANI法で*E. roggenkampii*と同定された1株はVITEK MSでは別種の*E. cloacae*/*E. asburiae*と同定された。ANI法で*E. ludwigii*と同定された被検株1株は、VITEK MSではこれも別種の*E. cloacae*/*E. asburiae*と同定された。

以上の結果を総合すると、今回供試した*E. cloacae* complex臨床分離株54株のうち、VITEK MSとANI法で菌種同定が完全一致したものは1株、VITEK MSが複数菌種をレポートした中に一致した菌種が含まれたものが8株で、一致率は合わせて17%にとどまった。また、ANI法での同定結果に関わらず、VITEK MSでは*E. asburiae*と同定される傾向が強く見られた。亜種についてはVITEK MSで同定されたものはなかった。

本研究では単施設の臨床分離株を用いており、*E. cloacae* complexの4菌種、*E. hormaechei*の3亜種のみしか同定されなかったが、これまでの報告を踏まえると、国内に多い菌種が含まれているとも考えられる<sup>9)10)</sup>。本研究の結果は、ゲノム配列をゴールドスタンダードとした際のVITEK MSの*E. cloacae* complexの菌種、亜種同定における識別能が、少なくとも現行のデータベースでは不足していることを示唆している。このことから、日常業務における菌種同定報告では*E. cloacae* complexとしての報告にとどめること、また病院疫学の調査に際してはこの同定結果に基づいた菌株間の類似性の推察は現時点では避けることが適切と考えられる。

謝辞：本研究で用いた全ゲノム解析はJSPS科研費JP17H07221の助成を受け行われたものです。

## 文 献

- 1) 国立感染症研究所薬剤耐性研究センター、国立感染症研究

- 所感染症疫学センター, 全国地方衛生研究所. 2018. カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae : CRE) 病原体サーベイランス, 2017 年. IASR 39: 162-163.
- 2) Davin-Regli, A, JP Lavigne, JM Pagès. 2019. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. Clin Microbiol Rev 32.
  - 3) Chavda, KD, L Chen, DE Fouts, et al. 2016. Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population Structure, and Resistance Mechanisms. mBio 7 (6): e02093-16.
  - 4) Peirano, G, Y Matsumura, MD Adams, et al. 2018. Genomic Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Enterobacter* spp., 2008-2014. Emerg Infect Dis 24: 1010-1019.
  - 5) Mezzatesta, ML, F Gona, S Stefani. 2012. *Enterobacter cloacae* complex : clinical impact and emerging antibiotic resistance. Future Microbiol 7: 887-902.
  - 6) Coil, D, G Jospin, AE Darling. 2015. A5-miseq : an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. Bioinformatics 31: 587-589.
  - 7) Yoon, SH, SM Ha, J Lim, et al. 2017. A large-scale evaluation of algorithms to calculate average nucleotide identity. Antonie Van Leeuwenhoek 110: 1281-1286.
  - 8) Goris, J, KT Konstantinidis, JA Klappenbach, et al. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J Syst Evol Microbiol 57 (Pt 1): 81-91.
  - 9) Aoki, K, S Harada, K Yahara, et al. 2018. Molecular Characterization of IMP-1-Producing *Enterobacter cloacae* Complex Isolates in Tokyo. Antimicrob Agents Chemother 62 (3): e02091-17.
  - 10) 香川成人, 森 伸晃, 青木弘太郎, 他. 2017. 救命救急センターで分離されたメタロ-β-ラクタマーゼ産生 *Enterobacter hormaechei*/*Enterobacter xiangfangensis* 4 株の分子疫学のおよび患者背景の解析. 日臨微誌 27: 81-87.

### Accuracy of *Enterobacter cloacae* complex species identified by Vitek MS

Rino Matsui<sup>1)</sup>, Takuya Hosoda<sup>1)</sup>, Mitsutaka Wakuda<sup>1)</sup>, Yohei Doi<sup>2) 3)</sup>, Masahiro Suzuki<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Joint Research Laboratory of Clinical Medicine, Fujita Health University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Microbiology, Fujita Health University School of Medicine

<sup>3)</sup>Department of Infectious Diseases, Fujita Health University School of Medicine

*Enterobacter cloacae* complex consists of at least 22 species, but they are difficult to distinguish based on biochemical identification. Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has improved ability to distinguish bacterial species, and MALDI-TOF MS instruments are starting to report *E. cloacae* complex at species level in clinical laboratories. The aim of this work was to compare species identification results of *E. cloacae* complex clinical isolates using VITEK MS and whole genome sequencing based on average nucleotide identity. To this end, a total of 54 unique *E. cloacae* complex bloodstream isolates collected between 2014 and 2018 were studied. Complete agreement and partial agreement were seen in 1 isolate and 8 isolates between the two methods respectively, representing 17% of the study isolates. The results suggested that *E. cloacae* complex species should be reported as such even when species were identified by VITEK MS.