

[原 著]

MALDI Biotyper・VITEK MS による *Enterobacter cloacae* complex 同定性能の評価

加藤翔也¹⁾・三浦美香¹⁾・佐藤未侑¹⁾・中谷美月¹⁾・武田夏音¹⁾・和田直樹¹⁾

矢下翔士²⁾・秋谷 学²⁾・松長海輝³⁾・望月真希⁴⁾・品川雅明⁴⁾

¹⁾ 札幌徳洲会病院臨床検査室

²⁾ 札幌東徳洲会病院検査センター

³⁾ 市立三笠総合病院診療技術部臨床検査科

⁴⁾ 日本医療大学保健医療学部臨床検査学科

(令和6年3月21日受付, 令和6年6月17日受理)

Enterobacter cloacae complex は遺伝子類似性より分類が困難とされた *E. cloacae*, *E. hormaechei* を主な菌種として含めて表記され, これらは生化学的性状, 及び MALDI-TOF MS による菌種同定は困難とされてきた。近年 MALDI Biotyper のライブラリ更新により, *Enterobacter* 属の登録菌株数が大幅に増加したが, 同定性能を検証した報告はない。我々は, 2022 年 9 月から 11 月に札幌市内の 2 施設において分離された *E. cloacae* complex 72 株を対象として, 全ゲノム解析による同定結果と質量分析装置 MALDI Biotyper, VITEK MS による菌名同定結果を比較し, 2 機種種の同定性能を評価した。MALDI Biotyper では, 最新ライブラリ (Ver. 12.0.0.0, 11897 MSPs) において Rank1 位による一致は 57 株 (79.2%), Rank10 位以内に一致菌種を含むものは 70 株 (97.2%) と高い一致率を示し, *E. hormaechei*, *E. bugandensis* の 2 菌種については Rank10 位以内に他の菌種が候補として挙がることはなく種名までの報告が可能と考えられた。VITEK MS では単独で同定されたものではなく, 複数菌種同定された中に一致菌種を含むものが 23 株で 31.9% と低い一致率となり, いずれの菌種においても *E. cloacae* complex としての報告が望ましいと考える。

Key words: *Enterobacter cloacae* complex, 質量分析, MALDI Biotyper, VITEK MS

序 文

Enterobacter 属はヒトの腸内細菌叢を構成している細菌の一種であり, 日和見感染症に関与し, 院内感染の主要な原因菌の一種とされている¹⁾。1960 年に *Enterobacter* 属が定義され²⁾, 2024 年 3 月現在 23 種と 7 亜種が登録されている³⁾。これらのうち 7 種類 (*E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*) は⁴⁾, DNA-DNA hybridization (DDH) 法の遺伝子型同定に基づき遺伝的に近縁であるため⁵⁾, *E. cloacae* complex と総称されてきた⁶⁾。これらの分類は, 生化学的性状, 及び 16S rRNA 遺伝子解析では困難であり⁶⁾⁷⁾, 微生物検査室においては *E. cloacae* complex と報告しているのが現状である。近年全ゲノム解析の菌種同定への応用により, *E. cloacae* complex の系統や分類は急速に変化している。正確な細菌の種の同定には DDH 法や全ゲノム配列の類似度にもとづいた Average nucleotide identity (ANI) 解析が最も信頼性の高い細菌同定法とされるが⁸⁾, 高度な解析装置が必要であり, かつ特殊

な技術を要するため, 一般的な検査室での実施は困難である。

現在, Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) を利用した微生物の同定が, 臨床現場に普及してきた。本邦においては, MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) と VITEK MS (bioMérieux) の 2 機種が販売されており, 2023 年度の日本臨床衛生検査技師会の報告によるとこれらの質量分析装置を同定検査に用いている施設数は, 精度管理調査に参加した 1273 施設のうち MALDI Biotyper 223 施設 (17.5%), VITEK MS 53 施設 (4.2%) とされている⁹⁾。従来, MALDI-TOF MS による *E. cloacae* complex の菌種識別は困難とされており⁶⁾, 本邦においては VITEK MS により識別困難とされた報告に留まっている¹⁰⁾。一方, 近年 MALDI Biotyper のライブラリ更新により *Enterobacter* 属の登録菌株数が大幅に増加したが, 同定性能を検証した報告例はされていない。

そこで, 今回我々は *E. cloacae* complex 臨床分離株を全ゲノム配列に基づき ANI 解析し MALDI Biotyper, および VITEK MS の 2 機種種の質量分析装置による同定性能の評価を行ったので報告する。

材料と方法

1. 対象

2022 年 9 月～11 月の 3 ヶ月間に札幌徳洲会病院 (301 床) と札幌東徳洲会病院 (336 床) の 2 施設を受診した患者の臨床材料から分離され, 外来・入院問わず MALDI Biotyper

著者連絡先: (〒004-0041) 北海道札幌市厚別区大谷地東 1 丁目 1-1
札幌徳洲会病院臨床検査室
加藤翔也
TEL: 011-890-1610
FAX: 011-890-1661
E-mail: k.shoya622181@outlook.jp

Table 1. Genome sequence of the *Enterobacter cloacae* complex strain used as reference in this study

Type strain	Assembly accession numbers
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> DSM 16691	GCF_024218835.1
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> DSM 14563	GCF_025399255.1
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> LMG 27195	GCF_001729785.1
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> DSM 16687	GCF_001471975.1
<i>E. asburiae</i> ATCC 35953	GCF_007035805.1
<i>E. kobei</i> JCM 8580	GCF_000534275.1
<i>E. roggenkampii</i> DSM 16690	GCF_001729805.1
<i>E. ludwigii</i> EN-119	GCF_000818595.1
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC 13047	GCF_905331265.2
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> ATCC 23373	GCF_000235765.1
<i>E. bugandensis</i> EB-247	GCF_900324475.1

において *E. cloacae* complex と同定された 72 株（検出患者数 65 名）を対象とした。同一患者で同じ材料から分離された場合は初回分離株のみを対象とし、別な材料から分離された場合も初回分離株のみ対象として用いた。

なお、質量分析装置の測定に用いた培養条件は、臨床材料から分離された被検菌株を BD BBL (TM) BTB 乳糖加寒天培地 (BD) にて、35℃ 24 時間好気培養をしたものを使用した。また全ゲノム解析には、純培養された被検菌株をマイクロバンク（イワキ）にて凍結保存（-80℃）されたものを使用した。

2. 全ゲノム解析

菌株の DNA を抽出し（magLEAD12gc：プレシジョンシステムサイエンス）、DNA Library を作製後（Illumina DNA prep：Illumina）、次世代シーケンシング（NextSeq1000：Illumina）を行った。出力された FastQ データは、CLC Genomics Workbench ver.23（QIAGEN）によって Contig を作成した。作成した Contig を DDBJ Fast Annotation and Submission Tool (DFAST) にて解析し、その ANI 出力結果を同定結果とした。DFAST によって用いられたリファレンスゲノムを Table 1 に記載した。また、出力された FastQ データは DDBJ Sequence Read Archive に登録した（アクセッション番号 DRR570658-570729）。

3. MALDI Biotyper による同定検査

1) ダイレクトスミア法

純培養後、独立した少量のコロニーを爪楊枝でターゲットプレートに塗布し、 α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (HCCA) マトリックス試薬（Bruker Daltonics）を 1 μ L 滴下し乾燥後、測定した。

2) 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、菌種同定には MBT Compass を使用し、ライブラリとして MALDI Biotyper Reference Library（Ver. 12.0.0.0, 11897 MSPs）を使用した。同定結果の信頼性の指標として Score Value により評価し、2.00 以上は菌種レベルの一致、1.70 以上 2.00 未満では属レベルの一致、1.70 未満は同定不能とし、Score Value 2.00 未満の場合は同じ手順で再検を行い、Score Value が高いいずれかの結果を採用した。

3) 新旧ライブラリにおける同定性能の評価

新ライブラリである MALDI Biotyper Reference Library（Ver. 12.0.0.0, 11897 MSPs）と、旧ライブラリである（Ver. 11.0.0.0, 10833 MSPs）によりそれぞれ解析し、同定性能に違いがあるか否か評価した。

4. VITEK MS による同定検査

1) ダイレクトスミア法

純培養後、独立した少量のコロニーを爪楊枝でターゲットスライドに塗布し、マトリックス-CHCA（bioMérieux）試薬を 1 μ L 滴下し乾燥後、測定した。

2) 評価方法

VITEK MS で測定し、解析ソフトウェア Myla を用いて得られたマススペクトルを解析し、データベースには KB（Knowledge base）3.0 を使用した。

結 果

1. ANI 解析による同定結果

対象菌株 72 株の ANI 解析の結果、*E. cloacae* complex のうち、最も分離頻度が高かった菌種は *E. hormaechei* 27 株（37.5%）、次いで *E. asburiae* 13 株（18.1%）、*E. kobei* 9 株（12.5%）、*E. roggenkampii* 8 株（11.1%）の順であった。また、*E. hormaechei* は 4 種の亜種に分類され、*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* 21 株が最も多かった（Table 2）。

2. ANI 解析を基準とした MALDI Biotyper の同定性能の結果

1) MALDI Biotyper による同定結果と新旧ライブラリにおける結果の比較

MALDI Biotyper 新ライブラリ（Ver. 12.0.0.0）において、Score Value 2.00 以上の Rank1 位による同定菌種で評価したところ、ANI 解析で *E. hormaechei* と同定された 27 株、*E. kobei* 9 株、*E. roggenkampii* 8 株、*E. ludwigii* 7 株、*E. cloacae* 5 株、*E. bugandensis* 1 株は、いずれも同様の菌種名の結果であり菌種レベルでは 100% 一致していた（Table 2）。

ANI 解析の同定結果に対し、MALDI Biotyper において旧ライブラリ（Ver. 11.0.0.0）と新ライブラリ（Ver. 12.0.0.0）における同定一致率を Table 3 に示した。Score Value 2.00 以上の Rank1 位の同定結果による評価では、新ライブラリで ANI 解析と同定結果が一致したのは 72 株中 57 株

Table 2. Identification of *Enterobacter cloacae* complex using MALDI-TOF MS and ANI analysis

ANI	Number of strains	MALDI-TOF MS identification			
		MALDI Biotyper*		VITEK MS	KB3.0
		Ver.11	Ver.12		
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	21	<i>E. cloacae</i> (17) <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (4)	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (19) <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (1) <i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> (1)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (18) <i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> / <i>E. hormaechei</i> (3)	
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	4	<i>E. cloacae</i> (4)	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i> (4)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (3) <i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> / <i>E. hormaechei</i> (1)	
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>	1	<i>E. bugandensis</i> (1)	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (1)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (1)	
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	1	<i>E. cloacae</i> (1)	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> (1)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (1)	
<i>E. asburiae</i>	13	<i>E. asuburiae</i> (8) <i>E. bugandensis</i> (5)	<i>E. asuburiae</i> (4) <i>E. bugandensis</i> (5) <i>E. roggenkampii</i> (2) <i>E. kobei</i> (2)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (13)	
<i>E. kobei</i>	9	<i>E. bugandensis</i> (8) <i>E. asuburiae</i> (1)	<i>E. kobei</i> (9)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (8) <i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> / <i>E. kobei</i> (1)	
<i>E. roggenkampii</i>	8	<i>E. asuburiae</i> (5) <i>E. bugandensis</i> (3)	<i>E. roggenkampii</i> (8)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (7) <i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> / <i>E. hormaechei</i> (1)	
<i>E. ludwigii</i>	7	<i>E. cloacae</i> (4) <i>E. ludwigii</i> (3)	<i>E. ludwigii</i> (7)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (7)	
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	3	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (3)	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (3)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (3)	
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	2	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> (1) <i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (1)	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> (2)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (2)	
<i>E. sichuanensis</i>	2	<i>E. asuburiae</i> (1) <i>E. bugandensis</i> (1)	<i>E. bugandensis</i> (1) <i>E. kobei</i> (1)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (2)	
<i>E. bugandensis</i>	1	<i>E. bugandensis</i> (1)	<i>E. bugandensis</i> (1)	<i>E. cloacae</i> / <i>E. asburiae</i> (1)	

*: Identification by Rank1. (): Matching number of strains

Table 3. ANI analysis of *Enterobacter cloacae* complex and comparison of identification by MALDI Biotyper for each version

ANI	Number of strains	MALDI Biotyper identification (%)			
		Identification by Rank1.		Identification by Within 10 ranks with a score value of 2.0 or higher	
		Ver.11	Ver.12	Ver.11	Ver.12
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	21	0 (0.0)	19 (90.5)	0 (0.0)	21 (100.0)
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	4	0 (0.0)	4 (100.0)	0 (0.0)	4 (100.0)
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>	1	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	1	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
<i>E. asburiae</i>	13	8 (61.5)	4 (30.8)	11 (84.6)	13 (100.0)
<i>E. kobei</i>	9	0 (0.0)	9 (100.0)	8 (88.9)	9 (100.0)
<i>E. roggenkampii</i>	8	0 (0.0)	8 (100.0)	0 (0.0)	8 (100.0)
<i>E. ludwigii</i>	7	3 (42.9)	7 (100.0)	7 (100.0)	7 (100.0)
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	3	3 (100.0)	3 (100.0)	3 (100.0)	3 (100.0)
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	2	1 (50.0)	0 (0.0)	2 (100.0)	2 (100.0)
<i>E. sichuanensis</i>	2	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>E. bugandensis</i>	1	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)	1 (100.0)
Total	72	16 (22.2)	57 (79.2)	32 (44.4)	70 (97.2)

Table 4. Number of strains in the library in MALDI-TOF MS

Species	MALDI-TOF MS		
	MALDI Biotyper		VITEK MS
	Ver.11	Ver.12	KB3.0
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	1	1	○**
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hoffmannii</i>	—	6	—
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	—	6	○**
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	—	8	○**
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>	2	8	—
<i>E. asburiae</i>	3	3	○
<i>E. kobei</i>	3	5	○
<i>E. roggenkampii</i>	—	5	—
<i>E. ludwigii</i>	1	5	○
<i>E. cloacae</i>	10	—*	○**
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	2	6	○**
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	2	2	○**
<i>E. sichuanensis</i>	—	—	—
<i>E. bugandensis</i>	8	13	—
<i>E. cancerogenus</i>	1	1	○

— : unlisted species

*: These registered strains were revalidated and deleted

** : These subspecies are identified as a species group

Table 5. Case of identification of *Enterobacter cloacae* complex by MALDI Biotyper

Method		Strain 1	Strain 2	Strain 3
ANI		<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	<i>E. bugandensis</i>	<i>E. roggenkampii</i>
MALDI Biotyper Ver.12	Rank.1	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (2.18)	<i>E. bugandensis</i> (2.32)	<i>E. roggenkampii</i> (2.42)
	Rank.2	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (2.16)	<i>E. bugandensis</i> (2.32)	<i>E. roggenkampii</i> (2.39)
	Rank.3	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (2.11)	<i>E. bugandensis</i> (2.27)	<i>E. roggenkampii</i> (2.34)
	Rank.4	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (2.11)	<i>E. bugandensis</i> (2.25)	<i>E. roggenkampii</i> (2.32)
	Rank.5	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (2.10)	<i>E. bugandensis</i> (2.25)	<i>E. kobei</i> (2.26)
	Rank.6	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (2.08)	<i>E. bugandensis</i> (2.24)	<i>E. asburiae</i> (2.24)
	Rank.7	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (2.07)	<i>E. bugandensis</i> (2.24)	<i>E. bugandensis</i> (2.21)
	Rank.8	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i> (2.05)	<i>E. bugandensis</i> (2.21)	<i>E. kobei</i> (2.18)
	Rank.9	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i> (2.04)	<i>E. bugandensis</i> (2.19)	<i>E. bugandensis</i> (2.18)
	Rank.10	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i> (2.04)	<i>E. bugandensis</i> (2.19)	<i>E. kobei</i> (2.17)

(): Score Value

(79.2%) に対し、旧ライブラリでは16株 (22.2%) であった。また、ANI 解析と一致した同定結果が Score Value 2.00 以上で Rank10 位以内にランクインされた評価では、新ライブラリ 72 株中 70 株 (97.2%) に対し、旧ライブラリでは 32 株 (44.4%) であり、いずれの評価においても明らかに新ライブラリの方が高い同定性能であることが確認された。なお、菌種別でみると、特に *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. roggenkampii*, *E. ludwigii* において旧ライブラリから新ライブラリにかけて改善がみられた。そこで、新旧ライブラリの登録菌株数を調べたところ (Table 4), *E. hormaechei* は3株から29株, *E. kobei* では3株から5株, *E. roggenkampii* では未登録から5株, *E. ludwigii* では1株から5株に増えていることが確認された。また, *E. sichuanensis* については新旧いずれのライブラリにおいても登録がされていなかった。

2) MALDI Biotyper における新ライブラリによる同定結果の一例

MALDI Biotyper において新ライブラリ (Ver. 12.0.0.0) による同定では、72 株のほとんどの株は、Rank1 位から10 位まで Score Value 2.00 以上にて菌種名が表示される結果であった。そこで、ANI 解析により *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, *E. bugandensis*, *E. roggenkampii* と同定された株における新ライブラリの結果を一例として Table 5 に示した。例えば, *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* では Rank1 位は ANI 解析と一致していても Rank10 位以内に異なる亜種名が混在していた。*E. bugandensis* に関してはライブラリに登録されている株数が充実されているため Rank1 位から Rank10 位まですべて ANI 解析と一致した菌種名を得ることが可能であった。*E. roggenkampii* はライブラリ登録菌株数の関係上 Rank4 位までは一致した菌種名であるが、Rank5 位以降は異なる菌種名が表示されていた。

3. ANI 解析を基準とした VITEK MS の同定性能の結果

VITEK MS では、すべての株において複数菌種が併記される結果であり、菌種を特定するには至らなかった。なお、複数菌種の中で ANI 解析と一致した菌種が含まれていたのは 23 株 (31.9%) 存在した (Table 2)。

考 察

MALDI Biotyper における *E. cloacae* complex の同定性能は、Rank1 位の評価では、旧ライブラリ (Ver. 11.0.0.0) は 22.2% (16/72) の株しか同定できない結果であった。特に、*E. hormaechei* については、27 株全てが同定できず、*E. cloacae* が上位候補にあがる結果が多かった (Table 2)。これに対し、新ライブラリ (Ver. 12.0.0.0) では 100% (27/27) 菌種レベルで同定することが可能であり、明らかな同定性能の向上がみられた。これについては、ライブラリの登録数が 3 株から 29 株に増えていることが要因と考えられた。*E. kobei*, *E. roggenkampii*, *E. ludwigii* の新ライブラリによる同定性能の向上においても、同様の理由が考えられた。このライブラリの修正においては、旧ライブラリ (Ver. 11.0.0.0) 以前に登録されていた *E. cloacae* complex の菌株を全ゲノム解析したところ、多くが菌種名の変更などがされており、登録株の再検証が行われたとされている。その結果、*E. hormaechei* の亜種名の分類を含めた登録菌株数の大幅な増加に加え、新たに *E. roggenkampii* が登録される結果となった。一方で、*E. cloacae* に関しては登録株数が旧ライブラリ (Ver. 11.0.0.0) の 14 株に対し、新ライブラリ (Ver. 12.0.0.0) では 8 株と減少している。これは、登録菌株の再検証が行われた結果、削除された株が 10 株、追加登録が 4 株となったことによるものとされている。以上のことから、*E. cloacae* complex の識別能が向上し、高精度の同定が可能となったと考えられる。

Table 5 において左列の ANI 解析より *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* と同定されたものは、MALDI Biotyper 新ライブラリにおいて Rank10 位まで *E. hormaechei* の菌種レベルでは一致した結果となった。これは *E. hormaechei* のライブラリ登録数が 29 と大幅に増加していることに起因する。しかし、亜種名に関するライブラリ登録数は 8 株であるため、10 候補の中に最大でも 8 つまでしか該当菌種は含まれないことから、Score Value の近い他の亜種が Rank10 位以内に含まれる結果になったと考えられる。本検討において *E. hormaechei* と同定された全ての菌株では、Rank10 位以内に本菌種以外が候補に含まれた例はなく、さらに ANI 解析にて *E. hormaechei* 以外に同定された菌種においても本菌種が候補として同定されることもなかった。したがって、*E. hormaechei* の識別性能は優れていることが確認されており、現段階では亜種名までの鑑別は難しいが、菌種レベルの鑑別は可能であると考えられた。中列の *E. bugandensis* においては、ライブラリ登録数が 13 株であることから、Rank 10 位以内に全て本菌種が表示されたと考えられ、正確に菌種同定できることが確認された。右列の *E. roggenkampii* と同定された株は、ライブラリ登録数が 5 株であったことから、Rank4 位までの一致に留まった可能性が考えられ、Rank 5 位以降は Score Value 2.00 以上で複数菌種が混在する結果

となった。*E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. cloacae* についても同様にライブラリ登録数が 10 株以下であることから、Rank1 位が ANI 解析と一致していても、Rank10 位以内に分類学的に類似する他の菌種が Score Value 2.00 以上で混在する結果であった。その他 *E. cloacae* complex については、Rank1 位は ANI 解析と一致せず、Rank10 位以内に存在していたり、一部は同定候補に含まれない株も存在した。以上より、*E. hormaechei* は種名までの識別が可能と考えられ、検出数が 1 株しかなかった *E. bugandensis* も同様に識別できることが示唆された。*E. hormaechei* と *E. bugandensis* 以外の菌種においては、Rank3 位まで菌種名が同一であれば ANI 解析による同定結果と一致し、菌種推定が可能なることも考えられたが、Rank10 位までに複数の類縁菌が混在し、他の *Enterobacter* 属の可能性を否定できないため、現段階では従来通り *E. cloacae* complex の報告に留めるのが望ましいと考えられた。また、前処理法によるスコア値への影響を確認する目的でオンプレートギ酸抽出法、及びエタノール・ギ酸抽出法によりライブラリ (Ver. 12.0.0.0) にて解析したが、それぞれ Rank1 位の結果と ANI 解析との一致率は 77.8% (56/72), 76.4% (55/72) であり、Rank1~10 位までの候補についてもダイレクトスメア法とほぼ同様の傾向が確認された。これらの結果からも *E. cloacae* complex の同定結果はライブラリの充実度に依存するものと考えられた。

VITEK MS においては、現在の最新のデータベースは KB 3.2 となっているが、本検討に使用した KB 3.0 も登録菌種に変わりはなく、各菌種の登録数はいずれのバージョンにおいても非公開となっている。Table 4 に示したように MALDI Biotyper の Ver. 12.0.0.0 では 8 菌種 7 亜種が登録されているのに対し、VITEK MS では 6 菌種 5 亜種の登録数と留まっており、*E. cloacae* と *E. asburiae* は分類できず *E. cloacae*/*E. asburiae* と菌種群として同定され、*E. hormaechei* を含め亜種までの同定は困難である。Table 2 より、ANI 解析にて *E. hormaechei* と同定された 27 株のうち、VITEK MS で *E. hormaechei* の可能性が示唆されたのは 4 株のみであった。しかし、これらはいずれも *E. cloacae*/*E. asburiae*/*E. hormaechei* と同定されることから、菌種の特定には至らない結果であった。また、ANI 解析より、*E. roggenkampii* と同定された 1 株については、VITEK MS では *E. cloacae*/*E. asburiae*/*E. hormaechei* と同定され、*E. hormaechei* が別の菌種においても誤同定される株が存在している。その他全 72 株全てにおいて、*E. cloacae*/*E. asburiae* が同定候補に含まれ、*E. cloacae* complex の菌種識別が困難であった。その要因として、マススペクトル波形は十分に得られていたことからデータベースの問題が考えられたが詳細は不明であった。今回の検討結果から VITEK MS においては、*E. cloacae* complex の菌種名が単独で完全に一致した株はなかった。以上のことから、VITEK MS においてすべての *E. cloacae* complex に属する菌名が同定されたものに対しては、現状通り *E. cloacae* complex と報告することが望ましいと考えられた。

本検討より各臨床微生物検査室に普及されてきた質量分析装置の一種である MALDI Biotyper では、新ライブラリにより *E. cloacae* complex の同定性能が向上していることが

確認された。質量分析装置による菌種識別能にはライブラリに登録されるリファレンス株の正確性および登録菌株数が関与しており、その重要性を再認識した。従来 *E. cloacae* complex については、生化学的性状や 16S rRNA 遺伝子解析では鑑別できず、hsp60 遺伝子の塩基配列決定により *E. cloacae* complex は 13 のクラスターに分けられ菌種の分類がされてきたが¹⁾、今後 ANI 解析を含めた更なる遺伝子解析が進み、ライブラリ登録菌株数が上がってくことで、MALDI TOF-MS により分類することが可能であることが推察される。しかし、分類する意義が未解明な部分が多いのが現状であり、その状況で臨床へ報告するのは困難である。今後、明らかとなっていない薬剤感受性も含め、菌種ごとに保有する病原因子なども調べ、菌種識別の必要性を明らかにしていくことも重要であると考えられる。

本論文の要旨は第 35 回日本臨床微生物学会・学術集会 (2024 年 2 月横浜) にて発表した。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Sanders Jr, W. E., C. C Sanders. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical microbiology reviews* 10 (2): 220-241.
- 2) Hormaeche, E., P. R Edwards. 1960. A proposed genus *Enterobacter*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 10 (2): 71-74.
- 3) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature

(LPSN).

<https://lpsn.dsmz.de/genus/enterobacter> 2024 年 3 月 1 日現在.

- 4) Hoffmann, H., A Roggenkamp. 2003. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Applied and environmental microbiology* 69 (9): 5306-5318.
- 5) Mehlen, A., M. Goeldner, S. Ried, et al. 2004. Development of a fast DNA-DNA hybridization method based on melting profiles in microplates. *Systematic and applied microbiology* 27 (6): 689-695.
- 6) Davin-Regli, A., J. P Lavigne, J. M Pagès. 2019. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clinical microbiology reviews* 32 (4).
- 7) Rahi, P., E. Mühle, C. Scandola, et al. 2024. Genome sequence-based identification of *Enterobacter* strains and description of *Enterobacter pasteurii* sp. nov. *Microbiology spectrum* 12 (1).
- 8) Kim, M., H. S Oh, S. C Park, et al. 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 64 (Pt_2): 346-351.
- 9) 日本臨床検査技師会. 2023. 「日臨技臨床検査精度管理調査報告書」. p. 14-17, 微生物検査サーベイ報告.
- 10) 松井理乃, 細田卓也, 和久田光毅, 他. 2021. VITEK MS による *Enterobacter cloacae* complex の識別能の検討. *日臨微誌* 31: 113-115.

Evaluation of *Enterobacter cloacae* complex identification performance by MALDI Biotyper and VITEK MS

Shoya Kato¹⁾, Mika Miura¹⁾, Miyu Sato¹⁾, Mizuki Nakaya¹⁾, Kanon Takeda¹⁾, Naoki Wada¹⁾, Shoji Yashita²⁾, Manabu Akiya³⁾, Mizuki Matsunaga³⁾, Maki Mochizuki⁴⁾, Masaaki Shinagawa⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Sapporo Tokushukai Hospital

²⁾Sapporo Higashi Tokushukai Hospital Laboratory Center

³⁾Clinical Laboratory, Department of Medical Technology, Mikasa Municipal General Hospital

⁴⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Sciences, Japan Healthcare University

Enterobacter cloacae complex includes *E. cloacae*, *E. hormaechei*, and *E. asburiae* as major species, which are genetically similar and difficult to classify by biochemical identification and MALDI-TOF MS. With the update of the MALDI Biotyper library (Ver. 12.0.0.0, MSP number 11897), the number of registered strains of *Enterobacter* spp. has increased significantly, but there are no reports on the validation of identification performance. In this study, we evaluated the identification performance of the two models by comparing the identification results by MALDI Biotyper and VITEK MS for 72 strains isolated as *E. cloacae* complex from clinical materials from September to November 2022, based on the identification results by ANI analysis. Identification at rank 1 by MALDI Biotyper was matched at the species level for 57 of 72 (79.2%) of the isolates when compared to identification by ANI analysis. On the other hand, 70 of the 72 isolates (97.2%) had a score value of 2.00 or higher and contained the same species as the ANI analysis within rank 10. No single strain was identified as a single species in VITEK MS, and 23 (31.9%) of the total 72 strains for which multiple species were identified contained species that matched the ANI analysis, a low concordance rate. MALDI Biotyper did not identify any other *Enterobacter* spp. in the top 10 for *E. hormaechei* and *E. bugandensis*, suggesting that species names can be reported. In VITEK MS, all *Enterobacter* spp should be reported as *E. cloacae* complex, even if identified.