

[原 著]

Candida 血症における *C. glabrata* と non- *C. glabrata* の血液培養ボトル発育特性の検討

手島裕治¹⁾・的野多加志²⁾・古野貴未¹⁾・古賀秀信³⁾・秋永理恵¹⁾

¹⁾ 飯塚病院中央検査部

²⁾ 飯塚病院感染症科

³⁾ 飯塚病院臨床研究支援室

(令和4年3月25日受付, 令和4年5月31日受理)

Candida 血症において *C. glabrata* は他の *Candida* 属より培養陽性時間が延長する傾向や、嫌気環境でも発育可能等の特徴がある。これらの特性より *C. glabrata* の推定が可能であるか否かを後方視的に評価した。

2014年1月から2018年10月までに BACTEC FX を使用して、血液材料から検出された *C. glabrata* 群 36 株、non-*C. glabrata* 群 40 株の計 76 株を対象とした。嫌気ボトルのみ陽性となるパターンは、*C. glabrata* 群が non-*C. glabrata* 群よりも有意に多く (41.7% vs. 0.0%) ($p < 0.001$)、*C. glabrata* 群で嫌気および好気ボトルが共に陽性となった 11 例のうち、81.8% は嫌気ボトルが先行して陽転していた。また、培養陽性時間は non-*C. glabrata* 群 (中央値 35.6 時間) と比較して *C. glabrata* 群 (中央値 47.0 時間) で有意に延長していたが ($p = 0.035$)、培養陽性時間を用いた *C. glabrata* の診断精度は AUC 0.64 (95% CI : 0.52-0.77) であった。

BACTEC FX を用いた血液培養検査において嫌気ボトルで陽転しやすい *C. glabrata* 群の発育特性は、*C. glabrata* の推測ならびに治療薬選択に貢献できうる情報であると示唆される。

Key words: *Candida glabrata*, *Candida* 血症, BACTEC FX

序 文

Candida 血症は入院後の血流感染症の 8~15% を占めており¹⁾、死亡率は 35%~60% と高い^{2)~4)}。*Candida* 血症の原因は *C. albicans* が最も多いが、近年 non-*albicans Candida* 属による感染症が増加している⁵⁾。*Candida* 属は菌種によって薬剤感受性結果に特徴があるため、菌種を同定することは適切な初期治療を行う上で重要である。特に、眼内炎を合併した *Candida* 血症例においては、ポリエン系やアゾール系など眼内移行性の良い抗真菌薬を選択する必要がある、原因菌がアゾール系抗真菌薬に耐性傾向である *C. glabrata* や *C. krusei* であるか否かを迅速に報告することは、治療選択や患者アウトカムに直結する可能性がある。

一方、*C. glabrata* による血流感染症は他の *Candida* 属と比較し、培養陽性時間 (Time to Positivity : TTP) が延長する傾向や¹⁾、嫌気環境下でも発育可能等の特徴がある⁶⁾。しかし、*C. glabrata* のこれらの特性について検討した報告は少ない。今回我々は、*Candida* 血症において、発育ボトルならびに TTP から *C. glabrata* を推定することが可能であるかを検討した。

材料と方法

対象菌株

本後ろ向きコホート研究は福岡県飯塚市の飯塚病院 (病床数 : 1,048 床、血液培養検査件数 : 9,392~17,444/年) で実施した。対象は 2014 年 1 月から 2018 年 10 月までに血液検体から検出された *Candida* 属とした。複数セットから *Candida* 属が検出された患者では初回陽性セットのみを対象とした。また、2 種類以上の菌が検出された検体は除外した。なお、本研究は飯塚病院倫理委員会の承認を得ている (承認番号 : 19007)。

血液培養システムおよび同定検査

血液培養検査は 23F 好気用レズンボトルおよび 21F 溶血タイプ嫌気用ボトル (いずれも日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 ; 日本 BD) を使用し、BACTEC FX (日本 BD) で最長 7 日間培養した。採取血液量はボトルあたり 8~10 ml を推奨しているが、実際の血液量の測定は行っていない。陽性ボトルのサブカルチャーにはヒツジ血液寒天培地 (日水製薬株式会社) およびクロモアガーカンジダ培地 (関東化学株式会社) を使用した。菌種同定には 2014 年 1 月から 2016 年 2 月まで VITEK2 YST 同定カード (バイオメリュー・ジャパン株式会社 ; バイオメリュー)、2016 年 3 月から 2018 年 10 月まではマイクロスキャン RYID パネル (ベックマン・コールター株式会社) または VITEK MS (バイオメリュー) を使用した。

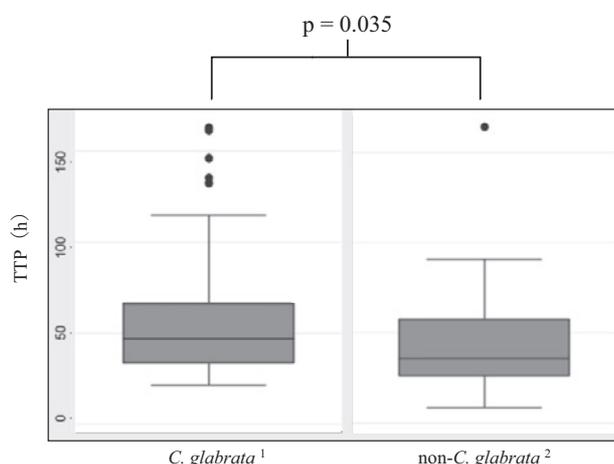
方法

C. glabrata 群と non-*C. glabrata* 群の発育特性 (好気ボトルのみ陽性/嫌気ボトルのみ陽性/両ボトル陽性) について比

著者連絡先 : (〒820-8505) 福岡県飯塚市芳雄町 3-83
飯塚病院中央検査部
手島裕治
TEL: 0948-22-3800(内線 2516)
FAX: 0948-29-8043
E-mail: yteshimah3@aih-net.com

Table 1. Comparison of growth characteristics between *C. glabrata* and non-*C. glabrata* in different blood culture bottles

Growth bottles	<i>C. glabrata</i> (n = 36)	Non- <i>C. glabrata</i> (n = 40)	p-value
Aerobic and anaerobic bottles, n (%)	11 (30.6)	2 (5.0)	0.005
Aerobic bottles only, n (%)	10 (27.7)	38 (95.0)	<0.001
Anaerobic bottles only, n (%)	15 (41.7)	0 (0)	<0.001

Figure 1. Box plot of time to positivity (TTP) for *Candida glabrata* and non-*C. glabrata*

Median TTP of *C. glabrata* is 47.0 hours (IQR: 33.6–61.1).

Median TTP of non-*C. glabrata* is 35.6 hours (IQR: 26.0–57.9).

較した。TTPは複数セット提出された症例では、最初に陽性となったボトルのTTPを対象とし、EPIセンターシステムを用いて算出した。

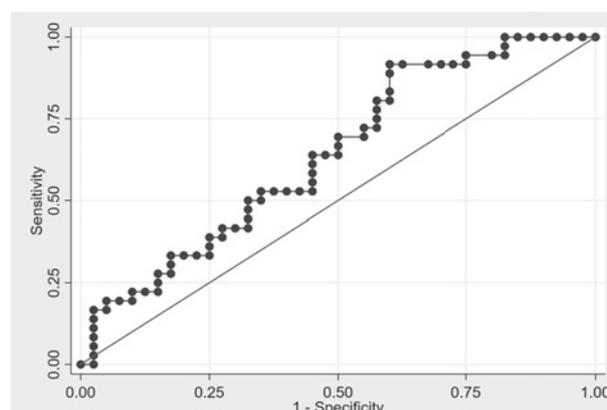
統計学的解析

TTPの診断精度に関してはReceiver operating characteristic (ROC) 曲線によるAUC値、感度、特異度、陽性/陰性的中率、陽性/陰性尤度比ならびにYouden indexを用いたカットオフ値を算出した。統計学的仮説検定はt検定、Wilcoxon順位和検定ならびにFisherの正確確率検定を用いた。診断精度についてはロジスティック回帰分析を用いた。有意水準は5%とし、 $p < 0.050$ の場合に統計学的有意差を認めるとした。統計ソフトはStata/SE(version15.0, StataCorp LLC, USA)を使用した。

結 果

発育特性の比較

期間中76株が対象となった。菌種内訳は*C. glabrata* 36株、non-*C. glabrata* 40株(*C. albicans* 18株、*C. parapsilosis* 12株、*C. tropicalis* 8株、*C. krusei* 1株、*C. lusitaniae* 1株)であった。76株中、好気ボトルのみ陽性が48株、嫌気ボトルのみ陽性が15株、両ボトル陽性が13株であった。好気ボトルのみ陽性となるパターンは*C. glabrata* 群(27.7%)よりもnon-*C. glabrata* 群(95.0%)が有意に多かった($p < 0.001$)。一方で、嫌気ボトルのみ陽性となるパターン($p < 0.001$)な

Figure 2. Receiver operating characteristic curve of time to positivity in differentiating between *C. glabrata* and non-*C. glabrata*

らびに両ボトル陽性となるパターン($p = 0.005$)は*C. glabrata* 群がnon-*C. glabrata* 群に比べて有意に多かった(Table 1)。

TTPの比較

TTPの中央値は*C. glabrata* 群で47.0時間(IQR: 33.6–61.1)、non-*C. glabrata* 群で35.6時間(IQR: 26.0–57.9)であり、*C. glabrata* 群で有意に延長していた($p = 0.035$) (Figure 1)。また、*C. glabrata* 群で両ボトル陽性であった11例のうち、9例(81.8%)は嫌気ボトルが好気ボトルより先行して陽性となっていた。さらに、TTPは、好気ボトルで中央値63.0時間、嫌気ボトルで中央値33.2時間であり、嫌気ボトルの方が、TTPが短かった($p = 0.041$)。一方で、non-*C. glabrata* 群で両ボトル陽性となった2株はいずれも好気ボトルが先行して陽性となっていた。ROC曲線を用いたTTPによる*C. glabrata* の診断能評価では、AUC 0.64 (95% CI: 0.52–0.77)であり、推定最適カットオフ値は30.6時間(感度91.7%、特異度40.0%、陽性的中率57.9%、陰性的中率84.2%、陽性尤度比1.53、陰性尤度比0.21)であった(Figure 2, Table 2)。

考 察

今回の検討により、*Candida* 血症において、BACTEC FXで嫌気ボトルのみでの検出、または嫌気ボトルで先行した検出は、*C. glabrata* を推測しうる情報であることが示唆された。

まず、本研究では、嫌気ボトルのみ陽性ならびに両ボトル陽性パターンが*C. glabrata* 群に有意に多いということが明らかになった。また、両ボトル陽性となった検体でも、*C. glabrata* 群では嫌気ボトルが先行、non-*C. glabrata* 群では好気性ボトルが先行して陽性となっているという特性もみ

Table 2. Sensitivity and specificity for the estimated optimal cut-off values of time to positivity in differentiating between *C. glabrata* and non-*C. glabrata*

Cut-off point	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Classified (%)	LR ⁺¹	LR ⁻²
≥24.5	94.4	25.0	57.9	1.26	0.22
≥27.6	91.7	25.0	56.6	1.22	0.33
≥28.7	91.7	27.5	57.9	1.26	0.30
≥29.2	91.7	30.0	59.2	1.31	0.28
≥29.7	91.7	32.5	60.5	1.36	0.26
≥29.9	91.7	37.5	63.2	1.47	0.22
≥30.6	91.7	40.0	64.5	1.53	0.21
≥31.3	88.9	40.0	63.2	1.48	0.28
≥32.4	83.3	40.0	60.5	1.39	0.42
≥32.7	80.6	40.0	59.2	1.34	0.49
≥33.2	80.6	42.5	60.5	1.40	0.46

¹ LR⁺ : Positive likelihood ratio

² LR⁻ : Negative likelihood ratio

えてきた。通常、*Candida* 属菌は嫌気環境下ではエルゴステロール合成ができず生育することができないが、*C. glabrata* は嫌気環境下で菌体外からステロールを取り込むことで細胞壁の合成ができる⁶⁾。この特性を活用し、*C. glabrata* は患者血液中のコレステロールを使用して細胞壁を合成し、嫌気ボトルでの発育を良好にしていることが推測される。一般的に *Candida* 属の菌種同定には数日を要するが、近年では、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) や全自動遺伝子検査システムにより、血液培養陽性液を使用して迅速な菌種同定が可能となりつつある。しかし、MALDI-TOF MS による血液培養陽性液の *Candida* 属の菌種同定率は 62.5% と低いことや⁷⁾、全自動遺伝子検査システムには保険診療上の問題点がある。一方で、本検討結果は、血液培養陽転時に取得することができる情報であり、施設規模によらず追加設備投資がいらぬ簡便さという点では注目に値すると思われる。

次に、血液培養ボトルの TTP は、*C. glabrata* 群と non-*C. glabrata* 群を識別できる可能性が示唆された。*C. glabrata* 群の TTP が non-*C. glabrata* 群と比較して延長傾向であることはこれまでに多数報告されており¹⁾⁸⁾⁹⁾、我々の検討結果も過去の報告と同様であった。ただし、TTP の菌種診断精度は AUC 0.64 であり、臨床的な意義は乏しいと考えられる。一方で、TTP カットオフ値 30.6 時間における陰性的中率 84.2%、陰性尤度比 0.21 であり、*C. glabrata* を除外する情報となりうることが判明した。本研究では好気性レズンボトル、嫌気性溶血ボトルと両ボトルで異なる添加剤を使用しているため、各ボトルの TTP に差を与える可能性も懸念されるが、好気と嫌気ともにレズンボトルを使用した過去の報告でも我々と同様な結果が得られている¹⁰⁾。また、その他、TTP に影響を与える要因である採取血液量や培養検体採取前の抗真菌薬使用の有無、中心静脈カテーテル使用等の評価を行っておらず、今後これらの要因を考慮した検討が必要であると思われる。

今回の我々の報告は単施設で実施した後ろ向きコホート研究であり、対象症例数も少なく、エビデンスレベルは高くは

ないと思われる。しかし、*Candida* 血症におけるグラム染色の菌形態に加え、陽転化したボトルの発育特性（嫌気ボトルの発育の有無やその時間）を検討することで、菌が推定できる可能性が示唆された点は臨床的にも重要な結果であると思われる。これらの菌株推定情報を医師に迅速にフィードバックすることで、治療薬選択ならびに患者予後改善に貢献できる可能性があると思われる。

利益相反：申請すべき利益相反はなし。本研究の一部は飯塚病院臨床研究助成金を使用して行った。

文 献

- 1) L., Huang, Zhang Y.Y., Sun L. Y.. 2013. Time to positivity of blood culture can predict different *Candida* species instead of pathogen concentration in candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 917-922.
- 2) Fortun, J, P Martin-Davila, et al. 2012. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *J Infect* 65: 64-70.
- 3) Horn, DL, D Neofytos, et al. 2009. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 48: 1695-1703.
- 4) Kim, SH, YK Yoon, et al. 2013. Risk factors for and clinical implications of mixed *Candida*/bacterial bloodstream infections. *Clin Microbiol Infect* 19: 62-68.
- 5) Ruan, SY, PR Hsueh. 2009. Invasive candidiasis: an overview from Taiwan. *J Formos Med Assoc* 108 (6): 443-451.
- 6) Nakayama, H, K Tanabe, et al. 2007. The *Candida glabrata* putative sterol transporter gene *CgAUS1* protects cells against azoles in the presence of serum. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60: 1264-1272.
- 7) Idelevich, EA, CM Grunewald, et al. 2014. Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF MS spectrometry and direct inoculation of VITEC 2. *PLoS One* 9: e114834.

- 8) Lai, CC, C-Y Wang, et al. 2012. Time to positivity of blood cultures of different *Candida* species causing fungaemia. J. Med. Microbiol. 61: 701-704.
- 9) Cobos-Trigueros, N, L Morata, et al. 2013. Usefulness of time-to-positivity in aerobic and anaerobic vials to predict the presence of *Candida glabrata* in patients with candidaemia. J Antimicrob Chemother 68: 2839-2841.
- 10) Horvath, LL., DR. Hospenthal, et al. 2003. Detection of Simulated Candidemia by the BACTEC 9240 System with Plus Aerobic/F and Anaerobic/F Blood Culture Bottles. J. Clin. Microbiol. 41 (10): 4714-4717.

Growth characteristics of *C. glabrata* and non-*C. glabrata* in blood culture bottles in patients with candidemia

Yuji Teshima¹⁾, Takashi Matono²⁾, Yoshimi Furuno¹⁾, Hidenobu Koga³⁾, Rie Akinaga¹⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Aso Iizuka Hospital

²⁾Department of Infection Diseases, Aso Iizuka Hospital

³⁾Department of Clinical Research Support Office, Aso Iizuka Hospital

In patients with candidemia, *Candida glabrata* takes longer than other *Candida* species to reach the positivity cut-off value in blood culture bottles; it can also grow in anaerobic bottles. We retrospectively assessed the growth characteristics of *Candida* species in blood culture bottles.

We analyzed 76 *Candida* strains (36 *C. glabrata* and 40 non-*C. glabrata*) in blood cultures using BACTEC FX from January 2014 to October 2018. Positivity was more frequently observed in anaerobic bottles with *C. glabrata* than in those with non-*C. glabrata* (41.7% vs.0.0%; $p < 0.001$). Furthermore, among the 11 cases of *C. glabrata* detected in anaerobic and aerobic bottles, 81.8% grew earlier in anaerobic bottles than in aerobic bottles. Time to positivity (TTP) was more prolonged in *C. glabrata* (median 47.0 hours) than those in non-*C. glabrata* (median 35.6 hours; $p = 0.035$). The area under the curve (AUC) of TTP for predicting *C. glabrata* was 0.64 (95% CI: 0.52-0.77).

These findings suggest that *C. glabrata* is easy to grow in anaerobic bottles using BACTEC FX. The growth characteristics of *Candida* species in blood culture bottles may be beneficial in the prediction of *C. glabrata*, aiding the clinical selection of appropriate antifungal agents.