

진균의 항진균제 내성기전

이 미 경

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in Pathogenic Fungi

Mi Kyung Lee

Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

서 론

비록 세균감염에 비하면 일반적으로 그 빈도가 낮지만 최근 진균감염의 빈도가 꾸준히 증가하고 있으며, 최소한 다음의 두 가지 측면에서 볼 때 진균감염의 증가를 의미있게 생각해 볼 수 있다. 첫째, 면역기능이 약화된 환자에서의 기회감염 진균증은 이들 환자에서 이환률 및 사망률 증가의 흔한 원인으로 대두되고 있다[1]. 이러한 기회감염증은 면역기능 저하를 동반하는 중증 환자의 증가, human immunodeficiency virus (HIV) 감염이나 암환자에서 화학요법의 장기간 사용으로 인한 호중구감소증 또는 장기이식 후의 면역억제 치료 등에 의한 후천성면역결핍증 환자의 증가, 침습적 의료기술의 증가, 그리고 스테로이드와 광범위 항생제 투여와 동시에 시행되고 있는 여러 가지 의료기구와 카테터의 사용 등으로 증가하고 있는 추세이다[2, 3]. 둘째, 현재 여러 가지 항진균제가 개발되어 있으나, 이러한 약제들은 흔히 그들의 독성과 부작용으로 인해 사용이 제한적이어서[4], 현재 사용 가능한 항진균제의 수는 비교적 적으며 화학적으로도 제한된 몇몇의 분류에만 속해있는 실정이다.

항진균제는 작용 부위에 따라 5군으로 나눌 수 있으며, 첫째, ergosterol의 합성을 억제하는 azoles, 둘째, 진균 세포막의 sterol에 결합하여 세포질 내 물질이 누출될 수 있는 구멍(pores)을 형성하는 polyenes, 셋째, ergosterol 생합성을 방해하여 세포에 유독한 squalene을 축적하게 하는 allylamines, 넷째, 세포벽의 중요 구조인 β 1,3-glucan의 합성을 억제하는 세포벽 억제제인 candins, 다섯째, 단백질

과 DNA 합성을 억제하는 flucytosine 등이 있다. 최근 항진균제의 사용이 증가하면서 1990년대 이전에는 매우 드물었던 항진균제에 대한 내성이 HIV 감염 환자와 같은 특정 질환군에서, 특히 구인두 칸디다증(oropharyngeal candidiasis)이 반복적으로 발생하는 경우 항진균제의 장기 투여로 인해 발생하게 되는 약제내성이 중요한 문제로 대두되고 있다[5]. 그러므로 이 분야에서의 연구는 내성에 관여하는 분자생물학적 기전의 증명, 효과적인 새로운 약제의 개발 및 내성 출현시 이를 검출할 수 있는 방법의 개선 등에 모아지고 있다. 비교적 근래에까지 진균이 중요한 병원체로 간주되지 않았기 때문에 항진균제 내성에 관한 연구는 항진균제 내성의 연구에 비해 뒤쳐져 왔고[6], 항진균제 내성의 분자생물학적 기초는 특히 최근 5-6년간의 연구에 의해 주로 설명되고 있다. 이에 항진균제의 작용과 내성 기전에 관한 최신 지견의 습득을 통하여 이 분야에서의 연구와 임상적 적용에 관한 이해에 도움이 되고자 한다.

항진균제의 작용과 내성 기전

1. Azoles계 항진균제

Imidazoles (ketoconazole, miconazole, clotrimazole)과 triazoles (fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, ravuconazole)을 포함하는 azole은 진균의 ergosterol 생합성 과정에서 cytochrome P450 의존 효소인 lanosterol 14- α -demethylase를 방해하여 ergosterol의 결핍과 sterol의 전구물질, 특히 14- α -methyl fecosterol과 14- α -methyl-ergosta-8,24(28)-dien-3 β ,6 α -diol의 축적을 야기시킨다(Fig. 1). Ergosterol은 진균 세포막의 유지에 중요한 필수 sterol으로 결핍 시 세포막의 구조와 기능에 변화를 초래하게 되며[7, 8], sterol 전구물질의 축적은 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Candida albicans*에서의 성장 정지와 관련이 있

접수번호: CM 6-2-14

교신저자: 이미경

(100-272)서울시 중구 필동 2가 82-1

중앙의대부속 필동병원 진단검사의학과

TEL : 02)2260-2262 FAX : 02)6263-6410

E-mail : cpworld@cau.ac.kr

다[9]. Azole 항진균제는 *Candida* 종, *Cryptococcus neoformans*와 이상성 진균에 효과가 있으며, *C. neoformans*를 제외한 대부분의 효모균에는 단지 정진균 작용을 한다.

Azole 항진균제에 대한 내성은 크게 표적 유전자의 변형과 약제 유출의 증가로 발생하는 것으로 알려져 있다.

1) 표적 유전자(ERG11)의 변형

과거 *ERG16*과 *CYP51A1*로 불리던, 14- α -demethylase를 엔코딩하는 유전자는 현재 모든 진균에서 *ERG11*으로 언급되고 있으며 *ERG11*의 돌연변이, 유전자변환(gene conversion) 및 과표현(overexpression)과 같은 유전적 변형이 항진균제 내성의 발생에 기여하는지를 확인하기 위한 연구들이 시행되어져 오고 있다. 이러한 연구들의 대부분은 구인두 칸디다증을 동반한 HIV 감염 환자로부터 분리된 점막의 *C. albicans* 균주를 대상으로 이루어졌다. 지금까지 임상에서 분리된 *C. albicans* 균주의 *ERG11* 유전자에서 아미노산의 치환을 일으킬 수 있는 과오돌연변이는 약 35 종류가 보고되어 있으며, 이중 20 종류의 과오돌연변이(F126L, G129A, Y132H, K143E, K143R, F145L, A149V, T229A, S279F, K287R, G307S, S405F, G448E, G448R, F449L, V452A, G464S, G465S, R467K, I471T)가 azole 내성과 관련이 있는 것으로 보고되어 있다[10-13]. *C. albicans*는 이배체(diploid) 생물로 각 유전자는 2개의 대립인자(allele)를 갖고 있으며, 임상 검체에서 분리되는 *C. albicans* 균주에서 2개의 대립인자가 각각 다른 nucleotide를 갖게 되는 차이(allelic difference)를 보이는 경우가 흔한 것으로 알려져 있다. 그러나 내성 균주에서는 감수성 균주에서 보이는 allelic difference가 없어서 2개의 대립인자가 모두 돌연변이를 일으킴을 보여주고 있어, 하나의 대립인자에 발생한 돌연변이는 그것이 우세해지기 전까지는 표현형의 변화로 나타나지 않을 것으로 생각되고 있다[14]. 또한 allelic difference의 소실은 *ERG11* 유전자 외에도 *ERG11* 유전자 바로 아래에 위치하는 homoserine kinase를 엔코딩하는 유전자(*THR1*)에서도 관찰된다[12]. 이러한 allelic difference의 소실은 유전자변환이나 유사분열시 재결합(mitotic recombination) 등으로 설명할 수는 있지만 아직까지 다른 가능성에 대한 연구가 충분히 이루어지지 않은 상태이며, *C. albicans*와 같은 이배체 세포에서는 중요한 기전이 될 수 있지만 *C. glabrata*와 같은 일배체 균주에서는 중요하지 않을 수도 있다[5].

*ERG11*의 과표현은 임상 검체에서 분리된 *C. albicans*와 *C. glabrata*에서 보고되었지만[15, 16], 대부분 다른 내성 기전인 표적 유전자의 과오돌연변이나 약제 유출에 관련된 유전자의 과표현 등과 동반되어 나타나고 있고, 최근 구인두 칸디다증을 동반한 HIV 감염 환자로부터 분리된 점막의 *C. albicans* 균주 중 35%에서만 *ERG11*의 과표현이 관찰됨이 보고되었다[10]. 따라서 *ERG11*의 과표현이 azole 내성에 관여하는지는 아직까지 명확하지 않으며, 오히려 관련되지 않을 가능성이 클 것으로 생각된다.

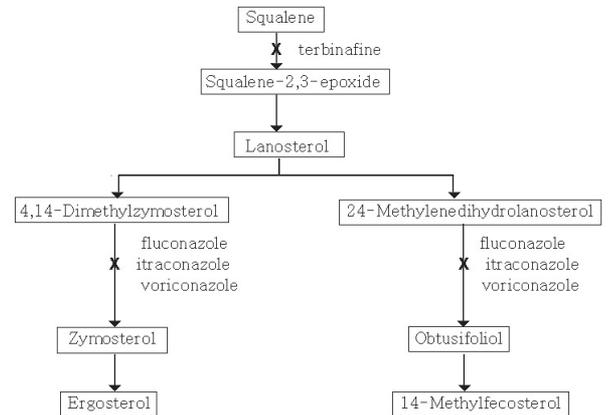


Fig. 1. Ergosterol biosynthetic pathway in fungi. Adapted from [38].

또한 azole 내성인 *C. albicans*와 *C. neoformans*의 임상 분리 균주에서 ergosterol 생합성 과정의 다른 유전자들, 즉 C-8 sterol isomerase와 C-5 sterol denaturase를 엔코딩하는 *ERG2*와 *ERG3*의 돌연변이가 보고되었고[17-19], 그밖에도 *C. neoformans*와 *Histoplasma capsulatum*에서 *ERG24*, *S. cerevisiae*에서 *ERG5* 등이 보고되어 있다[20, 21].

2) 약제 유출

Candida 종에서의 내성 기전으로서 약제 유출에 관련된 증거는 지속적으로 증가하고 있으며, 이 기전이 임상 균주에서 관찰되는 내성의 표현에 두드러진 역할을 할 것으로 생각되고 있다. Parkinson 등[22]은 *C. glabrata*에서 치료 전의 azole 감수성 균주와 치료 후의 azole 내성 균주를 비교하여 감수성 균주에 비해 치료 후의 균주에서 fluconazole의 축적이 적음을 보여주었으며, 내성 균주에서 fluconazole의 축적능이 감소된 것은 에너지 의존적인 약제 유출의 결과라고 보고하였다. 이어 Clark 등[23]은 형광염색 물질인 rhodamine 123 (Rh123)을 사용하여 *C. albicans*, *C. glabrata*와 *C. krusei*에서 azole에 대한 내성 기전을 연구하였는데, 이들은 *C. glabrata*에서는 Rh123과 fluconazole 두 약제의 축적이 경쟁적이므로 하나의 유출 펌프가 두 약제를 유출시킬 수 있으며, 반대로 *C. albicans*에서는 경쟁이 관찰되지 않아 각각의 약제에 대한 독립적인 펌프가 사용되어짐을 시사하였다. 그밖에도 azole과 polyenes에 내성인 *C. neoformans*와 itraconazole에 내성인 *Aspergillus fumigatus*에서의 약제 유출도 관찰되었다[24, 25].

진균에는 최소한 2종류의 유출 펌프가 있다고 보고되어 있으며, ATP-binding cassette (ABC) superfamily 단백질과 major facilitator superfamily (MFS) 단백질이 여기에 속한다. ABCs 단백질을 엔코딩하는 유전자는 30개가 있으며, MF 유출 펌프를 엔코딩하는 유전자는 28개가 있다[26]. ABCs 단백질을 엔코딩하는 30개의 유전자는 계통 발생학적 분류에 기초하여 6개의 subfamilies (PDR5,

ALDP, CFTR/MRP, MDR, YEF3, RLI)로 분류되어지며, 이중 PDR5, CFTR/MRP, MDR subfamilies만이 azole 내성에 관여하는 것으로 알려져 있다[5]. ABC superfamily에 속하는 유출 펌프는 *C. albicans*, *C. glabrata*와 *A. nidulans* 등에서 분류되었지만[27-29], *Candida* 종에서 가장 주목할만한 ABC 유출 펌프는 PDR5 superfamily로 이들 유전자는 *CDR* (*Candida drug resistance*)로 명명되어졌고 *C. albicans*의 게놈에는 최소 10개의 *CDR* 유전자가 존재함이 알려졌다[30]. 첫 번째 *CDR* 유전자(*CDR1*)는 HIV 감염 환자 5명에서 분리된 16균주의 *C. albicans*에 대한 분자생물학적 분석을 통하여 azole 내성과 관련 있음이 보고되었다[31]. 이들 균주들은 장기간의 fluconazole 치료 후 이 약제에 대한 내성이 증가하였으며, 이들 중 일부 내성 균주에서 *CDR1* 유전자의 mRNA 양이 10배까지 증가한 것과 관련하여 fluconazole 축적이 감소하였음을 보여주었다. 다른 연구에서도 *CDR1* 유전자의 표현이 azole 내성 균주에서 감수성 균주에 비하여 증가하였음이 보고되었다[15, 32]. *CDR2*의 과표현도 azole 내성과 관련이 있음이 언급되었으며[27], *CDR1*과 *CDR2*의 과표현이 동시에 나타나는 경우가 azole 내성 균주에서 보고되어 이들 두 유전자가 공통의 전사 조절기를 공유할 수 있음을 시사하였다[33].

MF superfamily에 속하는 유전자로는 *CaMDR1* (*BEN*)과 최근에 클로닝된 *FLU1*이 있다 [34, 35]. 여러 개의 독립된 연구 결과들은 일부 azole 내성 *C. albicans* 균주에서 *CaMDR1*이 현저하게 과표현됨을 보여주었다[31, 32]. 이들 내성 균주들에서 *CDR1*의 표현이 정상이라는 사실이 *CaMDR1*이 azole 내성과 연관됨을 시사한다. *CDR* 유전자들이 여러 가지 azole 약제들의 내성에 관련되는 반면, *CaMDR1*의 과표현은 azole계 약제에 대하여 선택적이어서 fluconazole에 대한 내성에는 관련되지만 ketoconazole이나 itraconazole에 대해서는 내성과 연관을 보이지 않는다[33]. 한편 *FLU1* 유전자는 임상 분리 *C. albicans* 균주에서의 fluconazole 내성 발생에는 필요하지 않을 것으로 보인다[35].

비록 분자유전학적 연구들에서는 실험실의 *C. albicans* 균주에서 각각의 내성 기전이 독립적으로 azole 내성에 영향을 주는 것처럼 보이지만, 고도 내성의 임상 분리 균주에서는 한 가지의 유전적 변화만으로는 내성을 유도할 수 없을 것으로 생각된다. 따라서 여러 가지의 유전적 사건들이 복합적으로 작용하여 내성이 일으키며, 또한 한 가지 azole에 장기간 노출시 다른 azoles에도 교차 내성을 일으킬 수 있을 것으로 추측된다.

*A. fumigatus*와 *A. nidulans*에서 itraconazole에 대한 내성이 보고되었는데, 이들 연구들은 최소한 3가지의 각기 다른 내성 기전이 관여함을 보여주었다[25, 36, 37]. 첫째, itraconazole 축적 감소[25], 둘째, ergosterol 양의 변화[25], 셋째, CYP-dependent C-14 lanosterol α -demethylase의 증폭 또는 과표현[36] 등이 포함된다.

2. Polyenes

1956년에 개발된 amphotericin B는 azole이 개발될 때까지 전신적 중증 진균 감염의 기본 치료제로 사용되어져 왔다[38]. Amphotericin B와 nystatin을 포함하는 다른 polyene 계열의 약제들은 결국 ergosterol에 결합함으로써 항진균 작용을 나타낸다. Amphotericin B의 경우 진균 세포막의 sterol에 작용하여 세포막의 투과성을 변화시킴으로써 세포질 내 물질, 특히 칼륨의 누출을 증가시켜 진균 작용을 나타내거나, 반응성 산소 radical을 생성하여 진균 세포에 손상을 주기도 한다[38].

30년 이상 임상적으로 사용되었음에도 불구하고 내성 빈도는 낮지만, 과거에 생각하던 것처럼 매우 드물지는 않은 것으로 보고되고 있으며, *Candida* 종에서는 주로 *C. lusitanae*, *C. glabrata* 및 *C. guilliermondii*같이 비교적 드문 균종에서 나타나고 있다. 내성은 진균 세포막의 ergosterol 성분에 양적 또는 질적인 변화가 생김으로 amphotericin B와의 결합력이 변하거나, 살균 작용을 나타내는 기전에 변화가 와서 나타나는 것으로 생각된다[39].

3. Allylamines

Terbinafine은 squalene epoxidase를 억제하여 ergosterol 생합성을 방해함으로써 세포내에 squalene이 축적되고 ergosterol이 감소하여 항진균 작용을 나타내게 된다[38]. 이때 ergosterol의 감소보다는 squalene의 축적이 진균세포 사멸의 주 원인으로 생각된다[40]. 현재까지는 감수성이던 진균에서 terbinafine과 naftifine의 임상적 사용과 연관된 내성은 발견되지 않았다. 그러나 최근 Bossche 등[16]은 fluconazole에 내성인 *C. glabrata*에서 terbinafine에 교차내성을 나타냄을 보고하였다. 또한 *CDR* 유전자의 산물(*Cdr1*과 *Cdr2*)이 terbinafine과 교차반응을 하는 것으로 알려졌다[41]. 그러므로 allylamines에 대한 내성을 발생시킬 수 있는 도구는 이미 일부 효모균에서 존재할 것으로 추측된다.

4. 진균 세포벽 합성의 억제제들

진균 세포벽은 세포벽 단백질, chitin, β 1,3-glucan, β 1,6-glucan 등으로 불리는 4종류의 거대분자균을 포함하고 있다. 이러한 성분들은 포유류의 세포에서는 발견되지 않기 때문에 오랫동안 약제 개발의 표적이 되어 왔다. 이중에서 glucan 합성 억제제들인 micafungin (FK-463)과 anidulafungin (LY-303366)이 임상시험 중이고, caspofungin은 치료가 되지 않는 침습적 aspergillosis의 치료제로 미국 FDA (Food and Drug Administration)에 의해 인정되었다. Nikkomycins과 같은 chitin 합성 억제제는 광범위하게 연구되었지만, 아직까지 상용화되지는 못하였다[38].

진균의 β 1,3-glucan synthetase를 방해하는 glucan 합성

억제제에는 aculeacins, echinocandins 및 papulacandins 등 3군의 합성물이 있으며, 이 중에서 echinocandins 유도제만이 진균 감염에 대한 그들의 안정성, 내성 및 효능에 관한 임상시험이 시행되고 있다[42]. 즉, 이들 약제가 β 1,3-glucan synthetase를 방해하면 진균 세포벽의 주 구조적 중합체인 β 1,3-glucan의 합성이 억제되고, 이는 세포를 삼투적으로 불안정하게 하여 결국 용해시킨다. Echinocandin 유사 성분들은 *C. albicans*, *A. fumigatus* 및 *Pneumocystis carinii*에 대해 항진균작용을 나타낸다.

Glucan 합성 억제제는 최근에 사용되기 시작하여 치료 후에 발생하는 내성 균주는 아직 보고가 없다. 그러므로 이들 약제의 내성 기전에 관한 정보는 실험실에서 echinocandin에 내성을 보이는 *S. cerevisiae* 돌연변이 균주의 분석에 기초하게 된다. *S. cerevisiae*는 약제의 주 표적 단백질을 엔코딩하는 *FKS1* 유전자의 돌연변이를 통해 내성을 얻게 된다[43]. 따라서 *C. albicans*도 유사한 분자유전학적 내성 기전을 가질 것으로 추측되고 있다.

5. 단백질과 DNA 합성을 억제하는 억제들

핵산을 억제하는 제제로는 5-flucytosine (5FC)이 사용되고 있으며, *Candida* 종과 *C. neoformans*를 포함하는 많은 효모균에 효과가 있다. 5FC는 cytosine permease에 의해 진균 세포내로 들어가 감수성인 진균 세포 내에서 5-fluorouracil (5FU)로 전환된 후 다시 5-fluorouridine triphosphate (FUTP)와 5-fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP)로 각각 변환되어, 단백질과 DNA의 합성을 억제함으로써 항진균 작용을 나타낸다[38, 44]. 5FC는 일차 내성이 흔하므로 단독으로는 거의 투여하지 않으며, 대개 amphotericin B나 fluconazole 같은 다른 항진균제와 병용하여 사용한다.

내성 기전에 관한 연구는 많이 시행되어 있으며, *C. albicans*에서는 내성 유전자(*FCY*)의 유전형에 따라 결정되는데, 즉 *FCY/FCY* 균주는 5FC에 감수성이고 *FCY/fcy* 균주는 부분 내성, *fcy/fcy* 균주는 고도의 내성을 나타낸다[38]. *C. albicans*와는 다르게 *C. neoformans*에서는 내성에 관련되는 두 유전자(*FCY1*과 *FCY2*)의 돌연변이가 결과로 내성이 발생한다[38]. 이러한 돌연변이가 균주에서의 내성은 5FC을 위에 언급한 유해한 중간산물로 전환시키지 못하여 약제가 항진균 작용을 나타내지 못하므로 내성을 일으키는 것으로 알려져 있다.

결 론

지난 10여 년간 항진균제 내성은 주로 구인두 칸디다증을 가진 HIV 감염 환자에서 triazole 항진균제와 관련하여 문제가 되어 왔지만, 최근 HAART (highly active antiretroviral therapy)의 도입으로 이들 환자에서 구인두 칸디다증과 azole 내성 균주의 감소를 가져왔다. 그러나 이러

한 감소 효과는 미국, 유럽 등의 선진국에 국한되어 있으며, 전 인구의 50% 이상이 HIV에 감염된 아프리카와 같은 후진국 또는 개발도상국에서는 칸디다증을 포함한 기회감염은 여전히 높은 빈도를 보이고 있다. 또한 이 기간 동안의 광범위한 fluconazole의 사용은 다른 azole에 교차 내성을 일으키거나 fluconazole에 일차 내성을 갖는 균주의 출현을 유도하기도 하였다[4]. 또한 이러한 점막의 칸디다증의 변화와는 무관하게 여전히 칸디다혈증의 주원 인균은 *C. albicans*로 보고되고 있다. 그러므로 앞으로도 계속 azole을 포함한 항진균제의 내성을 극복하기 위한 연구가 광범위하게 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이를 위해서는 첫째, 항진균제의 투여 기간, 투여량, 투여 일정 등이 내성 발생에 미치는 효과와 복합 요법에 관한 연구를 통해 적절한 항진균제의 투여 지침을 수립하여야 하며, 둘째, 내성 발생의 위험이 없으면서 이미 내성을 획득한 균주에 의한 감염도 효과적으로 치료할 수 있는 새로운 항진균제를 개발하고, 셋째, 항진균제 감수성 검사의 개선과 분자유전학적 검사법의 개발로 내성균 발생시 신속하고 정확하게 검출할 수 있어야 하며, 넷째, 대규모의 역학 조사를 통해 내성의 빈도와 새로운 내성 출현 등을 감시하여 항진균제 내성균을 효과적으로 관리하여야 하겠다.

참 고 문 헌

1. Fisher-Hoch SP and Hutwagner L. *Opportunistic candidiasis: an epidemic of the 1980s. Clin Infect Dis* 1995;21: 897-904.
2. Fox JL. Fungal infection rates are increasing. *ASM News* 1993;10:515-8.
3. De Backer MD, Magee PT, Pla J. *Recent developments in molecular genetics of Candida albicans. Annu Rev Microbiol* 2000;54:463-98.
4. Georgopapadakou NH and Walsh TJ. *Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. Science* 1994; 264:371-3.
5. White TC, Marr KA, Bowden RA. *Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. Clin Microbiol Rev* 1998;11:382-402.
6. Anaissie EJ and Bodey GP. *Nosocomial fungal infections: old problems and new challenges. Infect Dis Clin North Am* 1989;3:867-82.
7. Hitchcock CA, Dickinson K, Brown SB, Evans EG, Adams DJ. *Interaction of azole antifungal antibiotics with cytochrome P450-dependent 14 α -sterol demethylase purified from Candida albicans. J Biochem* 1990; 266:475-80.
8. Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. *A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosyn-*

- thesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2492-6.
9. Kelly SL, Lamb DC, Corran AJ, Baldwin BC, Kelly DE. Mode of action and resistance to azole antifungals associated with the formation of 14 alpha-methylergosta-8,24 (28)-dien-3 beta,6 alpha-diol. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;207:910-5.
 10. Perea SJL, Lopez-Ribot WR, Kirkpatrick RK, Mcatee RA, Santillan M, Martinez D, et al. Prevalence of molecular mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* strains displaying high-level fluconazole resistance isolated from human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001;45:2676-84.
 11. Sanglard D, Ischer F, Koymans L, Bille J. Amino acid substitutions in the cytochrome P-450 lanosterol 14 alpha-demethylase (CYP51A1) from azole-resistant *Candida albicans* clinical isolates contribute to resistance to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:241-53.
 12. White TC. The presence of an R467K amino acid substitution and loss of allelic variation correlate with an azole-resistant lanosterol 14alpha demethylase in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1488-94.
 13. White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 ;46:1704-13.
 14. Asai K, Tsuchimori N, Okonogi K, Perfect JR, Gotoh O, Yoshida Y. Formation of azole-resistant *Candida albicans* by mutation of sterol 14-demethylase P450. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1163-9.
 15. White TC. Increased mRNA levels of *ERG16*, *CDR*, and *MDR1* correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1482-7.
 16. Vanden Bossche H, Marichal HP, Odds FC, Jeune LL, Coene MC. Characterization of an azole-resistant *Candida glabrata* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2602-10.
 17. Kelly SL, Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Loeffler J, Hebart H, et al. Resistance to fluconazole and cross-resistance to amphotericin B in *Candida albicans* from AIDS patients caused by defective sterol delta5,6-desaturation. *FEBS Lett* 1997;400:80-2.
 18. Geber A, Hitchcock CA, Swartz JE, Pullen FS, Marsden KE, Kwon-Chung KJ, et al. Deletion of the *Candida glabrata* *ERG3* and *ERG11* genes: effect on cell viability, cell growth, sterol composition, and antifungal susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2708-17.
 19. Venkateswarlu K, Taylor M, Manning NJ, Rinaldi MG, Kelly SL. Fluconazole tolerance in clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:748-51.
 20. Vanden Bossche H, Warnock DW, Dupont B, Kerridge D, Sen Gupta S, Improvisi L, et al. Mechanisms and clinical impact of antifungal drug resistance. *J Med Vet Mycol* 1994;32:189-202.
 21. Kelly SL, Lamb DC, Baldwin BC, Corran AJ, Kelly DE. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. *J Biol Chem* 1997;272:9986-8.
 22. Parkinson T, Falconer DJ, Hitchcock CA. Fluconazole resistance due to energy-dependent drug efflux in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1696-9.
 23. Clark FS, Parkinson T, Hitchcock CA, Gow NA. Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species: possible role for drug efflux in drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:419-25.
 24. Joseph-Horne T, Hollomon D, Loeffler RS, Kelly SL. Cross-resistance to polyene and azole drugs in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1526-9.
 25. Denning DW, Venkateswarlu K, Oakley KL, Anderson MJ, Manning NJ, Stevens DA, et al. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1364-8.
 26. Taglicht D and Michaelis S. *Saccharomyces cerevisiae* ABC proteins and their relevance to human health and disease. *Methods Enzymol* 1998;292:130-62.
 27. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multi-drug ABC transporter gene. *Microbiology* 1997;143:405-16.
 28. Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2753-65.
 29. Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1174-83.

30. Niimi M and Cannon R. *Multidrug resistance genes in Candida albicans*. *Jpn J Med Mycol* 1997;143:405-16.
31. Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. *Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in Candida albicans isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters* *Antimicrob Agents Chemother* . 1995;39:2378-86.
32. Albertson GD, Niimi M, Cannon RD, Jenkinson HF. *Multiple efflux mechanisms are involved in Candida albicans fluconazole resistance*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2835-41.
33. Alarco AM, Balan I, Talibi D, Mainville N, Raymond M. *API-mediated multidrug resistance in Saccharomyces cerevisiae requires FLR1 encoding a transporter of the major facilitator superfamily*. *J Biol Chem* 1997;272:19304-13.
34. Walsh TJ, Kasai M, Francesconi A, Landsman D, Chanoock SJ. *New evidence that Candida albicans possesses additional ATP-binding cassette MDR-like genes: implications for antifungal azole resistance*. *J Med Vet Mycol* 1997;35:133-7.
35. Calabrese D, Bille J, Sanglard D. *A novel multidrug efflux transporter gene of the major facilitator superfamily from Candida albicans (FLU1) conferring resistance to fluconazole*. *Microbiology* 2000;146:2743-54.
36. Oshero N, Kontoyiannis DP, Romans A, May GS. *Resistance to itraconazole in Aspergillus nidulans and Aspergillus fumigatus is conferred by extra copies of the A. nidulans P-450 14alpha-demethylase gene, pdmA*. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:75-81.
37. Dannaoui E, Persat F, Borel E, Piens MA, Picot S. *Sterol composition of itraconazole-resistant and itraconazole-susceptible isolates of Aspergillus fumigatus*. *Can J Microbiol* 2001;47:706-10.
38. Ghannoum MA and Rice LB. *Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance*. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:501-17.
39. Hamilton-Miller JMT. *Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics*. *Bacteriol Rev* 1973;37:166-96.
40. Lanyi JK, Plachy WZ, Kates M. *Lipid interactions in membranes of extremely halophilic bacteria. II. Modification of the bilayer structure by squalene*. *Biochemistry* 1974;13:4914-20.
41. Sanglard D, Ischer F, Monod M, Bille J. *Susceptibilities of Candida albicans multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2300-5.
42. Walsh TJ, Lee JW, Kelly P, Bacher J, Lecciones J, Thomas V, et al. *Antifungal effects of the nonlinear pharmacokinetics of cilofungin, a 1,3-beta-glucan synthetase inhibitor, during continuous and intermittent intravenous infusions in treatment of experimental disseminated candidiasis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1321-8.
43. Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, Morin N, Nielsen JB, Dahl AM, et al. *The Saccharomyces cerevisiae FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:12907-11.
44. Diasio RB, Bennett JE, Myers CE. *Mode of action of 5-fluorocytosine*. *Biochem Pharmacol* 1978;27:703-7.