

칸디다종의 항진균제 감수성 검사에서 ATB FUNGUS 2의 유용성

배혜경¹, 손용학¹, 신종희², 김미나¹

울산의대 서울아산병원 진단검사의학과¹, 전남대학교 의과대학 진단검사의학교실²

The Evaluation of Clinical Utility of ATB FUNGUS 2 for Antifungal Susceptibility Testing in *Candida* Species

Hye Gyung Bae¹, Yong-Hak Sohn¹, Jong Hee Shin², Mi-Na Kim¹

Department of Laboratory Medicine¹, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea; Department of Laboratory Medicine², Chonnam National University Medical School, Gwanju, Korea

Background : Although the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) defined a standard reference broth microdilution method for testing the susceptibility of *Candida* species to antifungal drugs, many clinical laboratories require easier but reliable alternatives for routine antifungal susceptibility testing. We evaluated ATB FUNGUS 2 (bioMérieux, France.; ATB) compared to the method recommended by the NCCLS (NCCLS).

Methods : A total of 28 strains of *Candida* species consecutively isolated from blood and CSF cultures at Asan Medical Center from April to June 2004 were tested. In addition, 12 strains comprising *C. krusei* (3), *C. glabrata* (7) and *C. guilliermondii* (2) from the collection of Chonnam National University Hospital were included in the study. These strains were tested for minimum inhibitory concentrations (MICs) against flucytosine (FC), fluconazole (FZ), itraconazole (IZ) and amphotericin B (AB) by both of ATB and NCCLS. In NCCLS, MICs were read using a spectrophotometer after 24 and 48 hour-incubation.

Results : The concordance rates of MICs between ATB and NCCLS after 24 hour-incubation were 100%, 75%, 89% and 96% within two-fold dilution and 100%, 97%, 97%, 100% within four-fold dilution for FC, FZ, IZ and AB, respectively. For *C. krusei*, all three FC and FZ-resistant strains were either intermediate or SDD and one IZ-resistant strain was SDD in ATB, respectively. One *C. tropicalis* strain resulted in AB MICs of 0.5 µg/mL in NCCLS, but 2 µg/mL in ATB.

Conclusions : ATB showed good concordance rates with NCCLS after 24 hour-incubation. ATB appears to be a useful alternatives to NCCLS for routine antifungal susceptibility tests. However, ATB needs further evaluation with more clinical strains, especially those resistant to antifungal agents. (*Korean J Clin Microbiol* 2004;7(2):156-163)

Key words : Antifungal susceptibility test, *Candida* species, ATB FUNGUS 2, NCCLS broth microdilution method

서론

근래 항암 요법의 확대와 후천성 면역 결핍증 환자의 증가 등 면역이 저하된 환자에서 진균이 중요한 병원 감염원으로 등장하고 있다[1, 2]. 전신적 진균 감염의 치료에 오랫동안 amphotericin B와 flucytosine만이 사용되어

접 수 일: 04/8/11 게재승인일: 04/8/26

교신저자: 김미나

(138-040) 서울시 송파구 풍납동 388-1

서울아산병원 진단검사의학과

TEL : (02)3010-4511

E-mail : mnkim@www.amc.seoul.kr

져 왔으나 근래에는 ergosterol 생합성을 방해하는 fluconazole, itraconazole, ketoconazole 및 새로운 triazoles (voriconazole, ravuconazole, posaconazole)과 echinocandin 등 다양한 항진균제가 개발되어 항진균 효과는 높이고, 부작용은 줄일 수 있는 치료제로 선택할 수 있게 되었다[3, 4]. 또한 후천성 면역결핍증 환자의 재발성 구인두 칸디다증에 fluconazole을 장기 투여한 결과 fluconazole 내성 *Candida albicans*의 출현 보고 등[5, 6] 장기간 항진균제 치료나 예방요법을 받는 환자에서 항진균제 내성을 획득한 진균이나 내재적 내성을 가진 진균에 의한 감염이 증가하고 있어 항진균제 내성은 진균감염의 치료에 중요한 문제가 되고 있다[7]. 칸디다는 균종에 따라 항진균제 감수성을 예측할 수 있기 때문에 균종 동정이 더 중요하다는 주장도 있지만[3, 8], 항진균제 감수성 검사가 표준화되고[9, 10] 최근 연구에서 시험관내 감수성 검사가 임상적 치료효과를 예측하는데 유용하다는 보고가 나오면서 임상검사실에서 통상적인 검사로서 이용이 늘고 있다[11]. 특히 후천성 면역 결핍증 환자의 azole에 반응이 없는 재발성 구인두 칸디다증이나 non-albicans candida에 의한 침습성 감염에서 정확하고 재현성 있는 항진균제 감수성 검사의 필요성이 증가하고 있고 한 기관 내 진균의 내성발현을 감시하기 위해 주기적으로 항진균제 감수성 검사를 하도록 권장하고 있다[4, 12]. 1997년 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A에서는 항진균제 감수성 검사의 표준화된 방법으로 액체배지 희석법을 제안하고 항진균제 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)와 임상적 결과와의 관계를 분석하여 flucytosine, fluconazole 및 itraconazole에 대한 MIC breakpoint를 제시하였다[9, 10].

하지만, NCCLS 액체배지 희석법은 노력과 시간이 많이 들어서 임상미생물 검사실에서 일상적 검사로 시행하기엔 어려운 점이 많다. 이에 손쉽게 검사할 수 있는 다양한 방법들이 시도되고 있는데, 액체 배지법에 기초한 제품, E test, 디스크 확산법 및 유세포 분석기로 분석하는 등 많은 방법들이 소개되고 있다[13-15]. 액체 배지를 이용한 검사법이 NCCLS법에 유사하지만, 실제로 Candifast (International Microbio/Stago Group, Italy), Fungitest (Bio-Rad SDP, France) 등은 breakpoint에 해당하는 농도만 포함하여 M27-A와의 비교에 제한점이 많다. 이에 비해 ATB Fungus (bioMérieux, France), Mycostandard (Institut Pasteur, France), Mycototal (Behring Diagnostic, France) 등은 MIC를 관찰할 수 있는 제품으로 M27-A법과 유사하게 디자인된 제품이지만 아직까지 성능평가가 부족하다[11]. ATB FUNGUS 2 (bioMérieux; ATB)는 flucytosine, fluconazole, amphotericin B, itraconazole 등 4가지 항진균제가 2배 희석 농도로 들어있는 well로 구성되어 있고 24시간 배양 후 또는 성장대조 well 성장이 부족하면 48시간 후 육안으로 MIC를 판독하는 방법이다.

이에 저자들은 임상검체에서 분리된 칸디다종을 대상

으로 ATB법의 유용성을 평가하고자 하였다. ATB법으로 측정 한 MIC 및 감수성 판독결과를 NCCLS 미량액체배지 희석법(이하 NCCLS법)에서 24시간, 48시간 배양 후 측정 한 결과와 일치율을 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 대상

2004년 4월부터 6월까지 서울아산병원에 내원한 환자의 혈액과 뇌척수액에서 분리된 *C. parapsilosis* 9균주, *C. albicans* 7균주, *C. tropicalis* 6균주, *C. glabrata* 4균주, *C. lusitaniae* 1균주, *C. guilliermondii* 1균주 등 칸디다 28균주와 항진균제에 내성인 균주를 더 포함시키기 위해 전남 대로부터 *C. glabrata* 7균주, *C. krusei* 3균주, *C. guilliermondii* 2균주를 분양받아 총 40균주를 대상으로 하였다. 항진균제 감수성 검사의 정도관리를 위해 *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258과 표준균주 *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 90018 등을 정도관리 균주로 포함시켰다. 균주들은 Sabouraud dextrose agar (SDA)에 계대 배양시킨 후 발아판 시험, API 20 C (bioMérieux) 와 Rapid yeast ID system (Remel, USA) 검사 성적 및 cornmeal agar에서의 형태 관찰 등을 이용하여 동정하였다.

2. ATB FUNGUS 2를 이용한 MIC 검사

ATB FUNGUS 2의 제조사의 권장에 따라 검사하였다. 간단히 설명하면, SDA 평판배지에서 35℃ 24시간 배양한 균을 0.85% 식염수에 풀어 2.0 McFarland 탁도(McFarland standard kit)로 맞추고, 이 균액 20 µL를 ATB F2 Medium (yeast nitrogen base, glucose, asparagine, disodium phosphate, trisodium citrate, potassium nitrate)에 분주하여 잘 섞은 다음 16쌍의 well에 135 µL씩 분주하고 35℃에서 24시간동안 배양하였다. 각 well에는 flucytosine (0.5-64 µg/mL), fluconazole (0.25-128 µg/mL), amphotericin B (0.5-16 µg/mL), itraconazole (0.125-4 µg/mL) 등의 항진균제가 2배 희석배율로 들어가 있고, 접종량은 3×10^4 개/mL에 해당하며 성장대조 well이 잘 자라지 않은 경우에는 하루 더 배양하여 판독하였다. 24시간 배양 후 육안으로 균 성장 유무를 판독하여 균 성장이 억제되지 않으면 4, 조금 억제되면 3, 현저히 균의 성장이 억제되면 2, 미약한 균의 성장이 관찰되면 1, 균의 성장이 완전히 억제되면 0으로 점수를 두어 flucytosine, fluconazole, itraconazole은 2인 농도를 MIC로 판정하였고, amphotericin B는 0인 농도를 MIC로 판정하였다. 항진균제에 대한 감수성 기준은 회사에서 제공하는 지침서와 NCCLS에서 제시하고 있는 기준이 동일하였다.

3. NCCLS 미량액체배지희석법을 이용한 MIC 검사

배지는 RPMI 1640 (with glutamine, without bicarbonate, Sigma, USA)에 0.165M MOPS (3-N-morpholinopropanesulfonic acid) 완충액과 2% glucose를 첨가한 배지를 사용하였다[9, 10, 16, 17]. Fluconazole (한국화이자, Korea)과 flucytosine (Sigma, USA)은 증류수로 녹여 5,120 µg/mL 원액을 만들고, amphotericin B (Sigma, USA)와 itraconazole (Sigma, USA)은 DMSO (Dimethyl sulfoxide)로 녹여 1,600 µg/mL 원액을 만든 후 배지를 이용하여 2배수 희석하여 항진균제 농도가 fluconazole, flucytosine은 0.25-128 µg/mL, amphotericin B와 itraconazole은 0.06-32 µg/mL가 되도록 하여 MICROTTEST Tissue Culture plate (Becton Dickinson, USA)에 항진균제가 안 들어간 배지와 각 농도의 항진균제가 첨가된 배지를 각 well 당 100 µL씩 분주하였다. 균주는 SDA 평판배지에 35℃, 24시간 배양 후 0.85% 식염수에 균을 풀어 0.5 McFarland 탁도로 맞추고 이 균액을 RPMI 배지를 이용하여 1:1000으로 희석한 후 100 µL씩 분주함으로써, 최종 균농도를 $0.5-2.5 \times 10^3$ CFU/mL로 맞추고, 최종 항진균제 농도는 fluconazole, flucytosine은 0.125-64 µg/mL, amphotericin B와 itraconazole은 0.03-16 µg/mL로 맞추었다. 35℃에서 배양하여 24시간과 48시간에 피펫팅해서 잘 혼합한 후 분광광도계(Microplate leader model 550, Bio-Rad, USA)로 630nm에서[18, 19] 흡광도를 측정하였다. Flucytosine, fluconazole, itraconazole은 성장대조 well에 비해 흡광도가 50% 이상 억제된 지점을, amphotericin B는 균이 자라지 않은 지점을 MIC로 판

정하였고[9, 10], fluconazole, itraconazole, flucytosine에 대한 감수성 판정기준은 Table 1과 같다. Amphotericin B는 NCCLS 판정기준이 정해져 있지 않지만, 2 µg/mL 이상이면 내성일 가능성이 높다는 주석에 따라 2 µg/mL를 기준으로 하였다[10].

4. ATB법과 NCCLS법간의 MIC 및 감수성 결과 일치율

ATB법으로 판정한 MIC와 NCCLS법으로 24시간 배양 후 판정한 MIC와의 일치율을 ± 2 배와 ± 4 배 희석 농도 범위에서 구하였다. 감수성 여부 판정은 24시간 후 성장대조 well이 잘 자라지 않은 경우만 48시간 배양 후 감수성 결과를 이용하고, 그 외에는 24시간 배양 후 NCCLS법으로 판정한 감수성결과를 기준으로 NCCLS법에서 감수성인 균주가 ATB법에서 내성으로 바뀌면 major error, 내성인 균이 감수성으로 바뀌면 very major error, 중간내성 혹은 약용량 의존 감수성이 감수성이나 내성으로 바뀌면 minor error로 분류하였다.

결 과

1. 정도관리 및 표준균주의 MIC 결과

각각의 정도관리 범위가 알려진 정도관리 균주와 표준균주는 ATB법과 NCCLS법 결과 모두 허용범위에 속하

Table 1. The interpretive guidelines for in vitro susceptibility testing of *Candida* species recommended by NCCLS

Antifungal agents	Susceptible	Susceptible-dose dependent	Intermediate	Resistant
Fluconazole	≤ 8	16-32	-	≥ 64
Itraconazole	≤ 0.125	0.25-0.5	-	≥ 1
Flucytosine	≤ 4	-	8-16	≥ 32

Table 2. The distribution of MICs (µg/mL) of two quality control strains and two reference strains against four antifungal agents determined by the ATB FUNGUS 2 and NCCLS after 24 and 48 hour-incubation

Control strains	Incubation time (h)	Flucytosine			Fluconazole			Itraconazole			Amphotericin B		
		Q.C. range	NCCLS	ATB	Q.C. range	NCCLS	ATB	Q.C. range	NCCLS	ATB	Q.C. range	NCCLS	ATB
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 20019	24	0.06-0.25	0.125	<0.5	0.5-4	2	1	0.12-0.5	0.125	0.125	0.25-2	0.5	0.5
	48	0.12-0.5	0.25		1.0-4.0	2		0.12-0.5	0.125		0.5-4	0.5	
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	24	4.0-16	8	8	8-64	16	8	0.12-1	0.125	0.25	0.5-2	2	0.5
	48	8-32	16		16-128	32		0.25-1	0.25		1.0-4.0	2	
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	24		0.125	<0.5		0.5	0.5		NA	<0.125		0.5	0.5
	48	$\leq 0.12-0.25$	0.125		0.25-1	0.5		-	0.03		0.5-2	2	
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	24		0.5	1	0.25-1	0.25	0.5		0.03	<0.125	0.5-2	0.5	0.5
	48	0.5-2	1			0.5			0.03			2	

Abbreviations : Q.C., quality control; NCCLS, NCCLS microdilution method; ATB, ATB FUNGUS 2; NA, not available.

Table 3. The antifungal susceptibility profiles of 38 strains of *Candida* species determined by ATB FUNGUS 2 and NCCLS after 24 and 48 hour-incubation against four antifungal agents

Species	Strain No.	Flucytosine			Fluconazole			Itraconazole			Amphotericin B		
		24hr*	48hr†	ATB	24hr	48hr	ATB	24hr	48hr	ATB	24hr	48hr	ATB
<i>C. albicans</i>	AL1	0.125	0.125	<0.5	0.125	0.125	<0.25	0.03	0.03	<0.125	0.5	0.5	0.5
	AL2	0.125	0.25	<0.5	0.125	0.125	0.5	0.03	0.03	<0.125	0.5	0.5	0.5
	AL3	0.125	0.25	<0.5	0.125	0.125	<0.25	0.03	0.03	<0.125	0.5	0.5	0.5
	AL4	0.5	2	<0.5	0.25	0.25	0.5	0.03	0.03	<0.125	0.5	0.5	0.5
	AL5	0.125	0.125	<0.5	0.25	0.5	0.5	0.03	0.03	0.125	0.5	0.5	0.5
	AL6	0.125	0.125	<0.5	0.125	0.125	0.25	0.03	0.03	0.125	0.5	1	0.5
	AL7	0.125	0.125	<0.5	0.125	0.125	0.25	0.03	0.03	0.125	0.5	2	0.5
<i>C. glabrata</i>	GL1	0.125	0.125	<0.5	4	8	4	0.5	1	0.5	0.5	2	0.5
	GL2	0.125	0.125	<0.5	4	8	4	0.25	0.5	0.25	0.5	1	0.5
	GL3	0.125	0.125	<0.5	2	2	4	0.125	2	0.5	0.5	2	0.5
	GL4	NA	0.125	<0.5	A	1	2	NA	0.25	0.25	NA	1	0.5
	GL5	NA	0.125	<0.5	NA	1	1	NA	0.125	0.25	NA	1	0.5
	GL6	NA	0.125	<0.5	NA	4	4	NA	0.25	0.5	NA	1	0.5
	GL7	0.125	0.25	<0.5	0.25	2	2	0.06	0.06	0.5	1	1	0.5
	GL8	0.125	1	<0.5	0.25	2	0.5	0.06	1	0.125	1	1	0.5
<i>C. parapsilosis</i>	GL9	NA	0.125	<0.5	NA	2	4	NA	0.5	1	NA	1	0.5
	PA1	0.125	0.125	<0.5	0.25	0.25	1	0.03	0.03	<0.125	0.5	2	0.5
	PA2	NA	0.125	<0.5	NA	0.25	0.5	NA	0.03	<0.125	NA	2	0.5
	PA3	0.125	0.25	<0.5	0.25	0.25	0.5	0.03	0.03	<0.125	0.5	2	0.5
	PA4	0.125	0.125	<0.5	0.5	0.5	0.5	0.03	0.03	<0.125	0.5	2	0.5
	PA5	NA	0.125	<0.5	NA	2	0.5	NA	0.06	<0.125	NA	1	0.5
	PA6	0.125	0.25	<0.5	0.5	1	1	0.03	0.03	<0.125	1	2	0.5
	PA7	0.125	0.125	<0.5	0.5	0.5	0.5	0.03	0.03	<0.125	0.5	2	0.5
	PA8	0.125	0.125	<0.5	0.25	0.5	1	0.06	0.06	<0.125	0.25	0.25	0.5
<i>C. tropicalis</i>	PA9	0.125	0.125	<0.5	0.5	0.5	1	0.03	0.06	<0.125	0.25	1	0.5
	TR1	0.125	0.25	<0.5	0.125	0.125	<0.25	0.03	0.03	<0.125	0.5	0.5	0.5
	TR2	0.125	0.25	<0.5	0.25	0.5	1	0.03	0.5	<0.125	0.5	0.5	0.5
	TR3	0.125	0.125	<0.5	0.25	0.25	0.5	0.12	1	0.125	0.5	0.5	0.5
	TR4	0.125	0.125	<0.5	0.25	1	1	0.06	0.06	<0.125	1	2	0.5
	TR5	0.125	0.125	<0.5	2	2	1	0.03	0.06	<0.125	0.5	2	2
<i>C. krusei</i>	TR6	0.125	0.125	<0.5	0.5	16	1	0.03	0.03	<0.125	1	1	0.5
	KR1	NA	32	16	NA	64	16	NA	0.5	0.5	NA	1	0.5
	KR2	NA	32	16	NA	64	16	NA	1	0.5	NA	1	0.5
<i>C. guilliermondii</i>	KR3	NA	32	16	NA	64	16	NA	0.5	0.5	NA	1	0.5
	GU1	NA	2	0.5	NA	4	8	NA	0.5	0.5	NA	1	0.5
	GU2	0.125	0.25	<0.5	2	2	8	0.25	0.5	0.25	0.25	1	0.5
<i>C. lusitanae</i>	GU3	0.125	0.125	<0.5	4	8	4	0.5	0.5	<0.125	1	2	0.5
	LU1	0.125	0.125	<0.5	0.5	0.25	0.5	0.03	0.03	<0.125	0.25	0.5	0.5

*The MICs determined by NCCLS method after 24 hour incubation.

†The MICs determined by NCCLS method after 48 hour incubation.

Abbreviations : NA, not available.

였다. 정도관리균주의 MIC를 두 방법으로 측정한 결과는 2배 희석 범위 내에서 일치하였는데, *C. krusei* ATCC

6258의 amphotericin B MIC만 ATB법에서는 0.5 µg/mL인데 NCCLS법에서는 2 µg/mL로 4배 차이를 보였다.

Table 4. The concordance rates between MICs determined by the ATB FUNGUS 2 and NCCLS after 24 hour-incubation among 28 strains of *Candida* species

Antifungal agents	± 2 fold dilution	± 4 fold dilution
Flucytosine	100%	100%
Fluconazole	75%	97%
Itraconazole	89%	97%
Amphotericin B	96%	100%

NCCLS법에서 24시간과 48시간 배양 후 판독시 azole계 항진균제의 MIC는 4균주 모두에서 2배 희석 농도 범위 내에서 일치하였으나, amphotericin B MIC는 표준균주인 *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. albicans* ATCC 90028 두 균주들에서 24시간 때 0.5 µg/mL에서 48시간 후 2 µg/mL로 증가하였다. 이 두 균주는 24시간과 48시간 배양시 정도관리 범위가 따로 설정되어 있지 않으나, 정도관리 범위가 0.5-2 µg/mL로 24시간과 48시간 MIC 모두 허용범위 내였다(Table 2).

2. ATB법에 의한 MIC 및 감수성 결과

모든 균주에서 성장대조 well의 균성장이 충분하여 MIC를 판독할 수 있었고, 그 중 32균주(80%)에서는 24시간 후 판독이 가능하였다. Flucytosine에서는 MIC가 16 µg/mL로 중간내성인 *C. krusei* 3균주를 제외한 나머지 균주에서는 MIC가 0.5 µg/mL이하로 모두 감수성이었고, fluconazole에서도 MIC가 16 µg/mL로 약용량 의존 감수성인 *C. krusei* 3균주를 제외한 나머지 균주에서는 감수성을 나타냈다(Table 3). Itraconazole에서는 *C. glabrata* 7균주, *C. krusei* 3균주, *C. guilliermondii* 2균주는 약용량 의존 감수성이었고, *C. glabrata* 1균주는 MIC가 1 µg/mL로 내성이었다. Amphotericin B에서는 MIC가 2 µg/mL인 *C. tropicalis* 1균주를 제외하고는 모두 MIC가 0.5 µg/mL이었다(Table 3).

3. NCCLS법에 의한 MIC 및 감수성 결과

C. glabrata 2균주는 성장대조 well에서 균이 충분히 자라지 않아서 결과 분석에서 제외하였고, *C. glabrata* 4균주, *C. krusei* 3균주, *C. parapsilosis* 2균주, *C. guilliermondii* 1균주 등 10균주는 24시간 배양 시 균 성장이 부족하여 48시간 배양한 MIC 결과만을 얻을 수 있었다. 24시간과 48시간 배양 후 MIC를 모두 측정할 수 있었던 28균주를 대상으로 2배 희석 농도 범위에서 MIC 일치율은 flucytosine에서는 *C. albicans* 1균주, *C. glabrata* 1균주가 48시간 후 MIC가 4배 이상 증가하여 93% 일치하였고, fluconazole에서는 *C. tropicalis* 2균주, *C. glabrata* 2균주가 MIC가 4배 이상 증가하여 86%, itraconazole에서는 *C. tro-*

picalis 2균주, *C. glabrata* 2균주, *C. parapsilosis* 1균주가 MIC가 4배 이상 증가하여 82% 일치하였다. Amphotericin B에서는 *C. parapsilosis* 4균주, *C. glabrata* 2균주, *C. albicans* 1균주, *C. tropicalis* 1균주는 24시간 후 MIC가 0.5 µg/mL에서 48시간 후에는 2 µg/mL로 증가하였고, *C. parapsilosis* 1균주와 *C. guilliermondii* 1균주는 0.25 µg/mL에서 48시간 후 1 µg/mL로 증가하여 64%의 일치율을 보였다(Table 3). 감수성 결과 판정은 24시간 배양 후 MIC를 기준으로 하였고, 48시간 배양 후에야 MIC결과를 얻을 수 있었던 10균주에서는 48 시간 배양을 기준으로 하여 감수성 유무를 판정하였다. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*는 4가지 항진균제에 100% 감수성이었고, *C. glabrata*는 fluconazole에 모두 감수성이었지만 MIC범위가 0.25-4 µg/mL (MIC₉₀ 2 µg/mL)로 *C. albicans* (0.125-0.25 µg/mL, MIC₉₀ 0.25 µg/mL)보다는 높았으며, itraconazole에는 5균주가 약용량 의존 감수성이었다. *C. krusei*는 flucytosine, fluconazole에는 3균주 모두 내성이었고, itraconazole에는 1균주가 내성, 2균주는 약용량 의존 감수성이었고, *C. guilliermondii* 3균주는 모두 itraconazole에 약용량 의존 감수성이었다(Table 3).

4. ATB법과 NCCLS법 간의 결과 비교

ATB법으로 측정한 MIC와 NCCLS법으로 24시간 배양 후 측정한 MIC를 ±2배 희석 농도 범위 내에서 비교했을 때 flucytosine, fluconazole, itraconazole, amphotericin B에서 각각 100%, 75%, 89%, 96% 일치하였고, ±4배 희석 농도 범위 내에서는 각각 100%, 97%, 97%, 100% 일치하였다(Table 4). ATB법으로 판정한 감수성 결과와 NCCLS법으로 판정한 감수성결과를 비교하였을 때, flucytosine과 fluconazole에서는 *C. krusei* 3균주가 NCCLS법에서 내성인데 ATB법에서는 중간내성 또는 약용량 의존 감수성으로 바뀌는 minor error가 나타났고, itraconazole에서는 감수성인 *C. glabrata* 3균주가 ATB법에서는 약용량 의존 감수성으로, 약용량 의존 감수성인 1균주는 내성으로 판정되었고, *C. guilliermondii* 1균주는 약용량 의존 감수성에서 감수성으로, *C. krusei* 1균주는 내성에서 약용량 의존 감수성으로 바뀌는 minor error가 6예 있었다.

고 찰

NCCLS에서 제시하고 있는 항진균제 감수성 검사법은 RPMI 배지, 48시간 배양을 기본으로 한다. 하지만, 일부 칸디다 균주는 RPMI 배지에서 잘 자라지 않고, 성장 대조 well에 비해 균 성장이 현저히 감소된 지점을 MIC로 판정하게 되는 육안적 판정은 주관적 오류의 가능성이 있으며 azole계의 진균억제작용으로 시험관내 검사 약제의 농도가 계속 증가해도 균의 증식이 부분적으로 계속 관찰되는 끝림효과가 24시간 배양시보다 48시간 때 증가

하는 등[16, 20, 21], azole계 MIC판정에 있어 재현성이 부족하다[11]. 기존의 연구 결과 끌림효과는 균의 내성을 의미하는 것이 아니며 생체 내에서는 감수성임이 밝혀져 있다[22]. 이에 NCCLS 미량액체배지희석법의 변형으로 여러 가지 방법들이 소개되고 있는데, 분광광도계로 흡광도를 측정하여 대조well에 비해 성장이 50% 이상 억제된 지점을 MIC로 정하는 방법, 48시간 배양법 대신 24시간 배양 후 결과를 판독하는 법, RPMI 배지에 2% glucose를 첨가하는 법 등[10, 16, 17, 21]이 NCCLS M27-A2에 소개되고 있다. 본 연구에서는 RPMI 배지에 2% glucose를 첨가했는데도 *C. glabrata* 2균주가 잘 자라지 않아 MIC를 구할 수 없었으나, yeast nitrogen base를 이용하는 ATB에서는 잘 자랐으며 NCCLS에서는 10균주가 24시간 후 MIC를 판독할 수 없었던 데 비해 ATB에서는 80%에서 24시간 만에 판독이 가능하였던 것은 ATB법의 장점이었다. 또한, azole MIC 판정시 *C. tropicalis* 1균주의 fluconazole MIC가 24시간 배양 후 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 48시간 후 16 $\mu\text{g/mL}$ 으로 증가되었고, *C. tropicalis* 1균주와 *C. glabrata* 1균주의 itraconazole MIC는 24시간 후 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 에서 48시간 후 각각 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$ 로 증가하여 48시간 배양 후 끌림현상이 더 증가함을 보여 주었고, 이는 48시간 배양 후 판정하면 감수성 균주를 내성으로 판정할 수도 있다는 보고[17, 20, 23-27]와 일치하였다. 따라서 이 연구에서는 24시간 판정이 가능한 경우는 24시간 배양결과를 MIC로 판독하였다.

본 연구에서 24시간 배양 후 측정한 두 방법간의 MIC 일치율이 ± 2 배 희석 농도 범위 내에서는 flucytosine, fluconazole, itraconazole, amphotericin B에서 각각 100%, 75%, 89%, 96% 일치하였고, ± 4 배 희석 농도 범위 내에서는 100%, 97%, 97%, 100%로 매우 높았다. 이런 일치율은 Morera 등[28]이 임상검체에서 분리된 칸디다종과 *C. neoformans* 100 균주를 대상으로 ATB FUNGUS 2와 NCCLS법을 비교했을 때 MIC 일치율이 flucytosine, fluconazole, itraconazole, amphotericin B에서 ± 2 배 희석 농도 범위 내에서는 각각 84%, 70%, 73%, 100%, ± 4 배 희석 농도 범위 내에서는 100%, 97%, 98%, 100%의 높은 일치율을 보였다고 한 보고와 Durussel 등[29]이 칸디다 99 균주를 대상으로 한 연구에서 ± 2 배 희석 농도 범위 내에서는 93%, 77%, 78%, 99% 일치하였고, ± 4 배 희석 농도 범위 내에서는 100%, 93%, 89%, 100% 일치하였다고 보고한 것과 유사하다. 이들 연구나 본 연구 모두 flucytosine과 amphotericin B에서 fluconazole, itraconazole보다 ATB와 NCCLS법의 MIC 일치율이 더 높게 나오는데, 이는 fluconazole, itraconazole의 끌림 현상으로 인해 육안으로 균 성장 억제유무를 주관적으로 판독하는데 따라 일치율이 낮아졌을 것으로 사료된다.

NCCLS법에서 24시간 판독시와 48시간 판독시 2배 희석 농도 범위 내에서 flucytosine, fluconazole, itraconazole, amphotericin B는 93%, 86%, 82%, 64%의 일치율을 보였

다. azole계 항진균제의 MIC가 48시간 판정시 증가하는 것은 계속 문제가 되어 왔고 이는 끌림효과 때문으로 설명할 수 있을 것이다[16, 20, 21]. 하지만, amphotericin B MIC가 24시간이나 48시간 배양시 차이를 보이는 균이 많은 것은 이전 연구와 불일치하는 소견이다[30, 31]. Amphotericin B에 감수성인 *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. albicans* ATCC 90028 등 표준균주들 또한 24시간 배양시 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 였던 MIC가 48시간 배양 후 2 $\mu\text{g/mL}$ 가 되어 정도관리 허용범위 내라고 해도[9, 10] 48시간 결과를 기준으로 하면 내성이 되고, 48시간 배양 후 MIC가 2 $\mu\text{g/mL}$ 였던 12균주 중 amphotericin B 내성이 거의 보고된 적 없는 *C. parapsilosis*가[32] 6균주나 되는 점으로 볼 때 48시간 판독은 신뢰성이 떨어졌다. 또한, 48시간 MIC가 2 $\mu\text{g/mL}$ 인 균주들에 대해 NCCLS 미량액체배지희석법과 macrodilution법으로 재검하였는데 미량액체배지희석법에서는 여전히 이전 결과와 비슷하였으나, macrodilution법에서는 24시간과 48시간 결과가 희석범위 내에서 모두 일치하였고, *C. tropicalis* 1균주를 제외하고는 48시간 MIC가 모두 1 $\mu\text{g/mL}$ 이었기 때문에[결과는 제시하지 않음] 이 연구의 NCCLS 48시간 판독결과는 믿을 수 없다고 판단하여 일치를 판정에서 제외하였다. 이는 amphotericin B 감수성 검사시 사용하는 배지, 완충액, 배양시간 등에 따라 MIC 결과가 매우 다르고[9, 31, 33], 아직도 감수성 판독 기준을 설정하지 못할 정도로 내성균 검출이 어렵다는 점 등으로 보아 본 연구의 amphotericin B MIC 측정시 접종량, 배지조성 등 검사조건에 문제가 있었던 것으로 사료된다. 하지만, 감수성인 정도관리균주의 MIC허용범위조차도 상한값이 24시간 배양 시는 2 $\mu\text{g/mL}$, 48시간 배양 시 4 $\mu\text{g/mL}$ 로 되어 있는 점도 48시간 배양시 amphotericin B MIC가 높아지고 감수성균도 MIC가 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로 나올 수 있음을 알 수 있다. ATB 법은 amphotericin B 감수성 검사 결과가 NCCLS 24시간 판독결과와 높은 일치율을 보이고, 표준균주들의 MIC가 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 모두 정도관리 범위내에 들어가는 안정적인 결과를 보여 신뢰할만하다고 사료된다. 1균주의 *C. tropicalis*가 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 MIC를 보였는데 이 균주는 NCCLS법 24시간 배양시는 MIC가 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 였기 때문에 위 내성인 결과로 해석하였지만, *C. tropicalis*가 amphotericin B에 내성이 있을 수 있는 균종이고[32], NCCLS 미량액체배지희석법의 48시간 배양 MIC가 2 $\mu\text{g/mL}$ 였고, macrodilution법에서도 48시간 배양시 유일하게 MIC가 2 $\mu\text{g/mL}$ 였기 때문에[결과는 제시하지 않음] amphotericin B에 진정한 내성일 가능성을 배제할 수 없다.

NCCLS법에 의한 감수성 결과, flucytosine과 fluconazole에서는 *C. krusei* 3균주가 모두 내성이었고, itraconazole에서는 *C. glabrata* 4균주, *C. krusei* 2균주, *C. guilliermondii* 3균주는 약용량 의존 감수성, *C. krusei* 1균주는 내성으로 나타나 이들에 대한 항진균제 감수성 검사가 필요함을 알 수 있었고, NCCLS법으로 flucytosine, fluconazole

에 내성인 *C. krusei* 3균주 모두 ATB법에서는 모두 중간 내성 혹은 약용량 의존 감수성으로 판정되었고, itraconazole에 내성인 *C. krusei* 한 균주는 약용량 의존 감수성으로 판정되어, azole계에 내성이 있는 균주에서 minor error를 보이는 경우가 있었다.

결론적으로, 80%의 균주에서 ATB법으로 24시간 배양 후 MIC를 판정할 수 있었고, NCCLS법과도 높은 일치율을 보여 임상미생물검사실에서 항진균제 감수성 검사를 실시할 때 ATB FUNGUS 2를 사용할 수 있을 것으로 사료되며 향후 항진균제에 내성인 균주를 대상으로 더 평가할 필요가 있다고 생각된다.

요 약

배 경 : National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서는 칸디다종의 항진균제 감수성 검사의 표준화된 방법으로 액체배지희석법을 권장하고 있지만 임상검사실에서 통상적인 검사로 시행하려면 좀 더 쉽게 시행할 수 있으면서도 신뢰할 수 있는 방법이 필요하다. 이에 저자들은 ATB FUNGUS 2 (bioMerieux, France; ATB)를 이용하여 칸디다종에 대한 항진균제 감수성 검사를 실시하여 NCCLS 미량액체배지희석법(NCCLS법)과 비교 평가하였다.

방 법 : 2004년 4월부터 6월까지 서울아산병원에 내원한 환자의 혈액과 뇌척수액에서 분리된 칸디다 28균주와 전담대로부터 *Candida glabrata* 7균주, *C. krusei* 3균주, *C. guilliermondii* 2균주를 분양받아 총 40균주를 대상으로 하였다. Flucytosine (FC), fluconazole (FZ), itraconazole (IZ), amphotericin B (AB) 등의 4가지 항진균제에 대해 ATB법과 NCCLS법으로 감수성 검사를 하였고, NCCLS법은 24시간과 48시간 배양 후 분광광도계로 흡광도를 측정하여 MIC를 측정하였다.

결 과 : ATB법으로 측정한 MIC와 24시간 배양 후 NCCLS법으로 측정한 MIC와의 일치율이 FC, FZ, IZ, AB에서 ± 2 배 희석 농도 범위 내에서는 100%, 75%, 89%, 96%를 나타내었고, ± 4 배 희석 농도 범위 내에서는 100%, 97%, 97%, 100% 였다. 감수성 결과 FC, FZ에 모두 내성인 *C. krusei* 3균주가 ATB법에서는 중간내성이나 약용량 의존 감수성으로 판정되었고 IZ에 내성인 *C. krusei* 1균주는 약용량 의존 감수성으로 판정되었으며, amphotericin B MIC가 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 인 *C. tropicalis* 1균주는 ATB법에서는 2 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

결 론 : ATB법에서 24시간 배양 후 NCCLS법으로 판정한 MIC와 높은 일치율을 보여 임상검사실에서 항진균제 감수성 검사로 NCCLS법을 대체하여 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 하지만, 향후 더 많은 임상균주, 특히 항진균제에 내성인 균을 대상으로 평가할 필요가 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Anaissie E and Bodey GP. Nosocomial fungal infections. Old problems and new challenges. Infect Dis Clin North Am 1989;3:867-82.
2. Vartivarian SE, Anaissie EJ, Bodey GP. Emerging fungal pathogens in immunocompromised patients: classification, diagnosis, and management. Clin Infect Dis 1993; 17(S):S487-91.
3. Pfaller MA and Yu WL. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. Infect Dis Clin North Am 2001;15:1227-61.
4. 신종희. 항진균제 감수성 검사의 현재-검사법의 진전과 임상적 적용. 대한임상미생물학회지 2002;5:69-76.
5. Tortorano AM, Viviani MA, Barchiesi F, Arzeni D, Righi AL, Cogliati M, et al. Comparison of three methods for testing azole susceptibilities of *Candida albicans* strains isolated sequentially from oral cavities of AIDS patients. J Clin Microbiol 1998;36:1578-83.
6. Tapia C, Gonzalez P, Pereira A, Perez J, Noriega LM, Palavecino E. Antifungal susceptibility for *Candida albicans* isolated from AIDS patients with oropharyngeal and esophageal candidiasis: experience with E test. Rev Med Chil 2003;131:515-9.
7. Loeffler J and Stevens DA. Antifungal drug resistance. Clin Infect Dis 2003;36:S31-41.
8. Pfaller MA, Rex JH, Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing: technical advances and potential clinical applications. Clin Infect Dis 1997;24:776-84.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A. Villanova, Pa., NCCLS, 1997.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard M27-A2. Villanova, Pa., NCCLS, 2002.
11. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Antifungal susceptibility testing : Practical aspects and current challenges. Clin Microbiol Rev 2001;14:643-58.
12. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;48:153-60.
13. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. J Clin Microbiol 2002;40:918-21.

14. Chryssanthou E. Trends in antifungal susceptibility among Swedish *Candida* species bloodstream isolates from 1994 to 1998: comparison of the E-test and the Sensititre YeastOne Colorimetric Antifungal Panel with the NCCLS M27-A reference method. *J Clin Microbiol* 2001;39:4181-3.
15. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN, Doern GV, Brandt ME, et al. Trends in species distribution and susceptibility to fluconazole among blood stream isolates of *Candida* species in the United States. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;33:217-22.
16. 이지연, 신중희, 이경원, 용동은, 양성진, 서순팔 등. RPMI 배지 및 RPMI-2% Glucose 배지를 이용한 *Candida albicans*의 Fluconazole 감수성 검사. *대한진단검사의학회지* 2002;22:188-95.
17. Rodriguez-Tudela JL and Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:45-8.
18. Makimura K, Sudo T, Kudo M, Uchida K, Yamaguchi H. Development of reference procedures for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts with standardized endpoint determination. *Microbiol Immunol* 1998;42:55-9.
19. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Martinez-Suarez JV, Sanchez R. Comparison of spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1998-2003.
20. Revankar SG, Kirkpatrick WR, McAtee RK, Fothergill AW, Redding SW, Rinaldi MG, et al. Interpretation of trailing endpoints in antifungal susceptibility testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards method. *J Clin Microbiol* 1998;36:153-6.
21. 이지연, 신중희, 이경원, 용동은, 채명중, 서순팔 등. *Candida* 균종의 Fluconazole 감수성 검사를 위한 Spectrophotometric Broth Microdilution법의 평가. *대한진단검사의학회지* 2002;22:253-9.
22. Rex JH, Nelson PW, Paetznick VL, Lozano-Chiu M, Espinel-Ingroff A, Anaissie EJ. Optimizing the correlation between results of testing in vitro and therapeutic outcome in vivo for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:129-34.
23. Pfaller MA, Messer SA, Coffmann S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *J Clin Microbiol* 1995;33:1094-7.
24. Scheven M. Testing susceptibility of fungi to fluconazole. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:393-5.
25. Pfaller MA, Grant C, Morthland V, Rhine-Chalberg J. Comparative evaluation of alternative methods for broth dilution susceptibility testing of fluconazole against *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1994;32:506-9.
26. Pfaller MA, Dupont B, Kobayashi GS, Muller J, Rinaldi MG, Espinel-Ingroff A, et al. Standardized susceptibility testing of fluconazole: an international collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:1805-9.
27. Pfaller MA and Barry AL. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *J Clin Microbiol* 1994;32:1992-6.
28. Morera Y, Nougier L, Bossy G, Monnin V, Canard I, Zambardi G. et al. Comparison of the newly designed ATB FUNGUS 2 strip (bioMerieux) and NCCLS microdilution method for the in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts. *R union Interdisciplinaire de Chimiotherapie Anti-Infectieuse*, abstr, 46P, 2003.
29. Durussel C, Nougier L, Bossy G, Parreno D, Zambardi G, Bille J. Evaluation of the new ATB FUNGUS 2 system (bioMerieux) in comparison with reference methods (NCCLS M27-A2, EUCAST) for the in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts. *R union Interdisciplinaire de Chimiotherapie Anti-Infectieuse*, abstr, 46P, 2003.
30. Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Detection of resistance to amphotericin B in *Candida* isolates by using Iso-Sensitest broth. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2070-4.
31. Uzun O, Arikan S, Kocagoz S, Sancak B, Unal S. Susceptibility testing of voriconazole, fluconazole, itraconazole and amphotericin B against yeast isolates in a Turkish University Hospital and effect of time of reading. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;38:101-7.
32. Krcmery V. and Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect* 2002;50:243-60.
33. Lozano-Chiu M, Lancaster MV, Rex JH. Evaluation of a colorimetric method for detecting amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;31:417-24.