

RPMI 배지 및 RPMI-2% Glucose 배지를 이용한 *Candida albicans*의 Fluconazole 감수성 검사

이지연 · 신종희 · 이경원* · 용동은* · 양성진 · 서순팔 · 양동욱

전남대학교 의과대학 임상병리학교실, 연세대학교 의과대학 임상병리학교실*

Evaluation of a Spectrophotometric Broth Microdilution Method for Determining Fluconazole Susceptibility of *Candida albicans*: Influence of RPMI and RPMI-2% Glucose on the Selection of Endpoint Criteria

Ji Yon Yi, M.D., Jong Hee Shin, M.D., Kyungwon Lee, M.D.,* Dongeun Yong, M.D.,* Sung Jin Yang, M.D.,
Soon Pal Suh, M.D., and Dong Wook Ryang, M.D.

Department of Clinical Pathology, Chonnam National University Medical School, Gwangju;
Department of Clinical Pathology,* Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Minimum inhibitory concentration (MIC) endpoint determination is the major variation source for the fluconazole susceptibility test, especially for *Candida albicans*. In this study, we evaluated spectrophotometric broth microdilution methods using RPMI 1640 and RPMI supplemented with 18 g of glucose per liter (RPMI-2% glucose) for determining fluconazole susceptibility of *C. albicans*.

Methods : A total of 129 clinical isolates of *C. albicans* were tested by the broth microdilution method using RPMI and RPMI-2% glucose. The MIC endpoint was calculated objectively with the spectrophotometer set at 405 nm. These results were compared to those by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) macrodilution method and the agar dilution method.

Results : The mean absorbances in the drug-free wells in RPMI and RPMI-2% glucose were 0.208 ± 0.014 and 0.316 ± 0.061 , respectively, at 24 h and 0.339 ± 0.094 and 0.530 ± 0.104 , respectively, at 48 h ($P < 0.01$). The agreement of the microdilution method with the RPMI within two doubling dilutions of the macrodilution reference were 91.5% (118/129) at 24 h and 76.7% (99/129) at 48 h. The percentage of agreement in the microdilution method with the RPMI-2% glucose were significantly higher: 100% (129/129) at 24 h and 99.2% (128/129) at 48 h ($P < 0.01$). In addition, the MIC endpoints were easier to detect in RPMI-2% glucose, because of the greater difference in absorbance in between grown wells and fluconazole-inhibited wells ($P < 0.01$).

Conclusions : The spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose may have an excellent agreement with the NCCLS broth microdilution method and may provide more easily determined MIC endpoints for fluconazole susceptibility testing for *C. albicans*. (*Korean J Lab Med* 2002; 22: 188-95)

Key words : Spectrophotometric broth microdilution method, Fluconazole, *Candida albicans*, RPMI-2% glucose

접 수 : 2002년 3월 18일

접수번호 : KJCP1574

수정본접수 : 2002년 5월 14일

교신저자 : 신종희

우 501-757 광주광역시 동구 학1동 8

전남대학교병원 임상병리과

전화 : 062-220-5342, Fax : 062-224-2518

E-mail : shinjh@chonnam.ac.kr

서론

최근 칸디다 감염의 치료 및 예방에 fluconazole이 자주 사용됨

에 따라 *Candida albicans*에 대한 fluconazole의 감수성 검사는 더욱 중요하게 되었다[1, 2]. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서는 항진균제 감수성 검사의 표준화된 방법으로 NCCLS broth microdilution (M27-T)법을 발표하였고, 이어 이를 보완한 M27-P법을 제안하였다. Broth microdilution법은 M27-P에 포함되어 있는데, NCCLS broth microdilution법과 높은 일치율을 보이며 사용이 매우 간편하다[3, 4]. 그러나 NCCLS broth microdilution법에 의한 감수성 검사는 *C. albicans*에 대한 fluconazole 검사를 시행하는데 있어 다음 몇 가지 문제점들이 지적되고 있다[1, 5-7]. 첫째, fluconazole의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, 이하 MIC)는 NCCLS microdilution법의 경우 48시간 배양 후 성장대조 well에 비해 균 성장이 현저히 감소된 지점(score 2 이하)으로 판정되고 있는데[4], 이러한 육안 판정은 주관적인 오류의 가능성이 있다. 둘째, fluconazole 감수성 검사에서 시험관내 검사 약제의 농도가 계속 증가해도 균의 증식이 부분적으로 계속 관찰되는 trailing 효과가 자주 있을 수 있다[1, 5]. Trailing 효과는 때로 내성으로 잘못 판정되어 문제가 될 수 있는데[5, 8], 이는 균의 내성을 의미하는 것이 아니며 동물실험에서도 감수성이므로 다른 검사법을 통해 감수성을 확인해야 한다[1, 5, 8-10]. 셋째, 일부 *C. albicans* 균주는 RPMI 배지에서 잘 자라지 않을 수 있다[5, 8, 9].

이러한 NCCLS법의 문제점을 해결하기 위해 최근 분광광도계를 이용하여 객관적으로 MIC를 판정하고 자동화하려는 시도가 이루어지고 있으며[6, 7, 11-14], 또한 집중하는 균의 농도를 증가시키거나, RPMI 배지에 glucose를 첨가하는 등의 NCCLS법을 변형시킨 방법들이 소개되고 있다[11, 12, 15-17]. 저자들은 임상 검체에서 분리된 *C. albicans* 균주를 대상으로 RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 broth microdilution법을 약간 변형시켜 fluconazole 감수성 검사를 실시하고, 이를 통상적인 RPMI 1640 배지를 이용한 NCCLS broth microdilution법 및 다른 검사법과 비교 평가하여 보았다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

전남대학교병원 및 연세대학교 세브란스병원에 내원한 환자의 임상 검체에서 분리된 129주(전남대 72주, 연세대 57주)의 *C. albicans*를 대상으로 하였다. 각 검사의 정도관리를 위해 *C. parapsilosis* ATCC 22019와 *C. krusei* ATCC 6258 이외에 2주의 *C. albicans* ATCC 표준균주, 즉 *C. albicans* ATCC 90028 (fluconazole 감수성) 및 *C. albicans* ATCC 64550 (fluconazole 내성)을 이용하였다. 균주들은 혈액한천배지나 Sabouraud dextrose agar (SDA)에 계대배양시킨 후 발아관 시험, API 20C

(bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)와 ATB 32C system (bioMérieux) 검사 성적 및 cornmeal agar와 CHROMagar Candida (BBL, cockeysville, Maryland, USA)에서의 형태관찰 등을 이용하여 동정하였다. 분리된 *C. albicans*는 skim milk에 넣어 -70°C에 보관하였다.

2. NCCLS broth microdilution법 및 broth microdilution법

NCCLS 방법대로 RPMI 배지를 이용하여 시행하였다[3, 4]. RPMI 1640 배지의 제조는 L-glutamine이 들어 있는 RPMI 1640 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) 분말 10.4 g을 MOPS (3-N-morpholinopropanesulfonic acid) 34.53 g이 들어 있는 완충액 900 mL에 녹인 다음, 10 M NaOH로 pH를 7.0으로 맞추어 RPMI 1640 배지를 만들었다. 이때 RPMI 배지내 glucose는 2 g/900 mL 농도로 포함되었고, 배지는 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

Fluconazole (Diflucan, Pfizer New York, NY, USA)은 2,000 µg/mL로 만든 원액에서 RPMI 배지를 이용하여 각각 64-0.125 µg/mL가 되도록 배수희석하여 10개의 농도로 만들었다. 배수희석한 fluconazole 용액을 96 microwell plate (Nunc, Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)에 1번에서 10번 well까지 각 well당 100 µL씩 분주하였다. 균주는 SDA에 35°C, 24시간 배양 후, 0.85% 식염수에 균을 풀어 잘 섞은 후 0.5 McFarland 탁도(spectrophotometer, 530 nm)로 맞추어 균 농도가 약 $1-5 \times 10^6$ CFU/mL가 되도록 하였다. 이 균액을 다시 RPMI 배지를 이용하여 1:1,000으로 희석하였고, 1번에서 10번 well까지 각각 100 µL (최종 균농도, $0.5-2.5 \times 10^3$ CFU/mL)씩을 분주하였다. 11번 well은 성장대조 well로서 균액 100 µL와 fluconazole이 들어 있지 않은 RPMI 배지 100 µL를, 12번 well은 배지의 대조 well로서 RPMI 배지 200 µL만을 분주하였다. 균 접종이 끝난 microplate는 35°C에서 24시간 및 48시간 동안 배양하였다.

결과 판정은 broth microdilution법의 경우 24시간 및 48시간 배양 후 microplate를 꺼내어 shaker에서 5분 동안 잘 혼합한 후, 분광광도계(VERSAmbax Tunable Microplate Reader)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Broth microdilution법의 MIC 판정은 성장대조 well에 비해 흡광도가 80% 이상 억제된 최소항진균농도를 기준으로 판정하였다[4, 18]. Broth microdilution법의 MIC 판정은 48시간 배양 후 성장대조시험을 1:5로 희석하여 1번부터 10번 시험관까지 비교하며 80% 억제된 희석배수까지로 판정하였다. 이때 검사자에 의한 오차를 방지하기 위하여 두 사람의 관찰자가 맹검으로 판정하였다[1].

3. RPMI-2% glucose를 이용한 broth microdilution법

NCCLS법을 변형하여 RPMI 배지 대신 RPMI-2% glucose

를 이용하였고, 최종 균농도를 $0.5-2.5 \times 10^4$ CFU/mL로 하여 시행하였다. RPMI-2% glucose 배지는 RPMI 배지를 필터(0.22 μm -pore-size)로 여과한 다음, 멸균된 180 g/L 농도의 glucose 용액 100 mL를 첨가하여 제조하였다. 이때 glucose의 최종 농도는 20 g/L, MOPS의 최종 농도는 0.165 M/L였으며, 배지는 사용 전까지 4°C에 보관하였다. Fluconazole은 RPMI-2% glucose를 이용하여 각각 64-0.125 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 배수희석하여 각 well당 100 μL 씩 분주하였다. 균액은 0.85% 식염수로 0.5 McFarland 탁도로 맞추고, 이를 다시 RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 1:100으로 희석한 뒤 각각 100 μL (최종 균농도, $0.5-2.5 \times 10^4$ CFU/mL)씩을 분주하였다[6, 7, 14, 17]. 11번 well은 균액 100 μL 와 fluconazole이 들어 있지 않은 RPMI-2% glucose 배지 100 μL 를, 12번 well은 RPMI-2% glucose 200 μL 만을 분주하였다. 균 접종이 끝난 microplate는 35°C에서 24시간 및 48시간 배양 후 shaker에서 5분 동안 잘 혼합한 후, 분광광도계로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 MIC 판정은 성장대조 well에 비해 흡광도가 50% 이상 억제된 well로 판정하였다[6, 11, 17, 19, 20].

4. 한천희석선별법

한천희석선별법은 16, 8 및 0 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 fluconazole이 첨가된 CHROMagar Candida 배지를 이용하였다[3, 8, 10, 16]. 각 균주는 한천배지에 1 mL (5×10^5 CFU/mL)씩 접종하여 35°C에서 48시간 배양 후 각각 증식 억제 유무를 관찰하였다. 판정은 0, 8 및 16 $\mu\text{g/mL}$ 의 한천배지에 모두 자란 경우는 MIC 16 $\mu\text{g/mL}$ 이상으로, 0 및 8 $\mu\text{g/mL}$ 에서만 자란 경우는 MIC 16 $\mu\text{g/mL}$ 로, 그리고 fluconazole이 첨가되어 있지 않은 배지에서만 자란 경우는 MIC 8 $\mu\text{g/mL}$ 미만으로 하였다. 이때 검사자에 의한 오차를 방지하기 위하여 두 사람의 관찰자가 맹검으로 판정하였다.

5. 통계처리

각 군간의 통계적 유의성은 Student t test 및 χ^2 test를 이용하여 검정하였고, $P < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. 표준균주에 대한 fluconazole MIC 결과

RPMI 배지를 이용하여 실시한 broth microdilution법에서 *C. parapsilosis* ATCC 22019와 *C. krusei* ATCC 6258의 fluconazole MIC는 모두 정도관리 범위에 속하였으며, fluconazole 감수성 균주인 *C. albicans* ATCC 90028 및 내성 균주인 *C. albi-*

cans ATCC 64550을 대상으로 fluconazole MIC를 측정한 결과는 Table 1과 같다. *C. albicans* ATCC 90028의 경우 RPMI 배지 및 RPMI-2% glucose 배지를 이용한 microdilution법의 MIC 성적은 macrodilution법 및 한천희석법의 결과에 합당하였고, 정도관리 허용범위에도 속하였다. Fluconazole 내성 균주인 *C. albicans* ATCC 64550의 경우 현재 정도관리용 허용범위는 알려진 바 없으나, 본 실험에서 네 방법 모두에서 16-32 $\mu\text{g/mL}$ 사이의 유사한 결과를 보였다.

2. RPMI와 RPMI-2% glucose 배지의 성장대조 well의 흡광도 비교

임상 검체에서 분리된 *C. albicans* 129주를 RPMI 및 RPMI-2% glucose 배지를 이용한 broth microdilution법으로 각각 검사하여 24시간 및 48시간 배양 후 약제가 들어있지 않은 성장대조 well에서 평균 흡광도를 비교해 보았다. 각 성장대조 well에서의 흡광도 값은 분광광도계로 흡광도를 측정한 후 12번 well (배지 대조 well)의 흡광도를 뺀 후의 성적으로 하였다. RPMI 및 RPMI-2% glucose 배지에서의 성장 대조 well에서의 평균 흡광도는 24시간 배양 후 각각 0.208 ± 0.014 및 0.316 ± 0.061 이었고, 48시간 배양 후 각각 0.339 ± 0.094 및 0.530 ± 0.104 로서, 24시간과 48시간 모두에서 RPMI-2% glucose 배지를 사용하였을 때 더 많은 균 성장을 보였다($P < 0.01$) (Table 2).

3. Broth macrodilution법 및 한천희석법과의 비교

Microdilution법과 NCCLS macrodilution법간의 2배 희석배수

Table 1. Fluconazole MICs for *C. albicans* control strains

ATCC strain	Incubation time	Fluconazole MICs ($\mu\text{g/mL}$)				Agar screen
		Q.C. range	Macrodilution	Microdilution* RPMI	RPMI-G [†]	
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	24 h			0.5	0.5	<8.0
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	48 h	0.25-1.0	0.5	0.5	0.5	<8.0
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	24 h			16	32	>16
<i>C. albicans</i> ATCC 64550	48 h	NA	32	32	32	>16

*spectrophotometric reading; [†]microdilution method with RPMI-2% glucose; NA, not available.

Table 2. Comparison of the absorbance of fluconazole-free wells with RPMI and RPMI-2% glucose (N=129)

Incubation time	Absorbance value (Mean \pm SD) of fluconazole-free wells in:	
	RPMI	RPMI-2% glucose
24 h	0.208 ± 0.014	$0.316 \pm 0.061^*$
48 h	0.339 ± 0.094	$0.530 \pm 0.104^*$

* $P < 0.01$.

Table 3. Distribution of the difference in the MICs determined by the NCCLS macrodilution reference method and the microdilution method with RPMI and RPMI-2% glucose and EA percentage

Medium	Incubation time (h)	No. of isolates with MICs* different from macrodilution method MICs by number of log dilutions							EA ¹ (%)
		>-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	
RPMI	24	9	5	16	65	28	4	2	91.5
	48	29	6	21	58	12	2	1	76.7
RPMI-2% glucose	24	0	4	13	83	23	6	0	100.0
	48	1	5	8	76	27	12	0	99.2

*Spectrophotometric reading; ¹EA of MIC results of the two methods is defined as exact agreement or agreement within 2 two fold dilutions.

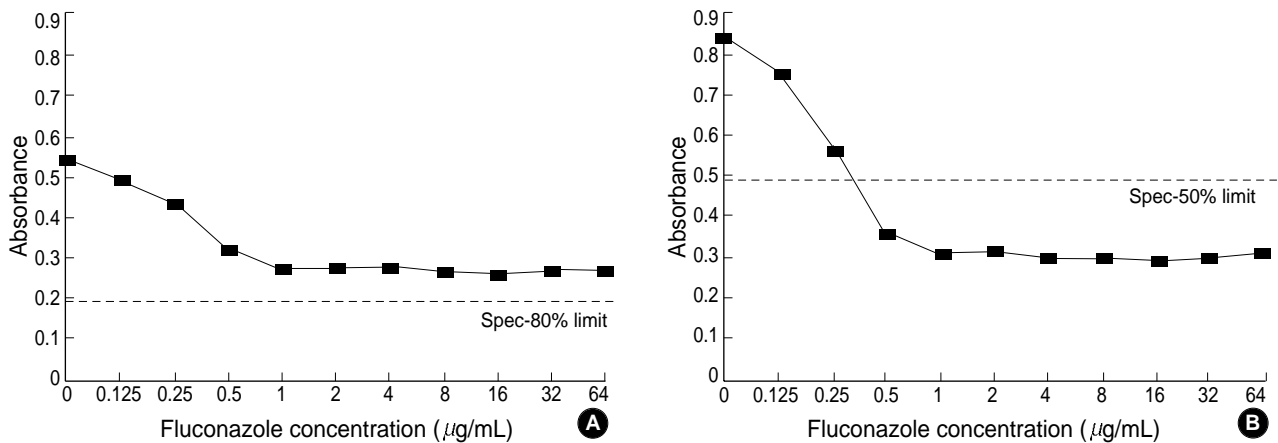


Fig. 1. Changes in absorbance (405 nm) according to fluconazole concentration in RPMI (A) and RPMI-2% glucose (B).

Table 4. Distribution of fluconazole MICs determined by the NCCLS macrodilution method, agar screening method, and microdilution methods with RPMI and RPMI-2% glucose

Test method	Time of Incubation (h)	No. of isolates with MICs (µg/mL)		
		<8	8-32	≥64
NCCLS macrodilution	48	129	0	0
Agar dilution screen	48	129	0	0
Microdilution with RPMI	24	121	2	6
	48	108	3	19
Microdilution with RPMI-2% glucose	24	129	0	0
	48	128	1	0

내 일치율은 RPMI 배지를 사용한 경우 24시간 및 48시간 배양 후 각각 91.5% (118/129) 및 76.7% (99/129)이었는데, RPMI-2% glucose의 경우는 각각 100% (129/129) 및 99.2% (128/129)의 일치율을 보여 RPMI-2% glucose 배지를 사용한 경우가 RPMI 배지에 비해 더 높은 일치율을 보였다($P < 0.01$) (Table 3). *C. albicans* 129주를 대상으로 macrodilution법 및 한천희석법을 시행했을 때 fluconazole MIC는 모두 8 µg/mL 이하였다. 그러나 RPMI 배지를 이용하여 microdilution법을 시행했을 때 위 두 방법과는 달리 MIC가 8 µg/mL 이상인 균주들이 있었는데, 이는 24시간 및 48시간 배양 후 각각 8주 및 22주였다. 이 균주들을 RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 검사

한 결과, 24시간 배양 후에는 모두 MIC가 8 µg/mL 이하이었고 48시간 배양 후에는 1주만이 8 µg/mL 이상이었다(Table 4).

Fig. 1은 trailing 효과를 보이는 *C. albicans* 1주를 예를 들어 RPMI 및 RPMI-2% glucose 배지에서 MIC 판정을 비교해 본 것이다. 이 균주는 NCCLS macrodilution법과 한천희석법에 의해 fluconazole MIC가 8 µg/mL 이하인 감수성 균주로 판정되었다. 이 균주를 RPMI 배지를 사용하여 fluconazole 감수성 검사를 시행하였을 때 24시간 배양 후 fluconazole MIC가 0.5 µg/mL이었으나, 48시간 배양 후 fluconazole MIC는 64 µg/mL 이상으로 증가되었고, 이때 성장대조 well의 흡광도는 약 0.54이었다. 그러나 RPMI-2% glucose 배지를 사용한 경우는 48시간 배양 후 성장대조 well의 흡광도가 약 0.84로 증가되어 이때 fluconazole MIC는 0.5 µg/mL로 판정되었다. 따라서 *C. albicans*의 fluconazole 감수성 검사에서 RPMI-2% glucose 배지를 사용했을 때 RPMI 배지의 경우와는 달리 성장대조 well의 흡광도가 증가함으로써 trailing 효과를 보이는 fluconazole 감수성 균주의 MIC 판정이 용이함을 알 수 있었다.

4. RPMI와 RPMI-2% glucose 배지의 MIC endpoint well과 그 이전 well의 흡광도 차이 비교

C. albicans 129주를 대상으로 broth microdilution법으로 검사

했을 때 MIC endpoint로 결정된 well과 그 이전 well (fluconazole 희석배수가 2배 높은 well)과의 탁도 차이를 RPMI와 RPMI-2% glucose간에 비교해 보았다. 24시간 배양 후 RPMI 배지를 사용한 경우 두 well간의 흡광도 차이는 0.024 ± 0.021 인데 비해 RPMI-2% glucose 배지를 사용한 경우는 0.103 ± 0.058 로서 두 공간에 유의한 차이를 보였다($P < 0.01$). 48시간 배양 후의 흡광도 차이는 RPMI 배지를 사용한 경우 0.101 ± 0.057 이었고, RPMI-2% glucose 배지를 사용한 경우는 0.275 ± 0.099 이었다. 따라서 RPMI-2% glucose를 사용하였을 때 RPMI 배지에 비해 흡광도 차이가 의의 있게 커서 MIC 판정이 더 용이하였다($P < 0.01$).

고 찰

최근 fluconazole의 장기간 사용과 연관된 *C. albicans*의 fluconazole 내성 획득이 자주 보고되고 있다[8, 18]. Tortorano 등[8]은 후천성 면역결핍증 환자에서 fluconazole로 치료 중인 구강 칸디다 감염이 fluconazole에 대해 점차 반응하지 않게됨을 관찰하였고, 동시에 감염 병소에서 연속해서 분리된 *C. albicans* 균주의 fluconazole MIC가 $64 \mu\text{g/mL}$ 까지 점차 증가되었음을 보고한 바 있다. NCCLS 소위위원회는 fluconazole의 MIC $64 \mu\text{g/mL}$ 이상이면 내성을, $16-32 \mu\text{g/mL}$ 인 경우 약용량 의존 감수성을, 그리고 $8 \mu\text{g/mL}$ 이하인 경우는 감수성을 의미한다는 해석법을 제안하여 fluconazole 감수성 검사가 임상적 결과를 예견할 수 있다고 하였다[18]. *C. albicans*는 침습성 칸디다증을 유발하는 가장 흔한 칸디다 균종이므로, *C. albicans*의 fluconazole 내성 획득을 조사하기 위한 감수성 검사는 임상적으로 더욱 중요하리라 생각된다.

*C. albicans*의 fluconazole 감수성 검사에 있어 MIC 판정은 재현성에 문제가 있는 것으로 보고되고 있다[1, 5-7]. 이를 해결하기 위한 방법의 하나로서 NCCLS에서 권장하는 RPMI 1640 배지 대신 glucose 18 g/L를 더 첨가하여 만든 RPMI-2% glucose 배지를 이용하는 검사가 최근 소개되고 있다[17]. RPMI-2% glucose 배지는 특히 *C. albicans* 균주의 증식을 증가시켜 azole계 약제에 대한 MIC endpoint 판정을 용이하게 한다[6, 17]. 본 연구에서 RPMI-2% glucose 배지와 10^4 CFU/mL인 균농도를 이용하여 broth microdilution법을 시행한 결과, 성장대조 well에서의 평균 흡광도는 24시간 배양 후 0.316 ± 0.06 로서 RPMI 배지를 사용한 경우(흡광도, 0.208 ± 0.01)보다 의의있게 더 높았고, 48시간 배양 성적도 이와 유사하였다. Rodriguez-Tudela와 Martinez-Suarez[6]도 본 연구와 동일한 조건에서 이와 유사한 결과를 보고하였다. Cuenca-Estrella 등[21]은 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* 및 *C. lusitanae* 각각 10주씩을 대상으로 RPMI-2% glucose를 사용하여 시험한 결과, *C. parapsilosis* 제외하고는 모두 RPMI-

2% glucose 배지를 사용한 경우에 24시간 및 48시간 배양 후의 흡광도가 더 증가함을 보고하였다. 따라서 RPMI-2% glucose 배지를 이용했을 때 RPMI 배지에 비해 성장대조 well에서의 대부분 칸디다 균종의 성장이 더 증가됨을 알 수 있고, 본 연구에서는 *C. albicans* 균주를 대상으로 이를 확인하였다.

RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 *C. albicans*의 감수성 검사를 시행할 때 균액의 농도를 높여(10^5 혹은 10^4 CFU/mL) 사용하여도 MIC의 위증가 현상은 없다고 보고되고 있다[22, 23]. 균 농도를 10^5 CFU/mL로 하는 것이 가장 NCCLS법과 일치도가 높다는 보고도 있으나[21], 대부분의 연구자들은 10^4 CFU/mL를 선호하고 있다[6, 7, 14, 17]. 또한 이 경우 분광광도계를 이용하여 MIC를 판정할 때 균성장이 80% 억제된 지점보다 50% 억제된 지점을 더 권장하고 있다[6, 11, 17, 19]. 따라서 본 연구에서는 균액의 농도는 10^4 CFU/mL를 사용하였으며, MIC는 성장대조 well에 비해 흡광도가 50% 이상 억제된 지점으로 판정하였다. 본 연구에서 *C. albicans* 표준균주를 대상으로 RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 fluconazole MIC를 측정된 결과, broth microdilution법의 MIC 성적은 macrodilution법 및 한천희석법과 거의 유사하였고, 정도관리 허용범위에도 속하였다. Espinel-Ingroff 등[14] 및 Polanco 등[19]도 RPMI-2% glucose 배지를 사용하여 표준균주에 대해 fluconazole 감수성 검사를 실시하여 유사한 결과를 보고한 바 있다.

본 연구에서 RPMI를 이용한 microdilution법을 분광광도계를 이용하여 판정한 경우, NCCLS macrodilution법간의 2배 희석배수내 일치율은 24시간 배양 후 91.5%이었고, 48시간 배양 후는 76.7%로 매우 낮았다. 그러나 RPMI-2% glucose를 사용한 경우 각각 100% (129/129)와 99.2% (128/129)로, NCCLS macrodilution법과의 일치율이 RPMI에 비해 의의 있게 더 높았다. RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 microdilution법을 시행했을 때 macrodilution법과 2배 희석배수내 일치율은 Rodriguez-Tudela 등[7]은 98.1%로, Espinel-Ingroff 등[14]은 97.7%로 보고하였고, 또한 Polanco 등[19]은 검사실간의 일치율을 98.2%로 보고하였다. 또 RPMI-2% glucose 배지를 이용한 microdilution법과 다른 방법과의 일치율은 24시간과 48시간 배양간에 차이는 없다고도 있으나[17], Cuenca-Estrella와 Rodriguez-Tudela[9] 및 Lozano-Chiu 등[20]은 24시간 배양 후의 일치율이 48시간 배양 후에 비해 더 높다고 보고하였다. 본 연구에서도 24시간 후의 일치율이 48시간 후에 비해 더 높았는데, 이는 RPMI-2% glucose 및 10^4 CFU/mL의 균액을 사용한 경우 검사 시간의 단축이 가능함을 보여주었다.

Trailing 효과는 fluconazole 등 azole계 항진균제의 fungistatic activity로 인하며, trailing 효과를 보이는 균주는 대개 fluconazole 감수성 검사상 24시간 배양 후 감수성을 보이나, 48시간 후엔 MIC가 $64 \mu\text{g/mL}$ 이상으로 증가된다[5]. NCCLS에서는 일부 균주가 RPMI 배지에서 24시간 배양 후 성장이 잘 안되므로 48시간 배양을 권장하고 있는데, trailing 효과를 보이는 이

균주들을 NCCLS의 권장대로 48시간 후 판독하게 되면 fluconazole 내성으로 잘못 판정될 수 있다[5, 8]. Torantore 등[24]은 trailing 효과를 줄이기 위해서는 NCCLS법에서 사용되는 MOPS의 농도를 0.0165 M로 낮추고 24시간 배양 후 판독을 하는 것이 좋다고 하였다. Revankar 등[5]은 NCCLS법으로 검사한 fluconazole MIC가 24시간 배양 후에는 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하이다가 48시간 배양 후엔 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이 되는 *C. albicans* 균주들을 관찰하였는데, 이 균주들을 대상으로 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 fluconazole이 포함된 한천 희석법으로 검사했을 때 MIC가 모두 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만인 감수성 균주들임을 확인할 수 있었다. 신 등[10]도 NCCLS법과 E test에서 trailing 효과가 관찰된 *C. albicans* 균주들을 fluconazole이 포함된 평판배지에서 시험한 결과 MIC가 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로 쉽게 판정됨을 보고한 바 있다. 본 연구에서 NCCLS microdilution법 성적 중 fluconazole MIC가 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 증가된 균주는 RPMI 배지의 경우 24시간 및 48시간 배양 후 각각 8주 및 22주이었으나, RPMI-2% glucose의 경우는 각각 0주 및 1주로서 RPMI-2% glucose를 사용했을 때 trailing 효과가 훨씬 감소함을 알 수 있었다. 이는 Fig. 1에서 보여준 것처럼 RPMI 배지에서 trailing 효과를 보이는 *C. albicans* 균주는 RPMI-2% glucose 배지를 사용했을 때 성장대조 well의 흡광도가 증가됨에 따라 감수성 균주로 쉽게 판정될 수 있었다. Rodriguez-Tudela 등[6]도 본 결과와 유사하게 RPMI-2% glucose 배지를 이용하였을 때 RPMI 배지에 비해 trailing 효과를 보이는 균주가 거의 없음을 보고하였다.

본 연구에서 두 배지간의 MIC endpoint well과 그 이전 well과의 흡광도 차이를 비교해 본 결과, RPMI-2% glucose 배지를 사용하였을 때 24시간 및 48시간 배양 후 흡광도 차이는 각각 약 0.103 및 0.275로서 RPMI 배지(약 0.024 및 0.101)에 비해 유의하게 증가하였다. 여러 연구자[6, 11, 17, 20]도 trailing 효과를 보이는 *C. albicans*를 대상으로 RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 fluconazole 감수성 검사를 시행했을 때, RPMI 배지보다 MIC 판정이 더 용이하였다고 보고한 바 있다. 따라서 RPMI-2% glucose 배지를 이용하면 RPMI 배지에 비해 성장대조 well의 *C. albicans*의 성장을 증가시켜 MIC endpoint인 well과의 흡광도 차이가 더 분명해짐에 따라 MIC 판정이 더 용이해지며, NCCLS의 중요한 문제점 중의 하나인 trailing 효과에 의한 부정확한 MIC 판정을 어느 정도 막을 수 있을 것으로 생각되었다.

본 연구에서는 *C. albicans*의 fluconazole 감수성 검사에서 있어 NCCLS법의 몇가지 문제점을 해결하고자 NCCLS법을 변형시킨 방법을 시도하였다. 첫째, 일부 *C. albicans* 균주들이 RPMI 1640 배지에서 잘 자라지 못하는 문제점을 해결하기 위해 RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 broth microdilution법을 시행하였고, 둘째, 균농도는 NCCLS의 권장 농도(10^3 CFU/mL)보다 더 높은 농도(10^4 CFU/mL)를 사용하였으며, 셋째, MIC 판정은 분광광도계를 이용하였고 대조 well에 비해 성장이 50% 억제된 well을 MIC로 정하였다. 그 결과 NCCLS macrodilution법 및

한천 희석 선별법과의 일치율이 매우 높았으며, 성장대조 well의 평균 흡광도 및 MIC endpoint인 well과 그 이전 well과의 흡광도 차이는 RPMI 배지에 비해 유의하게 더 높아 MIC 판정이 더 용이하였고, trailing 효과를 보이는 *C. albicans*에서도 쉽게 fluconazole 감수성 균주로 확인 가능하였다. 결론적으로 본 연구를 통해 *C. albicans*의 fluconazole 감수성 검사에 있어 RPMI-2% glucose 배지를 이용한 microdilution법은 NCCLS broth microdilution법의 단점을 보완하는 방법으로 유용하게 사용될 수 있으리라 생각되었다.

요 약

배경 : *Candida albicans*의 fluconazole 감수성 검사에 있어 MIC 판정은 재현성에 문제가 있는 것으로 보고되고 있다. 저자들은 임상 검체에서 분리된 *C. albicans*를 대상으로 RPMI 및 RPMI-2% glucose 배지를 이용하여 spectrophotometric microdilution법으로 fluconazole 감수성 검사를 실시하고, 이를 비교 평가하여 보았다.

방법 : 임상 검체에서 분리된 129주(전남대 72주 및 연세대 57주)의 *C. albicans*를 대상으로 하여 각 균주의 fluconazole 감수성 검사는 RPMI 및 RPMI-2% glucose를 이용한 broth microdilution법으로 시행하였고, MIC endpoint는 분광광도계로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 두 배지를 이용한 broth microdilution법의 성적은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) broth macrodilution법 및 한천희석선별법과 비교하였다.

결과 : *C. albicans* 129주를 broth microdilution법으로 검사한 결과, 약제가 들어있지 않은 대조 well의 평균 흡광도는 RPMI 배지를 사용한 경우 24시간과 48시간 배양 후 각각 0.208 ± 0.014 및 0.339 ± 0.094 이었고, RPMI-2% glucose를 사용한 경우 24시간과 48시간 배양 후 각각 0.316 ± 0.061 및 0.530 ± 0.104 로서, RPMI-2% glucose를 사용하였을 때 더 많은 균 성장을 보였다 ($P < 0.01$). Fluconazole MIC의 macrodilution법과의 2배 희석배수내 일치율은 RPMI를 사용한 경우 24시간과 48시간 배양 후 각각 91.5% (118/129)와 76.7% (99/129)로 낮았는데, RPMI-2% glucose를 사용한 경우는 각각 100% (129/129)와 99.2% (128/129)로서 유의하게 더 높았다($P < 0.01$). MIC point well과 그 이전 well과의 흡광도 차이는 RPMI-2% glucose를 사용한 경우 RPMI를 사용한 경우보다 더 확실하여 MIC 판정이 용이하였다.

결론 : *C. albicans*의 fluconazole 감수성 검사에 있어 RPMI-2% glucose 배지를 이용한 spectrophotometric microdilution법은 NCCLS broth macrodilution법과의 일치율이 매우 높으며, MIC 판정이 더 용이함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. *Antifungal susceptibility testing*. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 367-81.
2. 신중희. 항진균제 감수성 검사와 임상적 응용. *대한화학요법학회지* 1998; 16: 291-8.
3. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-P*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1992.
4. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1997.
5. 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.
6. Rodriguez-Tudela JL and Martinez-Suarez JV. *Defining conditions for microbroth antifungal susceptibility tests: influence of RPMI and RPMI-2% glucose on the selection of endpoint criteria*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 739-49.
7. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Martinez-Suarez JV, Sanchez R. *Comparison of a 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.
8. Tortorano AM, Viviani MA, Barchiesi F, Arzeni D, Rigoni 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.
9. Cuenca-Estrella M and Rodriguez-Tudela JL. *Present status of the detection of antifungal resistance: the perspective from both sides of the ocean*. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(Suppl 2): 46-53.
10. 신중희, 김민, 김종필, 서순팔, 양동욱. *한천희석법을 이용한 Candida Species의 Fluconazole 내성 선별*. *대한화학요법학회지* 1999; 17: 199-210.
11. Odds FC, Vranckx L, Woestenborghs F. *Antifungal susceptibility testing of yeasts: evaluation of technical variables for test automation*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2051-60.
12. 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.
13. Nguyen MH and Yu CY. *Influence of incubation time, inoculum size, and glucose concentrations on spectrophotometric endpoint determinations for amphotericin B, fluconazole, and itraconazole*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 141-5.
14. Espinel-Ingroff A, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV. *Comparison of two alternative microdilution procedures with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro testing of fluconazole-resistant and -susceptible isolates of Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 3154-8.
15. Barchiesi F, Colombo AL, McGough DA, Rinaldi MG. *Comparative study of broth macrodilution and microdilution techniques for in vitro antifungal susceptibility testing of yeasts by using the National Committee for Clinical Laboratory Standards' proposed standard*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2494-500.
16. Espinel-Ingroff A, Kish CW Jr, Kerkering TM, Fromtling RA, Bartizal K, Galgiani JN, et al. *Collaborative comparison of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 3138-45.
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. Ruhnke M, Schmidt-Westhausen A, Engelmann E, Trautmann M. *Comparative evaluation of three antifungal susceptibility test methods for Candida albicans isolates and correlation with response to fluconazole therapy*. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3208-11.
19. Polanco AM, Rodriguez-Tudela JL, Baquero F, Sanchez-Sousa A, Martinez-Suarez JV. *Improved method of determining the susceptibility of Candida albicans to fluconazole*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 155-9.
20. Lozano-Chiu M, Arikan S, Paetznick VL, Anaissie EJ, Rex JH. *Optimizing voriconazole susceptibility testing of Candida: effects of incubation time, endpoint rule, species of Candida, and level of fluconazole susceptibility*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2755-9.
21. Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. *Influence of glucose supplementation and inoculum size on growth kinetics and antifungal susceptibility testing of Candida spp.* *J Clin Microbiol* 2001; 39: 525-32.
22. Cuenca-Estrella M, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. *Comparative in vitro activity of voriconazole and itraconazole against fluconazole-susceptible and fluconazole-resistant clinical isolates of Candida species from Spain*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 432-5.
23. Canton E, Peman J, Carrillo-Munoz A, Orero A, Ubeda P, Viudes A, et al. *Fluconazole susceptibilities of bloodstream Candida sp. isolates as determined by National Committee for Clinical Laboratory Standards method M27-A and two other methods*. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2197-200.

24. Tornatore MA, Noskin GA, Hacek DM, Obias AA, Peterson LR.
Effects of incubation time and buffer concentration on in vitro activities of

antifungal agents against Candida albicans. J Clin Microbiol 1997; 35:
1473-6.