

Candida 균종의 Fluconazole 감수성 검사를 위한 Spectrophotometric Broth Microdilution법의 평가

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

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실, 연세대학교 의과대학 진단검사의학교실*

Evaluation of Spectrophotometric Broth Microdilution Method to Determine the Fluconazole MIC of the *Candida* Species

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

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

Background : Although the broth microdilution method has been recently established for antifungal susceptibility testing of the *Candida* species, there is still an argue in the interpretation of the trailing endpoint. We evaluated the spectrophotometric broth microdilution method (SBM) to determine the fluconazole MICs from five different *Candida* species.

Methods : A total of 252 clinical isolates of five *Candida* species (144 *C. albicans*, 42 *C. tropicalis*, 32 *C. glabrata*, 28 *C. parapsilosis*, and 6 *C. krusei*) were tested for fluconazole susceptibility with the broth microdilution method. The MICs were spectrophotometrically determined at 80% (Spec-80%) and 50% (Spec-50%) decrease in absorbance as compared with growth control, respectively. The results were compared with the fluconazole MICs tested by the National Committee for the Clinical Laboratory Standards (NCCLS) macrodilution method.

Results : When MICs were obtained by Spec-80%, the agreements of SBM and the NCCLS macro dilution method within two doubling dilutions were 92.4% (220/238) at 24 h and 78.6% (198/252) at 48 h for all *Candida* species. Using the Spec-50%, those were increased to 97.9% (233/238) at 24 h and 98.8% (249/252) at 48 h ($P < 0.01$). Especially, for *C. albicans* and *C. tropicalis*, the agreement of the Spec-50% was significantly higher than those of the Spec-80% at 48 h; 97.9% vs. 75.0%, for *C. albicans* ($P < 0.01$), and 100% vs. 57.1%, for *C. tropicalis* ($P < 0.01$).

Conclusions : These data suggest that the SBM using Spec-50% can provide a more precise and objective mean for fluconazole susceptibility testing, especially for *C. albicans* and *C. tropicalis*. (Korean J Lab Med 2002; 22: 253-9)

Key words : Spectrophotometric microdilution method, Fluconazole, *Candida*, Antifungal susceptibility testing, *Candida albicans*

서 론

접 수 : 2002년 7월 15일

접수번호 : KJCP1593

수정본접수 : 2002년 8월 23일

교신저자 : 신종희

우 501-757 광주광역시 동구 학동 8

전남대학교병원 진단검사의학과

전화 : 062-220-5342, Fax : 062-224-2518

E-mail : shinjh@chonnam.ac.kr

항진균제 감수성 검사를 위한 broth microdilution법은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-T법에 포함되어 있는데, NCCLS broth macrodilution법과 높은

일치율을 보이며 사용이 매우 간편하다[1-3]. 그러나 이를 이용한 칸디다 균주의 fluconazole 감수성 검사는 일부 칸디다 균주가 RPMI 배지에서 잘 자라지 않거나 끌림(trailing) 효과를 보이는 등으로 인해 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, 이하 MIC) 결과에 있어 재현성이 문제가 되고 있다[3-8]. 또한 MIC를 48시간 배양 후 육안관찰에 의해 성장대조 well에 비해 균 성장이 현저히 감소된 지점(score 2 이하)으로 판정하도록 하고 있어[2], 주관적 오류의 위험이 있다[5, 6, 8]. 최근 이와 같은 microdilution법에 의한 항진균제 감수성 검사를 시행한 후 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 객관적으로 MIC를 판정하고 자동화하려는 spectrophotometric broth microdilution (SBM) 법이 시도되고 있다[5, 6, 9-12].

저자들은 임상 검체에서 분리된 5종의 칸디다 균주들의 fluconazole 감수성 검사를 SBM법으로 시행하였다. Fluconazole MIC는 약제가 들어있지 않은 성장대조 균액에 비해 흡광도가 80% 또는 50% 감소한 지점으로 각각 판정하였고, 이를 NCCLS broth macrodilution법 결과와 각각 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

전남대학교병원 및 연세대학교 세브란스병원에 내원한 환자에서 분리된 5종의 칸디다 252주(전남대 195주, 연세대 57주)를 대상으로 하였다. 균종별 대상 균주는 *Candida albicans* 144주, *Candida tropicalis* 42주, *Candida glabrata* 32주, *Candida parapsilosis* 28주 및 *Candida krusei* 6주이었다. 또 각 검사의 정도관리를 위해 5주의 ATCC 표준균주(*C. albicans* ATCC 90028, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 및 *C. albicans* ATCC 64550)를 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 균주들은 20% skim milk 배지(Becton Dickinson, Sparks, Md, USA)에 넣어 -70°C에 보관하였다.

2. NCCLS broth microdilution법

NCCLS M27 방법에 의하여 0.165 M MOPS (3-N-morpholinopropanesulfonic acid)가 들어있는 RPMI 1640 (RPMI-MOPS) 배지를 이용하여 시행하였다[1, 2]. Fluconazole (Diflucan, 한국화이자, Korea)은 RPMI-MOPS 배지를 이용하여 각각 64-0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 배수 희석하여 10개의 농도

로 만들어 96 microwell plate (Nunclon, Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)에 1번에서 10번 well까지 각 well당 100 μL 씩 분주하였다. 균주는 SDA 평판배지에 35°C, 24시간 배양 후 0.85% 식염수에 균을 풀어 잘 섞은 후 0.5 McFarland 탁도(spectrophotometer, 530 nm)로 맞추어 균농도가 약 $1-5 \times 10^6$ CFU/mL가 되도록 하였다. 이 균액을 다시 RPMI-MOPS 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 μL 와 fluconazole이 들어 있지 않은 RPMI-MOPS 배지 100 μL 를, 12번 well은 배지의 대조 well로서 RPMI-MOPS 배지 200 μL 만을 분주하였다. 균 접종이 끝난 microplate는 35°C에서 24시간 및 48시간 동안 배양하였다.

결과 판정은 24시간 및 48시간 배양 후 microplate를 꺼내어 shaker에서 5분 동안 잘 혼합한 후, 분광광도계(VERSAmax Tunable Microplate Reader; Molecular Devices Corp., Sunnyvale, Calif., USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. MIC 판정은 성장대조 well에 비해 흡광도가 80% 또는 50% 이상 억제된 최소항진균제농도(각각 Spec-80% 및 Spec-50%)를 기준으로 판정하였다[2, 13]. 이때 검사자에 의한 오차를 방지하기 위하여 두 사람의 관찰자가 맹검으로 판정하였다[3].

3. NCCLS broth macrodilution법

NCCLS broth macrodilution법은 NCCLS M27 방법에 따라 최종 균농도는 $0.5-2.5 \times 10^3$ CFU/mL로서 시험관내 검사량이 1 mL가 되도록 하여 35°C에 48시간 동안 배양하여 실시하였다. MIC 판정은 48시간 배양 후 성장대조시험관을 1:5로 희석하여 1번부터 10번 시험관까지 비교하며 80% 억제된 희석배수까지로 판정하였다[1, 2].

4. 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. 칸디다 ATCC 표준균주의 fluconazole MIC 결과

정도관리 범위가 알려진 칸디다 4종의 표준균주를 대상으로 fluconazole 감수성 검사를 SBM법에 의해 Spec-80% 혹은 Spec-50%의 기준으로 MIC를 판정한 결과, 48시간 배양 후의 MIC는 모두 정도관리 허용 범위에 속하였다. 그러나 24시간 배양 후의 MIC는 Spec-80%를 기준으로 했을 때는 한가지 표준균

주(*C. glabrata* ATCC 90030)가, 그리고 Spec-50%를 기준으로 했을 때는 3가지 표준균주(*C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*)가 각각 정도관리 허용범위에서 한 단계씩 낮은 MIC를 보였다. 한편 fluconazole 내성 균주인 *C. albicans* ATCC 64550의 경우 현재 정도관리용 허용범위는 알려진 바 없으나, 본 실험에서 Spec-80% 혹은 Spec-50%로 판정한 24시간 및 48시간 배양 방법 모두에서 MIC가 16-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이로 NCCLS macrodi-

lution법과 유사한 결과를 보였다(Table 1).

2. Broth macrodilution법과 microdilution법의 일치율

Microdilution법에 의한 fluconazole MIC를 Spec-80% 및 Spec-50%를 기준으로 판정하여 이를 각각 NCCLS macrodilution법의 결과와 비교하여 일치율을 분석하였다(Table 2). 48시간 배양 후에는 전체 252주 모두가 성장을 보여 판독이 가능하였으나, 24시간 배양 후에는 14주(5.6%)가 자라지 않아 24시간 배양 후의 결과는 238주에서만 알 수 있었다. 24시간 배양 후까지 자라지 않은 균주를 균종별로 보면 *C. albicans* 5주, *C. tropicalis* 2주, *C. glabrata* 5주 및 *C. parapsilosis* 2주가 이에 속하였다.

전체 252주를 대상으로 microdilution법에 의한 fluconazole 감수성 검사를 Spec-80%를 기준으로 판정하였을 때, NCCLS macrodilution법과의 2배 희석배수내 일치율은 24시간과 48시간 배양 후 각각 92.4% (220/238)와 78.6% (198/252)이었고, Spec-50%를 기준으로 판정한 결과는 24시간과 48시간 배양 후 각각 97.9% (233/238)와 98.8% (249/252)로서 macrodilution법과의 일치율은 Spec-80% 기준인 경우보다 의의 있게 더 증가하였다($P<0.01$).

각 균종별로 살펴보면, Spec-80%를 기준으로 판정하였을 때 *C. albicans*의 경우 24시간과 48시간 배양 후 NCCLS macrodilution법과의 일치율은 각각 91.4% (127/139)와 75.0% (108/

Table 1. Fluconazole MICs of *Candida control* ATCC strains

ATCC strain	Incubation time (h)	Fluconazole MICs ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
		Q.C. range	Macrodilution	Microdilution*	
				Spec-80%	Spec-50%
<i>C. albicans</i>	24			0.5	0.5
ATCC 90028	48	0.25-1	0.5	0.5	0.5
<i>C. glabrata</i>	24			4	4
ATCC 90030	48	8.0-32	8.0	16	8
<i>C. parapsilosis</i>	24			2	1
ATCC 22019	48	2.0-8	4.0	2	2
<i>C. krusei</i>	24			16	8
ATCC 6258	48	16-64	32	32	32
<i>C. albicans</i>	24			16	16
ATCC 64550	48	NA	32	32	32

*Spectrophotometric reading.
Abbreviation: NA, not available.

Table 2. Distribution of difference and agreement of the MICs determined by the NCCLS macrodilution reference method and microdilution method for five *Candida* species isolates

Species (No. of isolates)	Method of endpoint determination	Reading time (h)	No. of isolates with Δ MICs* of							EA [†] (%)
			>-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	
<i>C. albicans</i> (144)	Spec-80%	24 [‡]	2	4	30	69	17	7	10	91.4
		48	1	2	12	66	22	6	35	75.0
	Spec-50%	24 [‡]	0	16	56	63	4	0	0	100 [§]
		48	0	13	45	75	8	0	3	97.9 [§]
<i>C. tropicalis</i> (42)	Spec-80%	24 [‡]	1	2	13	12	4	3	5	85.0
		48	0	0	3	7	10	4	18	57.1
	Spec-50%	24 [‡]	2	10	17	11	0	0	0	95.0 [§]
		48	0	0	7	31	4	0	0	100 [§]
<i>C. glabrata</i> (32)	Spec-80%	24 [‡]	0	3	15	9	0	0	0	100
		48	0	0	5	21	5	1	0	100
	Spec-50%	24 [‡]	2	4	19	2	0	0	0	92.6
		48	0	3	15	14	0	0	0	100
<i>C. parapsilosis</i> (28)	Spec-80%	24 [‡]	0	3	11	11	1	0	0	100
		48	0	0	3	23	2	0	0	100
	Spec-50%	24 [‡]	1	8	5	6	6	0	0	96.2
		48	0	2	10	16	0	0	0	100
<i>C. krusei</i> (6)	Spec-80%	24	0	4	1	1	0	0	0	100
		48	0	0	1	0	0	0	0	100
	Spec-50%	24	0	4	2	0	0	0	0	100
		48	0	0	4	2	0	0	0	100

*Spectrophotometric MICs different from macrodilution method MICs by number of log dilutions; [†]EA of MIC results of the two methods is defined as exact agreement or agreement within two fold dilutions; [‡]Five *C. albicans*, two *C. tropicalis*, five *C. glabrata* and two *C. parapsilosis* isolates were not grown after 24 h-incubation; [§] $P<0.01$, Spec-80% versus Spec-50% at each incubation time within a given *Candida* species.

Table 3. Comparison of fluconazole MICs determined by spectrophotometric microdilution method with those obtained by NCCLS macrodilution method for five different *Candida* species

<i>Candida</i> species (No. of isolates)	MIC method		Reading time (h)	No. of isolates with MICs ($\mu\text{g/mL}$)			
				<4	4-8	16-32	≥ 64
<i>C. albicans</i> (144)	Macrodilution		48	143	0	1	0
	Microdilution	Spec-80%	24*	131	0	2	6
			48	121	1	3	19
			24*	138	1	0	0
<i>C. tropicalis</i> (42)	Microdilution	Spec-80%	48	141	0	2	1
			24*	42	0	0	0
			48	36	0	1	3
	Microdilution	Spec-50%	48	26	1	2	13
24*			40	0	0	0	
48			42	0	0	0	
<i>C. glabrata</i> (32)	Macrodilution		48	1	24	7	0
	Microdilution	Spec-80%	24*	2	20	5	0
			48	1	22	9	0
			24*	2	20	5	0
<i>C. parapsilosis</i> (28)	Microdilution	Spec-50%	48	1	26	5	0
			24*	28	0	0	0
			48	28	0	0	0
	Macrodilution		48	28	0	0	0
<i>C. krusei</i> (6)	Microdilution	Spec-80%	24	0	0	4	2
			48	0	0	0	6
			24	0	0	5	1
	Macrodilution		48	0	0	3	3

*Five *C. albicans*, two *C. tropicalis*, five *C. glabrata*, and two *C. parapsilosis* isolates were not grown after 24 h-incubation.

144)이었는데, Spec-50%를 기준으로 판정한 결과 각각 100% (139/139)와 97.9% (141/144)로서 Spec-80% 기준인 경우보다 일치율이 더 증가하였다($P < 0.01$). *C. tropicalis*의 경우는 Spec-80%를 기준으로 판정하였을 때 24시간과 48시간 배양 후 NCCLS macrodilution법과의 일치율이 각각 85.0% (34/40) 및 57.1% (24/42)이었는데, Spec-50%를 기준으로 판정하였을 때는 각각 95.0% (38/40) 및 100% (42/42)로서 *C. albicans* 균주와 마찬가지로 Spec-50%를 기준으로 할 때 일치율이 더 높았다($P < 0.01$). 한편 *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, 그리고 *C. krusei*의 경우는 Spec-80%를 기준으로 판정하였을 때의 일치율은 24시간과 48시간 배양 후 모두 100%이었고, Spec-50%의 경우는 *C. glabrata*와 *C. parapsilosis*의 24시간 배양(각각 92.9% 및 96.2%)을 제외하고는 모두 100%이었다(Table 2).

3. Spec-80% 및 Spec-50%를 기준으로 한 MIC 성적 비교

NCCLS macrodilution법에 의한 칸디다 252주의 fluconazole MIC 분포는 균종간에 차이를 보였다. *C. albicans* (144주), *C. tropicalis* (42주) 및 *C. parapsilosis* (28주)의 경우 연세대의 *C. albicans* 1주(16 $\mu\text{g/mL}$)를 제외하고는 모두 MIC가 4 $\mu\text{g/mL}$

이하이었다. 한편 *C. glabrata*는 1주를 제외하고는 31주가 MIC 4 $\mu\text{g/mL}$ 이상이었으며, *C. krusei*는 6주 모두가 MIC 16-64 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(Table 3).

*C. albicans*의 경우 NCCLS macrodilution법으로 검사했을 때 MIC가 16 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 144주 중 1주 뿐이었는데, microdilution법의 결과를 Spec-80%로 판정했을 때는 24시간과 48시간 배양 후 각각 5.8% (8/139) 및 15.3% (22/144)이었다. 그러나 Spec-50%로 판정했을 때 MIC가 16 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 *C. albicans* 균주는 24시간과 48시간 배양 후 각각 0% (0/139) 및 2.1% (3/144)로서 Spec-80%로 판정한 경우보다 감소하였다. *C. tropicalis* 42주를 24시간과 48시간 배양 후 Spec-80%로 판정했을 때 MIC가 16 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 각각 4주 및 15주 이었는데, 이를 Spec-50%로 판정했을 때는 24시간과 48시간 배양 후 MIC가 16 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 1주도 없었으며 이는 NCCLS macrodilution법의 결과와 일치하였다.

C. glabrata 32주 중 31주의 fluconazole MIC는 NCCLS macrodilution법에 의해 4-32 $\mu\text{g/mL}$ 사이이었는데, 48시간 배양 후 Spec-80% 및 Spec-50%로 판정한 결과도 31주의 MIC가 4-32 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 24시간 배양 후에는 *C. glabrata* 중 5주는 잘 자라지 않았고, Spec-80% 및 Spec-50%로 판정한 결과는 서로 동일하여 2주를 제외한 25주의 MIC가 4-32 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

*C. parapsilosis*의 경우 Spec-80%와 Spec-50%로 판정한 MIC는 28주 모두가 24시간과 48시간 배양 후 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하로서 NCCLS macrodilution 법에 의한 결과와 일치하였다. *C. krusei*의 경우 Spec-80%와 Spec-50%로 판정한 MIC는 6주 모두가 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상이었고, 이는 NCCLS macrodilution법의 결과와 동일하였다.

고 찰

SBM법을 이용한 fluconazole 감수성 검사는 시행과 판독이 용이하며 재현성이 높은 방법으로 평가되고 있다[10]. 그러나 칸디다의 균종별로 배지내 성장력이나 성장 속도에 차이가 있을 수 있어서 모든 칸디다 균종에 동일한 MIC 판정기준을 적용할 수 있는지에 대해서는 연구가 필요하다. 저자들은 임상 검체에서 분리된 5종의 칸디다 균주를 대상으로 SBM법을 이용한 fluconazole 감수성 검사를 시행한 후 MIC를 각각 흡광도가 80% 및 50% 감소된 지점(각각 Spec-80% 및 Spec-50%)으로 판정하고, 이를 NCCLS broth macrodilution법 결과와 비교해 보았다.

본 연구에서는 칸디다 ATCC 표준균주들을 대상으로 SBM법으로 fluconazole 감수성 검사를 시행하였는데, 그 결과 48시간 배양 성적은 모두 정도관리 허용범위에 속하였다. 그러나 일부 균종(*C. glabrata*, *C. parapsilosis* 및 *C. krusei*)에서 24시간 배양 후의 성적은 정도관리 허용범위보다 더 낮은 MIC를 나타내었다. Pfaller 등[10]도 본 성적과 유사하게 칸디다 ATCC 표준균주 5주를 대상으로 SBM법으로 fluconazole 감수성 시험을 한 결과, 24시간 배양 후의 성적은 정도관리 허용범위보다 더 낮은 MIC를 나타내었고, 48시간 배양 성적은 모두 정도관리 허용범위에 속하였다고 보고하였다. 한편 본 연구 결과 중 *C. albicans* ATCC 90058 균주는 24시간과 48시간 배양 후의 MIC는 Spec-80%와 Spec-50% 판정 모두에서 정도관리 허용범위에 속하였고, *C. albicans* ATCC 64550 균주는 정도관리 허용범위는 알려진 바 없으나 Spec-80% 혹은 Spec-50%로 판정했을 때 MIC는 16-32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 사이로서 NCCLS macrodilution법과 유사한 결과를 보였다. Polanco 등[16]은 *C. albicans* ATCC 표준균주 4주에 대해 SBM법으로 fluconazole 감수성 검사를 시행하고 그 결과를 Spec-50%를 기준으로 판정했을 때 모든 균주에서 NCCLS macrodilution법과 2배 희석배수내에서 일치하였다고 보고한 바 있다.

본 연구 결과 SBM법에 의한 fluconazole 감수성 검사의 NCCLS macrodilution법과의 일치율은 MIC 판정방법에 따라 달라짐을 알 수 있었다. 전체 균주에 대한 fluconazole 검사를 Spec-80%를 기준으로 판정하였을 때 macrodilution법과의 일치율은 24시간과 48시간 배양 후 각각 92.4%와 78.6%이었고, Spec-50%를 기준으로 판정한 결과는 24시간과 48시간 배양 후 각각 97.9%와 98.8%로서 일치율이 의의 있게 증가하였다. 이는

fluconazole을 비롯한 azole계 약제의 경우 대부분 Spec-50%를 기준으로 할 때 MIC 판정결과가 더 정확하였고, NCCLS 표준법과의 일치율도 높다고 하였던 다른 연구자들의 보고[10-12, 15]와 일치하였다. Spec-80% 결과가 NCCLS macrodilution법과의 일치율이 높지 못한 이유에 대해 Rodriguez-Tudela와 Martinez-Suarez[5]는 일부 칸디다 균주들이 RPMI 배지내에서 잘 성장하지 못해서 성장대조 well에서의 균 증식이 충분하지 못하고, 또 일부 균주에서는 끝림 효과를 보일 수 있기 때문으로 해석하였다.

본 연구에서는 칸디다의 균종에 따라 microdilution법과 NCCLS macrodilution법의 일치율이 차이가 있음이 관찰되었다. 즉, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*와 *C. krusei* 균주의 경우 Spec-80% 혹은 Spec-50%를 기준으로 MIC를 판정했을 때, microdilution법과 macrodilution법의 일치율은 48시간 배양 모두에서 100%이었다. 그러나 *C. albicans*와 *C. tropicalis*의 경우는 48시간 배양 후 Spec-80% 기준으로 MIC를 판정했을 때 macrodilution법과의 일치율은 각각 75.0% 및 57.1%로 매우 낮았지만, Spec-50%를 기준으로 판정했을 때는 일치율이 97.9% 및 100%로서 Spec-80%에 비해 증가함을 알 수 있었다. 따라서 NCCLS법의 권장대로 fluconazole 감수성 검사를 microdilution법으로 실시하고 48시간 배양 후 MIC를 판정할 경우 *C. parapsilosis*, *C. glabrata*와 *C. krusei* 균주는 Spec-80% 혹은 Spec-50% 기준간에 큰 차이를 나타내지 않는 반면, *C. albicans*와 *C. tropicalis*의 경우는 Spec-80%보다는 Spec-50%로 판정하는 것이 더 적합하리라 생각되었다.

*C. albicans*와 *C. tropicalis* 균종의 경우 Spec-80%로 판정한 MIC가 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상인 균주는 24시간 배양 후 각각 6주 및 3주이었는데, 48시간 배양 후에는 19주와 13주로 각각 증가하였고 이는 끝림 효과에 의한 것으로 생각되었다. 끝림 효과는 fluconazole 등 azole계 약제의 fungistatic activity로 인해 시험관내 약제 농도가 계속 증가해도 균의 증식이 부분적으로 계속 관찰되는 현상으로서[3, 4], 이 효과를 보이는 균주들은 대개 fluconazole 감수성 검사상 24시간 배양 후 감수성을 보이나 48시간 후엔 MIC가 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 증가되므로 NCCLS의 권장대로 48시간 후 판정하게 되면 fluconazole 내성으로 잘못 판정될 수 있다[4, 7]. Torantore 등[17]은 끝림 효과를 줄이기 위해서는 24시간 배양 후 판독하는 것이 좋다고 하였으나, 일부 균주는 24시간 동안 배양했을 때 충분히 증식되지 않을 수 있으므로 이것만으로는 끝림 효과 문제를 해결할 수는 없다[18]. 본 연구에서도 RPMI 배지에서 24시간 배양 후 증식하지 못한 균주가 14주(5.5%) 있었다. Revankar 등[4]은 끝림 효과를 보이는 균주들을 대상으로 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 fluconazole이 포함된 한천희석법으로 검사하였는데, 그 결과 MIC가 모두 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 미만인 감수성 균주임을 확인하였다. 본 연구에서도 Spec-80%로 판정했을 때 MIC가 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상으로 끝림 효과를 보였던 *C. albicans*와 *C. tropicalis* 균주는 NCCLS macrodilution

법을 이용하여 감수성 균주로 판정될 수 있었고, 이 결과가 Spec-50%의 결과와 2주를 제외하고는 거의 일치함을 확인하였다.

결론적으로 SBM법을 이용하여 fluconazole 감수성 검사를 했을 때 특히 *C. albicans*와 *C. tropicalis* 균주들은 Spec-80%보다는 Spec-50%를 기준으로 판정하는 것이 합당하리라 생각되며, 높은 fluconazole MIC를 보이는 균주들은 macrodilution법 등의 다른 방법으로 확인 검사가 필요하리라 사료되었다.

요 약

배경: Broth microdilution법에 의한 fluconazole 감수성 검사는 사용이 간편하나, 일부 칸디다 균주에서 최소억제농도(MIC) 판정에 있어 재현성이 문제되고 있다. 저자들은 5가지 칸디다 균종을 대상으로 fluconazole 감수성 검사를 spectrophotometric broth microdilution (SBM)법으로 실시한 후 두 가지 기준으로 MIC를 판정하고 비교하여 보았다.

방법: 임상 검체에서 분리된 252주(*Candida albicans* 144주, *C. tropicalis* 42주, *C. glabrata* 32주, *C. parapsilosis* 28주 및 *C. krusei* 6주)의 5가지 *Candida* 균종을 대상으로 하였다. 각 균주는 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) broth macrodilution법 및 SBM법으로 동시에 fluconazole 감수성 검사를 실시하였다. SBM법의 fluconazole MIC 판정은 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하여 성장 대조에 비해 80% 및 50% 이상 억제된 항진균제의 최소농도(Spec-80% 및 Spec-50%)로 각각 판정하였다.

결과: SBM법에 의한 fluconazole 감수성 검사를 Spec-80%를 기준으로 판정하였을 때, 전체 균주의 NCCLS macrodilution법과의 2배 희석 배수내 일치율은 24시간과 48시간 배양 후 각각 92.4% (220/238)와 78.6% (198/252)이었고, Spec-50%를 기준으로 판정했을 때는 각각 97.9% (233/238)와 98.8% (249/252)로서 일치율이 더 증가하였다($P<0.01$). 특히 *C. albicans*의 경우 다른 칸디다 균종에 비해 48시간 배양 후 NCCLS macrodilution법과의 일치율은 Spec-50% (97.9%)를 기준으로 판정했을 때 Spec 80% (75.0%)에 비해 증가하였고($P<0.01$), *C. tropicalis*의 경우도 57.1%에서 100%로 증가하였다($P<0.01$).

결론: SBM법을 이용하여 칸디다의 fluconazole 감수성 검사를 시행함에 있어 특히 *C. albicans*와 *C. tropicalis* 경우 Spec-50%를 기준으로 MIC를 판정하는 것이 Spec-80%에 비해 더 정확한 방법으로 생각되었다.

참고문헌

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-T. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.* 1995.
2. 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, Wayne, Pa.* 1997.
3. Rex JH, Pfaller MA, Rinaldi MG, Polak A, Galgiani JN. *Antifungal susceptibility testing. Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 367-81.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 신중희, 김민, 김종필, 서순팔, 양동욱. 한천희석법을 이용한 *Candida Species*의 Fluconazole 내성 선별. *대한화학요법학회지* 1999; 17: 199-210.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Rodriguez-Tudela JL and Martinez-Suarez JV. Improved medium for fluconazole susceptibility testing of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 45-8.