

Evaluation of VITEK-2 Antifungal Susceptibility Test (AST-YS01) for *Candida* Species Isolates in Korea

Da-Woon Kim, Jong Hee Shin, Seung Jung Kee, Soo-Hyun Kim,
Myung Geun Shin, Soon Pal Suh, Dong Wook Ryang

Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Background: VITEK-2 yeast susceptibility test (AST-YS01; bioMerieux, Hazelwood, MO, USA) has recently been introduced as a fully automated commercial antifungal susceptibility test system that determines MIC (minimum inhibitory concentrations) endpoints spectrophotometrically, thereby eliminating subjective errors. We compared the VITEK-2 system with the CLSI (the Clinical and Laboratory Standards Institute) M27 method for susceptibility testing of *Candida* isolates from Korea.

Methods: A total of 175 *Candida* bloodstream isolates were collected from two hospitals during a 18-month period. We compared the MIC results for amphotericin B, fluconazole and voriconazole obtained with the VITEK-2 system to those obtained by the CLSI M27 broth microdilution method after 24-hr and 48-hr incubation.

Results: VITEK-2 system MIC endpoints for 175 isolates were determined after 11.75 to 35.50 hr of incubation (mean, 16.3±4.8 hr). The essential agreement (within 2 dilutions) between amphotericin B, flu-

conazole and voriconazole MICs obtained by the VITEK-2 system and CLSI method was 98.3%, 90.9% and 96.0%, respectively, at 24-hr incubation and 100%, 92.6% and 94.9%, at 48-hr incubation. The categorical discrepancy for fluconazole was 6.3% (major error, 2.9% and minor error, 3.4%) at 24-hr and 6.3% (major error, 2.3% and minor error, 4.0%) at 48-hr. The categorical discrepancy for voriconazole was 1.7% (major error, 1.1% and minor error, 0.6%) at both 24-hr and 48-hr. There were no very major errors for fluconazole and voriconazole.

Conclusion: The VITEK-2 antifungal susceptibility test system appears to be rapid and highly correlative with the CLSI method, suggesting that this system can be effective for antifungal susceptibility testing for *Candida* species in the clinical laboratory. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:122-128)

Key Words: *Candida*, VITEK-2, Antifungal susceptibility, CLSI

서 론

최근 중증 칸디다 감염의 발생빈도가 증가함에 따라 칸디다에 대한 생체의 항진균제 감수성 검사의 필요성이 증가하고 있다[1]. 칸디다 균주에 대한 표준화된 항진균제 감수성 검사법으로는 CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) M27법이 잘 알려져 있고, 이 방법에는 주요 항진균제의 임상적 치료결과를 예측하기 위한 MIC (minimum inhibitory concentrations) breakpoint가 제시되어 있다[2]. 그러나, CLSI M27법에 의한 감수성 검사를 시행하기 위해서는 48시간의 배양이 필요하고, 균 증식의 억제지점을 육안으로 판정하여야 하므로 검사자의 숙련도에 따른 주관적인 오류가 발생할 수 있다[3-5].

따라서 임상검사실에서 쉽게 이용할 수 있는 간단하고 자동화가 가능한 항진균제 감수성 검사가 요구되고 있다.

최근 자동화된 VITEK-2 시스템을 이용하여 칸디다균의 항진균제 감수성 검사를 실시하는 제품인 AST-YS01 (bioMerieux, Hazelwood, MO, USA)이 소개되었다. VITEK-2 시스템을 이용한 항진균제 감수성 검사는 분광광도계를 이용하여 판독을 실시함으로써 끝림 효과를 최소화한 제품으로, 외국의 다기관 연구에 의하면 재현성이 좋고 CLSI M27법과의 일치율이 매우 높다고 보고되었다[6,7]. 그러나 국내에서 분리된 칸디다 균주를 이용하여 이를 평가한 성적은 아직 보고된 바 없다. 본 연구에서는 최근 국내 두 곳의 병원에서 분리된 칸디다 175주를 대상으로 AST-YS01를 이용하여 amphotericin B, fluconazole 및 voriconazole에 대한 감수성 검사를 실시하고 표준법인 CLSI M27법과 비교함으로써 VITEK-2를 이용한 항진균제 감수성 검사를 평가하고자 하였다.

Received 20 April, 2009, Revised 5 June, 2009

Accepted 15 July, 2009

Correspondence: Jong Hee Shin, Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Medical School, 671, Jebong-ro, Dong-gu, Gwangju 501-757, Korea. (Tel) 82-62-220-5342, (Fax) 82-62-224-2518, (E-mail) shinjh@chonnam.ac.kr

대상 및 방법

1. 대상 균주

2006년 7월부터 2007년 12월 사이에 전남대학교병원 및 화순전남대학교병원 환자의 혈액배양에서 분리되어 균주가 보관되었던 총 175주의 칸디다균을 대상으로 검사하였다. 대상 균주로는 *Candida albicans* 64주, *Candida parapsilosis* 50주, *Candida tropicalis* 32주, *Candida glabrata* 10주, *Candida guilliermondii* 6주, *Candida lipolytica* 3주, *Candida intermedia* 3주, *Candida lusitanae* 2주, *Candida famata* 2주, *Candida rugosa* 1주, *Candida pelliculosa* 1주 및 *Candida catenulata* 1주였다. 매 검사마다 항진균제 감수성 검사의 정도관리를 위해서 표준균주인 *C. parapsilosis* ATCC 22019 및 *C. krusei* ATCC 6258를 이용하였다.

2. 균접종액 준비

각 칸디다 균주는 Sabouraud dextrose agar (SDA)에서 35°C에서 48시간 동안 2차 배대배양 후 VITEK-2 system을 시행하기 위해 0.45% 식염수에 균을 풀어 잘 섞은 후 2.0 McFarland 탁도(bioMerieux DensiCheck instrument)로 균접종액을 준비하였고, CLSI M27-A2 액체배지 미량 희석법을 시행하기 위해 이를 다시 0.45% 식염수로 희석하여 0.5 McFarland 탁도(분광광도계, 530 nm)로 맞추었다.

3. VITEK-2 시스템을 이용한 항진균제 감수성 검사

VITEK-2 시스템에 의한 항진균제 감수성 검사는 제조사의 지침서에 따라 VITEK AST-YS01 (bioMerieux)을 이용하여 시행하였다. 균 농도를 2.0 McFarland 탁도로 맞춘 시험관을 카세트에 꽂은 후 AST-YS01 카드를 카세트에 장착시켜 VITEK-2 장비에 넣어 감수성 검사를 시행하였다. 균 부유액의 희석과 카드로의 주입, 트랜스퍼 튜브 셀링, 배양, 판독 등의 전 과정은 장비에서 컴퓨터 데이터베이스에 의해 자동으로 진행되고 조절되었다. 각 항진균제 감수성 검사 결과는 반응이 끝난 후 VITEK-2의 Advanced Expert System (AES) software version VT2-R03.01에 의해 자동 판독 후 출력되었다.

4. CLSI 액체배지 미량희석(broth microdilution, BMD)법

CLSI M27-A2의 지침에 따라 액체배지 미량희석법으로 시행하였다[2]. 항진균제는 amphotericin B (Sigma, Saint Louis, MO, USA), fluconazole (Pfizer, Inc., New York, NY, USA) 및 voriconazole (Pfizer Global Research & Development, Sandwich, UK)을 사용하였다. 35°C에서 24 및 48시간 동안 배양한 후 amphotericin B MIC는 육안으로 관찰하여 균의 증식이 완전히 억제된 well의 최소 항진균제 농도로 판정하였고, fluconazole과 voriconazole은 균성장이 50% 억제된 well의 최소 항진균제 농도로 판정하였다[8].

5. 결과 해석

CLSI법과 VITEK-2의 두 가지 항진균제 감수성 검사법에 의한 검사 일치율(essential agreement)은 두 검사의 MIC의 차이가 2배 희석 배수 이내에 있을 때 결과가 일치하는 것으로 판정하였다. 감수성 결과 판정은 CLSI 기준에 따라 fluconazole MIC가 8 ug/mL 이하인 경우는 감수성, 16~32 g/mL인 경우는 약용량 의존 감수성(dose dependent susceptible, SDD), 그리고 64 g/mL 이상인 경우는 내성으로 판정하였으며[2], voriconazole에 대해서는 MIC가 1 g/mL 이하인 경우는 감수성, 2 g/mL인 경우는 약용량 의존 감수성, 그리고 4 g/mL 이상인 경우는 내성으로 간주하였다[9]. 두 검사의 감수성/내성 범주간 일치율(categorical agreement)을 분석하였으며 불일치한 경우는 다음과 같이 구분하였다. 즉, very major error는 CLSI법으로는 내성을 보였으나 VITEK-2로는 감수성을 보인 경우로, major error는 그 반대인 경우, minor error는 한 방법에서 내성 혹은 감수성 결과를 보였으나 다른 방법에서는 중등도 내성을 보인 경우로 하여 구분하였다. CLSI 기준에 따라 VITEK-2 시스템 결과와 CLSI법의 감수성 결과를 비교하여 감수성/내성 범주가 불일치한 균주에 대해서는 VITEK 2 AST-YS01을 이용하여 2번 재검을 실시하였다. 한편, amphotericin B의 경우는 CLSI법과 VITEK-2 결과, MIC의 차이가 3배 희석 배수 이상 차이를 보였을 때(불일치한 경우) E test를 추가적으로 시행하였다[10].

결 과

총 175주를 VITEK-2 시스템에서 항진균제 감수성 검사를 실시한 결과, 평균 16.3±4.8시간(11.75~35.50시간) 배양 후 판독되었다. 균종별로 평균 판독시간을 살펴보면 *C. albicans* 13.7±1.3시간, *C. parapsilosis* 19.0±4.4시간, *C. tropicalis* 13.6±2.3시간, *C. glabrata* 20.5±8.7시간, *C. guilliermondii* 19.7±2.9시간, 그 외 13주는 21.3±6.6시간이 소요되었다. 전체 칸디다균종의 VITEK-2에 의한 amphotericin B, fluconazole 및 voriconazole 성적의 24시간 CLSI법과의 2배 희석배수내 일치율은 각각 98.3%, 90.9% 및 96.0%였고, 48시간 CLSI법과의 일치율은 각각 100%, 92.6% 및 94.9%였다(Table 1). 특히 VITEK-2 시스템을 이용한 amphotericin B MIC는 *C. parapsilosis* 2주를 제외한 나머지 모든 균주에서는 24시간 및 48시간 CLSI법과 100%의 일치율을 보였다. 두 방법에 의한 결과가 불일치한 *C. parapsilosis* 2주는 VITEK-2에 의해 amphotericin B MIC가 둘 다 4 ug/mL이었으나, 24시간 CLSI법에서는 각각 0.25 및 0.5 ug/mL, 그리고 48시간 CLSI법에서는 둘 다 1 ug/mL이었다.

Table 1. In vitro susceptibilities of 175 isolates of *Candida* spp. to amphotericin B, fluconazole and voriconazole as determined with the VITEK-2 system and by CLSI BMD methods

Species (no. of isolates tested)	Antifungal agent	Test method*	MIC (ug/mL)			EA (%) [†]
			Range	50%	90%	
<i>C. albicans</i> (64)	Amphotericin B	VITEK-2	≤0.25 ~ 1	0.5	1	
	Amphotericin B	CLSI-24	0.125 ~ 1	0.25	0.5	100.0
	Amphotericin B	CLSI-48	0.125 ~ 1	0.5	0.5	100.0
	Fluconazole	VITEK-2	≤1 ~ ≥64	≤1	8	
	Fluconazole	CLSI-24	0.125 ~ 0.5	0.125	0.25	85.9
	Fluconazole	CLSI-48	0.125 ~ 0.5	0.125	0.25	85.9
	Voriconazole	VITEK-2	≤0.12 ~ 1	≤0.12	≤0.125	
	Voriconazole	CLSI-24	≤0.03	≤0.03	≤0.03	95.3
	Voriconazole	CLSI-48	≤0.03	≤0.03	≤0.03	95.3
<i>C. parapsilosis</i> (50)	Amphotericin B	VITEK-2	≤0.25 ~ 4	0.5	1	
	Amphotericin B	CLSI-24	0.125 ~ 0.5	0.25	0.5	94.0
	Amphotericin B	CLSI-48	0.25 ~ 1	0.5	1	100.0
	Fluconazole	VITEK-2	≤1 ~ ≥64	≤1	≤1	
	Fluconazole	CLSI-24	0.125 ~ 2	0.5	1	98.0
	Fluconazole	CLSI-48	0.25 ~ 4	0.5	2	98.0
	Voriconazole	VITEK-2	≤0.125	≤0.125	≤0.125	
	Voriconazole	CLSI-24	≤0.03	≤0.03	≤0.03	100.0
	Voriconazole	CLSI-48	≤0.03 ~ 0.25	≤0.03	0.06	100.0
<i>C. tropicalis</i> (32)	Amphotericin B	VITEK-2	≤0.25 ~ 1	0.5	0.5	
	Amphotericin B	CLSI-24	0.25 ~ 0.5	0.5	0.5	100.0
	Amphotericin B	CLSI-48	0.5 ~ 1	0.5	0.5	100.0
	Fluconazole	VITEK-2	≤1 ~ ≥64	≤1	2	
	Fluconazole	CLSI-24	0.125 ~ 1	0.25	0.5	93.8
	Fluconazole	CLSI-48	0.125 ~ 4	0.5	1	93.8
	Voriconazole	VITEK-2	≤0.125 ~ ≥8	≤0.125	≤0.125	
	Voriconazole	CLSI-24	≤0.03	≤0.03	≤0.03	93.8
	Voriconazole	CLSI-48	≤0.03 ~ 0.25	0.06	0.125	93.8
<i>C. glabrata</i> (10)	Amphotericin B	VITEK-2	≤0.25 ~ 1	0.5	1	
	Amphotericin B	CLSI-24	0.125 ~ 0.5	0.5	0.5	100.0
	Amphotericin B	CLSI-48	0.125 ~ 1	0.5	0.5	100.0
	Fluconazole	VITEK-2	2 ~ ≥64	8	16	
	Fluconazole	CLSI-24	2 ~ 64	4	8	80.0
	Fluconazole	CLSI-48	4 ~ ≥64	16	16	90.0
	Voriconazole	VITEK-2	≤0.125 ~ ≥8	≤0.125	2	
	Voriconazole	CLSI-24	0.06 ~ 2	0.125	0.25	80.0
	Voriconazole	CLSI-48	0.125 ~ 2	0.5	1	60.0
<i>C. guilliermondii</i> (6)	Amphotericin B	VITEK-2	≤0.25 ~ 0.5	≤0.25		
	Amphotericin B	CLSI-24	0.125 ~ 0.25	0.25		100.0
	Amphotericin B	CLSI-48	0.25 ~ 0.5	0.25		100.0
	Fluconazole	VITEK-2	2 ~ ≥64	2		
	Fluconazole	CLSI-24	1 ~ 8	2		83.3
	Fluconazole	CLSI-48	2 ~ 32	4		100.0
	Voriconazole	VITEK-2	≤0.125 ~ 0.5	≤0.125		
	Voriconazole	CLSI-24	≤0.03 ~ 0.06	≤0.03		100.0
	Voriconazole	CLSI-48	0.06 ~ 0.25	0.125		100.0
Other (13)	Amphotericin B	VITEK-2	≤0.25 ~ 1	≤0.25	1	
	Amphotericin B	CLSI-24	0.125 ~ 0.5	0.25	0.5	100.0
	Amphotericin B	CLSI-48	0.25 ~ 1	0.5	1	100.0
	Fluconazole	VITEK-2	≤1 ~ 8	2	4	
	Fluconazole	CLSI-24	0.125 ~ 4	0.5	2	92.3
	Fluconazole	CLSI-48	0.125 ~ 8	1	4	100.0
	Voriconazole	VITEK-2	≤0.125 ~ 0.25	≤0.125	0.25	
	Voriconazole	CLSI-24	≤0.03 ~ 0.125	≤0.03	0.125	100.0
	Voriconazole	CLSI-48	≤0.03 ~ 0.125	≤0.03	0.125	100.0
All <i>Candida</i> spp. (175)	Amphotericin B	VITEK-2	≤0.25 ~ 4	0.5	1	
	Amphotericin B	CLSI-24	0.125 ~ 1	0.25	0.5	98.3
	Amphotericin B	CLSI-48	0.125 ~ 1	0.5	1	100.0
	Fluconazole	VITEK-2	≤1 ~ ≥64	1	8	
	Fluconazole	CLSI-24	0.125 ~ 64	0.25	2	90.9
	Fluconazole	CLSI-48	0.125 ~ ≥64	0.5	4	92.6
	Voriconazole	VITEK-2	≤0.125 ~ ≥8	≤0.125	≤0.125	
	Voriconazole	CLSI-24	≤0.03 ~ 2	≤0.03	≤0.03	96.0
	Voriconazole	CLSI-48	≤0.03 ~ 2	≤0.03	0.125	94.9

*CLSI-24 and CLSI-48, CLSI incubation for 24 hr and 48 hr, respectively; [†]EA (Essential agreement, ±2log₂ dilutions) between VITEK-2 and CLSI MICs.

이 균주를 VITEK-2로 재검한 결과, amphotericin B MIC는 둘 다 0.5 ug/mL이었고, Etest를 이용하여 검사하였을 때 amphotericin MIC가 둘 다 0.38 ug/mL이었다.

Table 2는 fluconazole 및 voriconazole의 감수성과 내성의 범주 관점에서 일치율을 나타낸 것이다. VITEK-2 fluconazole 감수성 검사의 범주 일치율은 24시간 및 48시간 CLSI법과 비교할 때 둘 다 93.7%, 그리고 voriconazole 검사는 둘 다 98.3%였

다. Fluconazole과 voriconazole에 대한 very major error는 한 주에서도 관찰되지 않았다. 칸디다 175주 중 fluconazole에 대한 major 및 minor error는 24시간 CLSI법과 비교할 때 각각 5주(2.9%) 및 6주(3.4%)에서, 48시간 CLSI법과 비교할 때 4주(2.3%) 및 7주(4.0%)에서 관찰되었다. Voriconazole에 대한 major 및 minor error는 각각 2주(1.1%) 및 1주(0.6%)에서 관찰되었다.

Table 2. Categorical agreement between the fluconazole and voriconazole MICs determined by VITEK-2 system and CLSI 24-hr and 48-hr BMD method for 175 isolates of *Candida* spp.

Species (no. of isolates tested)	Antifungal agent	Test method	% of MICs by category			CA (%)	% Errors		
			S	SDD	R		VME	ME	Minor
<i>C. albicans</i> (64)	Fluconazole	VITEK-2*	95.3	1.6	3.1				
	Fluconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	95.3	0.0	3.1	1.6
	Fluconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	95.3	0.0	3.1	1.6
	Voriconazole	VITEK-2	100.0	0.0	0.0				
	Voriconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Voriconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. parapsilosis</i> (50)	Fluconazole	VITEK-2	98.0	0.0	2.0				
	Fluconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	98.0	0.0	2.0	0.0
	Fluconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	98.0	0.0	2.0	0.0
	Voriconazole	VITEK-2	100.0	0.0	0.0				
	Voriconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Voriconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>C. tropicalis</i> (32)	Fluconazole	VITEK-2	93.8	3.1	3.1				
	Fluconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	93.8	0.0	3.1	3.1
	Fluconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	93.8	0.0	3.1	3.1
	Voriconazole	VITEK-2	96.9	0.0	3.1				
	Voriconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	96.9	0.0	3.1	0.0
	Voriconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	96.9	0.0	3.1	0.0
<i>C. glabrata</i> (10)	Fluconazole	VITEK-2	60.0	40.0	0.0				
	Fluconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	60.0	0.0	0.0	40.0
	Fluconazole	CLSI-48	40.0	60.0	0.0	60.0	0.0	0.0	40.0
	Voriconazole	VITEK-2	80.0	10.0	10.0				
	Voriconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	80.0	0.0	10.0	10.0
	Voriconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	80.0	0.0	10.0	10.0
<i>C. guilliermondii</i> (6)	Fluconazole	VITEK-2	83.3	0.0	16.7				
	Fluconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	83.3	0.0	16.7	0.0
	Fluconazole	CLSI-48	83.3	16.7	0.0	83.3	0.0	0.0	16.7
	Voriconazole	VITEK-2	100.0	0.0	0.0				
	Voriconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Voriconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
Other (13)	Fluconazole	VITEK-2	100.0	0.0	0.0				
	Fluconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Fluconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Voriconazole	VITEK-2	100.0	0.0	0.0				
	Voriconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
	Voriconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0
All <i>Candida</i> spp. (175)	Fluconazole	VITEK-2	93.7	3.4	2.9				
	Fluconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	93.7	0.0	2.9	3.4
	Fluconazole	CLSI-48	96.0	4.0	0.0	93.7	0.0	2.3	4.0
	Voriconazole	VITEK-2	98.3	0.6	1.1				
	Voriconazole	CLSI-24	100.0	0.0	0.0	98.3	0.0	1.1	0.6
	Voriconazole	CLSI-48	100.0	0.0	0.0	98.3	0.0	1.1	0.6

*Initial VITEK-2 data.

Abbreviations: S, susceptible; SDD, susceptible dose dependent; R, resistant; CA, categorical agreement; VME, very major error; ME, major error; Minor, minor error; CLSI-24 and CLSI-48, CLSI method read at 24 hr and 48 hr of incubation, respectively.

Table 3. Testing results for 14 *Candida* isolates showing a categorical disagreement of antifungal MIC results between VITEK-2 AST-YS01 and CLSI BMD method

Testing antifungals	Isolate No.	Species	CLSI		Initial VITEK test			Repeat VITEK test		
			MIC at 24-hr	MIC at 48-hr	MIC (ug/mL)	Category	Incubation (h)	MIC (ug/mL)	Category	Incubation (h)
Fluconazole	1	<i>C. albicans</i>	0.125 S	0.125 S	≥64	R	13.75	≤1	S	14.0
	2	<i>C. albicans</i>	0.25 S	0.25 S	≥64	R	15.0	≤1	S	12.75
	3	<i>C. parapsilosis</i>	0.5 S	1 S	≥64	R	35.25	≤1	S	18.0
	4	<i>C. tropicalis</i>	0.25 S	1 S	≥64	R	24.75	≤1	S	12.75
	5	<i>C. guilliermondii</i>	8 S	32 SDD	≥64	R	22.0	2	S	18.0
	6	<i>C. albicans</i>	0.125 S	0.25 S	16	SDD	13.25	4	S	12.75
	7	<i>C. tropicalis</i>	0.25 S	0.5 S	16	SDD	13.25	≤1	S	12.5
	8	<i>C. glabrata</i>	4 S	16 SDD	2	S	15.25	4	S	15.25
	9	<i>C. glabrata</i>	4 S	16 SDD	4	S	17.25	4	S	14.0
	10	<i>C. glabrata</i>	8 S	16 SDD	8	S	16.0	16	SDD	16.25
	11	<i>C. glabrata</i>	4 S	16 SDD	32	SDD	14.5	8	S	14.0
	12	<i>C. glabrata</i>	4 S	16 SDD	16	SDD	34.5	32	SDD	20.50
	13	<i>C. glabrata</i>	8 S	32 SDD	32	SDD	35.5	16	SDD	17.25
	14	<i>C. glabrata</i>	2 S	8 S	16	SDD	28.0	2	S	15.0
Voriconazole	4	<i>C. tropicalis</i>	≤0.125 S	0.06 S	≥8	R	24.75	≤0.125	S	12.75
	13	<i>C. glabrata</i>	≤0.125 S	1 S	≥8	R	35.5	1	S	17.25
	14	<i>C. glabrata</i>	0.25 S	0.25 S	2	SDD	28.0	≤0.125	S	15.0

VITEK-2 시스템 결과가 CLSI법과 감수성 및 내성의 판정 결과가 불일치한 14주에 대해 VITEK-2 시스템으로 재검을 실시한 결과는 Table 3과 같다. VITEK-2 시스템으로 재검한 결과를 처음 VITEK-2 결과와 비교하였을 때, *C. glabrata*가 아닌 칸디다 7주(균주 1~7)는 내성이거나 SDD이던 결과가 재검에 의해 모두 감수성으로 판정되어 CLSI 결과와 일치하였다. 특히 처음 VITEK-2 검사에서 major error가 관찰되었던 5주(1~5번 균주)에서 자동 판독을 하기까지의 배양시간은 13.25~35.25 시간이었으나, 재검하였을 때에는 12.75~18시간이 소요되었다. 반면, 처음 VITEK 2 검사에서 모두 minor error를 보였던 *C. glabrata* 7주(균주 8~14)를 재검한 결과, 4주에서는 처음과 동일한 범주의 결과를 보였고, 3주에서 감수성과 SDD 간의 차이를 보였다. 그러나, 7주의 *C. glabrata*의 fluconazole MIC는 모두 2회씩 배수 이내에서 일치한 결과였다. Voriconazole 감수성 검사에서 major error (내성)를 보인 2주와 minor error (SDD)를 보인 1주를 재검하였는데, 이 3주는 재검 결과 모두 voriconazole 감수성으로 판정되어 모두 24시간 및 48시간 CLSI법과 일치한 결과를 보였다.

전체적으로 VITEK-2의 재검한 결과를 포함할 때, VITEK-2의 fluconazole 감수성 검사의 24시간 및 48시간 CLSI법과의 일치율은 각각 97.1% 및 97.1%였고, voriconazole에 대한 24시간 및 48시간 CLSI법과의 일치율은 각각 99.4% 및 98.9%였다. 또한 감수성/내성의 범주일치율은 fluconazole에 대해 24시간 및 48시간 CLSI법과 비교하여 각각 98.3%와 97.7%였으며, voriconazole에 대해서는 모두 100%였다.

고 찰

최근 CLSI M27법을 대체하여 임상검사실에서 손쉽게 사용할 수 있는 상품화된 항진균제 감수성 검사 시스템이 소개되고 있다. 이 중 AST-YS01은 VITEK-2를 이용하여 칸디다균의 항진균제 감수성 검사를 완전 자동화한 최초의 시스템으로 재현성이 매우 높은 검사법으로 평가되었다[6,7]. 그러나 현재까지 AST-YS01에 대한 평가는 Pfaller 등[6,7]의 연구뿐으로 이에 대한 추가 연구가 필요하다. 특히 국내 병원 내 많은 검사실에서 VITEK-2 시스템을 이용하고 있음을 감안하면 이 검사는 국내 임상검사실에서 쉽게 이용할 수 있는 시스템으로 생각된다. 본 연구는 국내에서 분리된 칸디다균종을 대상으로 AST-YS01를 이용하여 amphotericin B, fluconazole 및 voriconazole에 대한 감수성 검사를 실시하고 항진균제 감수성 검사의 표준지침이 되는 CLSI BMD법과 비교하여 보았다.

본 연구에서 VITEK-2 AST-YS01에 의한 amphotericin B 감수성 검사의 24시간 및 48시간 CLSI법과의 일치율은 각각 98.3%와 100%로서 Pfaller 등[7]의 연구(각각 99.1%와 97%)와 비슷한 좋은 결과를 보였다. Pfaller 등[7]은 amphotericin B 결과에 대해 VITEK-2와 CLSI법과의 일치율만을 조사하였고 amphotericin B 내성검출에 좋다고 알려진 Etest 등[2,11] 다른 검사법을 이용한 확인 검사는 시도하지 않았다. 본 연구에서 *C. parapsilosis* 2주에서만 두 검사 성적 간의 불일치가 관찰되었는데, 이들은 둘 다 VITEK-2에서는 MIC가 4 ug/mL이었으나

CLSI법에서는 각각 0.25~1 ug/mL이었다. 이 균주에 대한 Etest[2,11]로 시행한 결과 amphotericin B MIC는 두 균주 모두 0.38 ug/mL로서 내성 균주가 아님을 확인할 수 있었고 VITEK-2 재검 결과도 0.5 ug/mL로서 VITEK-2에서 높은 amphotericin B MIC를 보이는 경우 재검을 요함을 알 수 있었다.

일반적으로 상품화된 감수성 검사를 평가할 때 CLSI법과 비교하여 검사 일치율 90% 이상, 범주 일치율 90% 이상, very major error 1.5% 이하 및 major error 3% 이하이면 항진균제 감수성 검사로 적합하다고 판정한다[12]. 본 연구에서 VITEK-2에 의한 fluconazole과 voriconazole 감수성 검사를 CLSI법과 비교하였을 때 검사 일치율(2회석 배수 이내) 및 범주 일치율은 모두 90% 이상이었다. 24시간 및 48시간 CLSI법과의 비교할 때 fluconazole에 대한 major error는 각각 2.9%와 2.3%였고, voriconazole에 대한 major error는 둘 다 모두 1.7%였으며 fluconazole과 voriconazole 모두 very major error는 없었다. 따라서 VITEK-2 시스템을 이용한 자동화된 항진균제 감수성 검사는 CLSI법을 대신하여 검사실에서 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

Pfaller 등[6]의 연구에서 fluconazole에 대한 감수성/내성 범주 일치율은 24시간 CLSI법과 비교하여 97.2%, 48시간 CLSI법과 비교하여 88.3%였는데, 본 연구에서는 24시간 및 48시간 CLSI법과 비교하였을 때 둘 다 93.7%였다. Pfaller 등[6]은 두 검사법 간에 결과가 일치하지 않은 균주를 분석한 결과, major error는 거의 없고 주로 minor error이며 주로 *C. glabrata*에서 관찰되었다고 하였다. 그들은 *C. glabrata* 균주의 fluconazole MIC가 48시간 배양 후 대부분 4~32 ug/mL 사이로서 fluconazole 감수성과 SDD 카테고리 부근에 모여 있기 때문에 이러한 에러가 나타난 것으로 해석하였다. 본 연구에서도 minor error를 보인 균주는 주로 *C. glabrata* (7주)로서 이들은 재검 후에도 여전히 minor error를 보였고 대부분 4~32 ug/mL 사이 범위였다.

본 연구에서 특이한 점은 Pfaller 등[6] 연구에서는 거의 관찰되지 않았던 fluconazole에 대한 major error가 5주에서 관찰되었다는 점이다. 이 균은 *C. albicans* 2주, *C. parapsilosis* 1주, *C. tropicalis* 1주 및 *C. guilliermondii* 1주였는데, 처음 내성으로 판정될 당시 배양시간은 13.25~35.25시간이었으나, 재검에서는 12.75~18시간이 소요되었고 모두 감수성으로 판정되었다. 따라서 이들 소수 균주에서 major error가 나타난 이유로 다음 두 가지가 추정되었다. 첫째, 본 연구에서는 2회의 계대배양 후 검사를 진행하였으나 냉동보관된 균주를 사용한 관계로 일부 균의 증식속도 등이 늦어서 VITEK-2 시스템에서의 배양시간이 길어지면서 내성으로 판독되었을 가능성, 둘째, 이들 균주를 검사할 때 분광광도계로 균의 농도를 맞추긴 하였으나, 실제 균집중액의 농도가 충분하지 않았을 기술적인 오류일 가능성이 있다. Voriconazole에 대해서도 VITEK-2 AST-YS01에서 SDD

및 내성으로 판독되어 CLSI법과 불일치한 결과를 보였던 3주(*C. glabrata* 2주, *C. tropicalis* 1주)에 대해 재검을 실시하였는데, 이 균주의 검사시간은 처음에는 각각 35.5~24.75시간으로 길었으나 재검 결과 17.25~12.75시간으로 검사시간이 단축되면서 모두 voriconazole 감수성 결과를 보였다.

Pfaller 등[6]은 10주의 칸디다를 이용하여 3개 기관에서 VITEK-2에 의한 fluconazole 감수성 검사의 재현성을 검사하였는데, 모두 3회석 배수 이내에서 일치하여 재현성이 매우 우수하다고 하였다. 그러나 본 연구에서 감수성 내성 범주가 불일치 결과를 보이는 14주를 대상으로 VITEK-2로 재검을 실시하였는데, 그 결과 *C. glabrata*가 아닌 칸디다에서 검사 재현성에 문제가 있을 수 있음을 관찰하였다. 즉, *C. glabrata* 7주는 MIC가 모두 2회석 배수 이내로 유사한 결과인 반면, *C. glabrata*가 아닌 칸디다 7주는 내성이나 SDD이던 결과가 재검에 의해 감수성으로 판정되어 CLSI 결과와 일치하였다. 재검한 결과까지를 포함하였을 때 VITEK-2 감수성 검사의 24시간 및 48시간 CLSI법과의 범주 일치율은 fluconazole의 경우 각각 98.3% 및 97.7%로 상승하였고 voriconazole의 경우 모두 100%가 되었다. 따라서 *C. glabrata*와 *C. krusei* 이외의 칸디다 균주에서 내성으로 판정된 경우 VITEK-2 감수성 검사에 소요된 배양시간이 본 연구에서 관찰된 각 균종별 평균 시간보다 많이 지연되었는지를 검토하고, 필요한 경우 재검을 시행해야 할 것으로 생각된다.

한편, 본 연구에서는 fluconazole 및 voriconazole에 대해 very major error를 관찰할 수 없었는데, 이는 대상 균주에 fluconazole 및 voriconazole 내성 균주가 거의 포함되지 않았기 때문일 가능성도 있다. 외국에 비교할 때 국내 임상 검체에서 분리된 칸디다 균주는 azole 내성을 보일 수 있는 *C. glabrata* 등의 균종이 상대적으로 적게 분리되는 특성이 있다[8,13]. 따라서 항진균제 내성 칸디다 균주를 다수 포함한 후속 연구가 필요하다고 생각되나, 본 연구에서는 국내 균주를 대상으로 한 VITEK-2 항진균제 감수성 검사를 시행했을 때 CLSI M27A법과의 일치율이 매우 높고, 평균 16시간 배양 후 판독이 될 수 있는 신속한 검사방법임을 확인할 수 있었다. 또한 국내에서는 항진균제 내성 균주가 매우 드물게 분리됨을 감안하여 내성을 보이는 균주에서는 재검과 확인이 필요함을 보여주었다.

참 고 문 헌

1. Shin JH. Antifungal drug susceptibility. Hanyang Med Rev 2006; 26:79-85.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard, Third ed., M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA 2008.
3. Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed, Washington DC; American Society for Microbiology;

- 2007;1972-86.
4. Pfaller MA and Yu WL. Antifungal susceptibility testing. New technology and clinical applications. Infect Dis Clin North Am 2001;15:1227-61.
 5. Pfaller MA. Antifungal susceptibility testing methods. Current Drug Targets 2005;6:929-43.
 6. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. J Clin Microbiol 2007;45:796-802.
 7. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK2 antifungal susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing amphotericin B, flucytosine, and voriconazole against *Candida* spp. J Clin Microbiol 2007;45:3522-8.
 8. Lee JS, Shin JH, Lee K, Kim MN, Shin BM, Uh Y, et al. Species distribution and susceptibility to azole antifungals of *Candida* bloodstream isolates from eight university hospitals in Korea. Yonsei Med J 2007;48:779-86.
 9. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, Espinel-Ingroff A, Johnson EM, Andes D, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. J Clin Microbiol 2006;44:819-26.
 10. Park JY, Shin JH, Uh Y, Kim EC, Kee SJ, Kim SH, et al. In vitro amphotericin B susceptibility of Korean bloodstream yeast isolates assessed by the CLSI broth microdilution method, Etest, and minimum fungicidal concentration test. Korean J Lab Med 2008;28:346-52.
 11. Antoniadou A, Torres HA, Lewis RE, Thornby J, Bodey GP, Tarrand JP, et al. Candidemia in a tertiary care cancer center: in vitro susceptibility and its association with outcome of initial antifungal therapy. Medicine (Baltimore) 2003;82:309-21.
 12. Food and Drug Administration. Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems; guidance for industry and FDA. Food and Drug Administration, Rockville, MD 2007.
 13. Kim SH, Shin JH, Kim EC, Lee K, Kim MN, Lee WG, et al. The relationship between antifungal usage and antifungal susceptibility in clinical isolates of *Candida*: a multicenter Korean study. Med Mycol 2009;47:296-304.

=국문초록=

국내 분리 칸디다균주에 대한 VITEK-2 항진균제 감수성 검사(AST-YS01)의 평가

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실
김다운, 신종희, 기승정, 김수현, 신명근, 서순팔, 양동욱

배경: 최근 VITEK-2 시스템에서 항진균제 감수성 검사를 실시하는 제품인 AST-YS01 (bioMerieux, Hazelwood, MO, USA)가 소개되었는데, 이는 자동화가 가능하고 분광광도계를 이용하여 MIC (minimum inhibitory concentrations) 판독을 실행함으로써 주관적 오류를 최소화한 제품이다. 저자들은 국내에서 분리된 칸디다 균주를 대상으로 VITEK-2 항진균제 감수성 검사를 실시하고 이 성적을 CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute)법과 비교 평가하여 보았다.

방법: 최근 18개월간 국내 두 곳의 병원 혈액배양에서 분리된 칸디다 175주(*C. albicans* 64주, *C. parapsilosis* 50주, *C. tropicalis* 32주 및 *C. glabrata* 10주, *C. guilliermondii* 6주 및 그 외 13주)를 대상으로 하였다. 각 균주는 VITEK-2를 이용하여 AST-YS01 항진균제 감수성 검사를 시행하고 동시에 CLSI M27법(액체배지 미량희석법)으로 amphotericin B, fluconazole, voriconazole에 대해 MIC (24시간 및 48시간 배양 후)를 검사하여 그 성적을 비교하였다.

결과: VITEK-2 시스템에서 175주의 감수성 결과는 11.75~35.50시간(평균 16.3±4.8시간) 배양 후 판독되었다. VITEK-2에 의한 amphotericin B, fluconazole 및 voriconazole 성적의 24시간 CLSI법과의 일치율(2회씩 배수 내)은 각각 98.3%, 90.9% 및 96.0%였고, 48시간 CLSI법과의 일치율은 각각 100%, 92.6% 및 94.9%였다. 24시간 및 48시간 CLSI법과 비교하여 fluconazole에 대한 감수성/내성의 범주오차는 각각 6.3% (major error 2.9%, minor error 3.4%) 및 6.3% (major error 2.3%, minor error 4.0%)였고, voriconazole에 대한 범주오차는 24시간 및 48시간 모두 1.7% (major error 1.1%, minor error 0.6%)였다. Fluconazole과 voriconazole 모두 very major error는 없었다.

결론: VITEK-2 시스템을 이용한 자동화된 항진균제 감수성 검사는 신속하게 결과를 얻을 수 있으며 CLSI 표준방법과 일치율이 매우 높아 일반검사실에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. [대한임상미생물학회지 2009;12:122-128]

교신저자 : 신종희, 501-757, 광주시 동구 제봉로 671
전남대학교병원 진단검사의학과
Tel: 062-220-5342, Fax: 062-224-2518
E-mail: shinjh@chonnam.ac.kr