

유세포 분석에 의한 각종 칸디다 균종의 Rhodamine 6G 축적 분석

문창진 · 신종희 · 김다운 · 기승정 · 김수현 · 신명근 · 서순팔 · 양동욱

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실

Species-Specific Differences in Rhodamine 6G Accumulation of *Candida* Isolates Detected by Flow Cytometric Analysis

Chang Jin Moon, M.D., Jong Hee Shin, M.D., Da Woon Kim, M.D., Seung Jung Kee, M.D., Soo Hyun Kim, M.D.,
Myung Geun Shin, M.D., Soon Pal Suh, M.D., and Dong Wook Ryang, M.D.

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

Background : Fluorescent dye Rhodamine 6G (R6G) is a substrate of multidrug resistance pumps and its accumulation is reduced in some azole-resistant *Candida* isolates with the upregulation of multidrug efflux transporter genes. Despite reports on species-specific differences in azole susceptibility in various *Candida* species, only a few studies have been reported on the R6G accumulation among clinical isolates of *Candida* species. In this study, we compared R6G accumulation between six different *Candida* species.

Methods : The intracellular accumulation of R6G and minimal inhibitory concentrations (MICs) of three triazole agents were investigated in 48 strains of six *Candida* species (14 *C. albicans*, 9 *C. tropicalis*, 8 *C. glabrata*, 8 *C. krusei*, 7 *C. parapsilosis*, and 2 *C. haemulonii*). R6G accumulation was measured by using flow cytometry and the geometric mean of the fluorescence intensity (GMF) was used to compare the accumulation between the *Candida* isolates.

Results : The GMF values for the *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, and *C. glabrata* isolates were 167.3 ± 18.5 , 126.9 ± 6.6 , 88.5 ± 18.5 , 50.8 ± 7.0 , and 38.1 ± 3.9 , respectively. *C. glabrata* had a significantly lower mean GMF than all the other *Candida* species ($P < 0.05$). While some *Candida* strains with trailing growth phenomenon and increased fluconazole MIC did not have a reduced GMF, three *Candida* strains with increased MICs to all three triazole agents had a reduced GMF.

Conclusions : This study found species-specific differences in R6G accumulation in *Candida*. In addition, the intracellular R6G accumulation can be used to investigate the drug efflux mechanism in azole-resistant *Candida* strains. (*Korean J Lab Med* 2009;29:127-34)

Key Words : *Candida*, Flow cytometry, Rhodamine 6G, Azole resistance, Mechanism

서론

Received : November 12, 2008
Revision received : January 20, 2009
Accepted : January 20, 2009

Corresponding author : Jong Hee Shin, M.D.

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

Manuscript No : KJLM2196

최근 항암치료 또는 집중치료를 받는 중증 환자의 수가 증가하면서 칸디다에 의한 기회 감염이 증가하고 있고, 이에 의한 사망률 또한 증가하는 추세이다[1]. 칸디다 감염 치료를 위한 여러 항진균제가 개발되어 사용되고 있으며, 이 중 비교적 부작용이 적은 fluconazole은 1990년 이후 널리 사용되고 있다. Fluconazole 도입 후 칸디다의 azole 항진균제에 대한 내성이 임상

적 문제로서 부각되고 있고, 최근 이러한 칸디다 균종의 항진균제 내성 기전에 대해서 많은 연구가 시행되고 있다[2, 3].

Azole 항진균제 치료 후에 azole 내성을 획득한 칸디다 균주는 azole 감수성 균주에 비해 세포내 충분한 양의 약물이 축적되지 않음이 자주 보고되고 있다[3-5]. 이러한 현상은 다약제 유출수송 유전자의 과발현과 연관되어 약물이 다약제 내성 펌프를 통해 균 밖으로 배출됨으로써 나타나게 된다[2, 3]. Rhodamine 6G (R6G)는 칸디다 균에서 fluconazole과 동일하게 막 수송단백에 의해 운반되는 형광물질로서, 칸디다의 다약제 내성펌프를 통해 균 밖으로 배출되는 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 azole 내성을 획득한 칸디다 균주 중 유출펌프 유전자 과발현을 보이는 균주에서 R6G의 세포내 축적이 감소됨이 밝혀졌다[7-9]. 현재까지 세포내 R6G 축적 검사는 소수의 azole 내성 균주(*Candida albicans*, *Candida glabrata* 및 *Candida tropicalis*)에서 시행되었는데 이는 주로 azole 내성 획득 전후의 동일클론 균주에서 다약제 내성 펌프를 통한 azole의 유출 기전을 증명하는 연구이었다[7-10].

최근 azole 항진균제의 사용이 증가함에 따라 이에 대해 내성을 획득한 칸디다 균주의 출현이 우려되고 있는데, 내성 칸디다 균주에서 세포내 R6G 축적 검사는 검사실에서 간단하게 azole 항진균제 내성과 내성 기전을 증명할 수 있는 검사가 될 수 있을 것으로 생각된다. 국내에서도 유세포 분석을 이용한 미생물의 분석 연구가 진행된 바 있는데[11, 12], 칸디다 균주의 세포내 R6G 축적 정도를 분석한 연구는 아직 없다. 칸디다는 균종에 따라 azole 항진균제에 대한 감수성 정도가 서로 다르므로 세포내 R6G 축적 정도도 균종 간에 차이가 있을 수 있다. 본 연구에서는 각종 표준 균주 및 임상 검체에서 분리된 칸디다 균주를 대상으로 세포내 R6G 축적 정도를 측정하여 칸디다 균종 간에 R6G 축적에 있어 차이가 있는지를 알아보고, 동일 균종 내 균주 간에 세 가지 azole 항진균제에 대해 감수성 검사 성적과 세포내 R6G 축적 정도를 비교 분석하였다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

대상 칸디다는 총 48주로서 각종 임상 검체(혈액 32주, 요 4주, 농 2주, 복막액 1주, 기관지 흡인액 1주)에서 분리된 40주와 ATCC 표준 균주 8주이었다. 임상 검체에서 분리된 균주는 균종별로 *C. albicans* 12주, *C. tropicalis* 9주, *C. glabrata* 7주, *Candida krusei* 6주, *Candida parapsilosis* 5주 및 *Candida*

haemulonii 1주 등이었다. 대상 표준 ATCC 균주는 *C. albicans* 2주(*C. albicans* ATCC 90028 및 *C. albicans* ATCC 64550), *C. parapsilosis* 2주(*C. parapsilosis* ATCC 22019 및 *C. parapsilosis* ATCC 90018), *C. krusei* 2주(*C. krusei* ATCC 6258 및 *C. krusei* ATCC14243), *C. glabrata* 1주(*C. glabrata* ATCC 90030) 및 *C. haemulonii* 1주(*C. haemulonii* ATCC 22991)였다.

2. 방법

1) 항진균제 감수성 검사

Fluconazole, itraconazole 및 voriconazole에 대하여 CLSI 지침에 따라 M27-A2 broth microdilution법으로 시행하였다[13, 14].

2) 세포내 R6G 축적 분석

Yeast extract-peptone-dextrose complex medium (YE-PD, Becton, Dickinson and company, Sparks, MD, USA) 배지는 분말 50 g을 멸균증류수 1,000 mL에 녹여 만들었다. R6G 용액은 Rhodamine 6G (Sigma, Steinheim, Germany) 0.05 g에 dimethyl sulfoxide 100 μ L를 첨가하여 만들었다. 균주는 Sabouraud dextrose 배지에 35°C에 48시간 배양하여 YEPD broth 12 mL에 풀어서 16시간 배양한 후, 세척하였다. Phosphate buffered saline (PBS) 900 μ L에 균액을 100 μ L씩 첨가하여 600 nm에서 흡광도를 측정한 후 세포수를 1×10^7 cells/mL로 맞추었다. 35°C에서 2시간 동안 흔들면서 배양한 후 R6G 용액을 0.2 μ g/mL씩 첨가하고 35°C에서 4시간 동안 흔들면서 배양하였다[4, 6].

실온의 PBS 900 mL에 균액을 10-50 μ L 첨가한 후 곧바로 FACScan flow cytometer (BD biosciences, San Jose, CA, USA)를 통해 488 nm에서 FL-2 filter를 이용하여 각각의 균주에 대하여 10,000개의 세포의 형광을 측정하였고 CellQuest software (Becton, Dickinson and company, Sparks, MD, USA)를 이용하여 분석하였다. 각 칸디다 균주의 R6G 축적 정도는 평균형광강도(geometric mean of fluorescence intensity, GMF)를 측정하여 비교하였는데, 각 균주당 적어도 3번의 검사를 시행하였고, 정도관리를 위하여 검사마다 *C. albicans* ATCC 90028과 *C. haemulonii* ATCC 22991를 동시에 측정하였다 (Fig. 1).

3) *C. glabrata*의 다약제 유출펌프 유전자 발현검사

본 실험 대상 중 *C. glabrata* 8주에 대해 R6G 축적과 *CgCDR1*

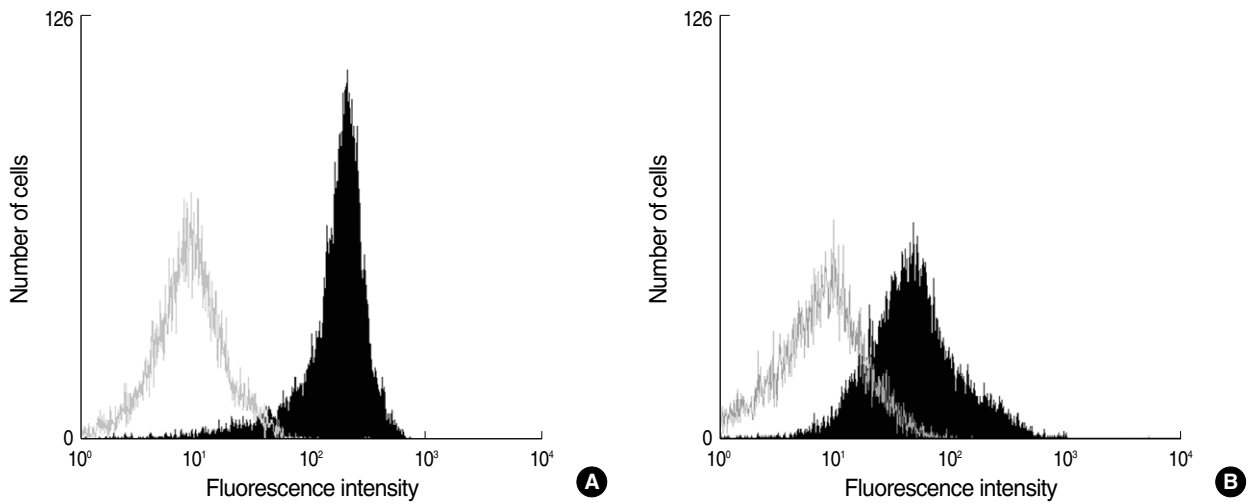


Fig. 1. Representative histograms of rhodamine 6G accumulation obtained by flow cytometric analysis for (A) *Candida albicans* ATCC 90028, and (B) *Candida haemulonii* ATCC 22991. Histograms are given for cells incubated with rhodamine 6G for 4 hr (black area) and unlabeled controls (grey line).

및 *CgCDR2* 유전자 발현정도를 서로 비교하여 보았다. *CgCDR1* 과 *CgCDR2* 유전자의 발현정도는 이전의 연구에서 사용된 방법을 이용하여[15] ROTOR Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia)을 통한 실시간 역전사효소-중합효소연쇄반응으로 측정하였다. 시발체와 형광 탐색자 또한 이전의 연구에서 각각 사용되었던 것을 이용하였다[15, 16]. 각 유전자의 농도는 Corbett Research software의 표준 곡선을 이용하여 표적 유전자(*CgCDR1* 및 *CgCDR2*)와 housekeeping 유전자(*CgURA3*)의 비로 나타내었고 각 실험을 세 번씩 반복하여 평균을 구하였다. 각 균주의 상대적 유전자 발현정도는 *C. glabrata* ATCC 90030 균주의 결과의 평균값에 대한 비율로 표시하였다[15, 16].

4) 통계 방법

자료의 분석은 각 칸디다 균종의 GMF의 평균값을 비교 분석하였다. 통계처리에는 SPSS Win 10.0 프로그램(SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 하나의 칸디다 균종과 그 균종을 제외한 나머지 균종들 사이의 GMF 평균 비교는 Student's *t*-test를 이용하였고, 각 칸디다 균종들의 GMF 평균 비교는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 평균치 비교검정을 시행하였다.

결 과

1. 칸디다 균종의 항진균제 감수성검사와 세포내 R6G 축적의 비교

칸디다 표준 균주들의 세포내 R6G 축적 검사결과 Table 1

Table 1. Intracellular accumulation of Rhodamine 6G (R6G) in *Candida* ATCC strains

| ATCC strain | Azole MIC (μ g/mL) at 48 hr | | | R6G accumulation (GMF) |
|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|--------------|------------------------|
| | Fluconazole | Itraconazole | Voriconazole | |
| <i>C. albicans</i> ATCC 90028 | 0.5 | 0.125 | 0.03 | 160.4 |
| <i>C. albicans</i> ATCC 64550 | 16 | 0.5 | 0.25 | 92.2 |
| <i>C. glabrata</i> ATCC 90030 | 16 | 1 | 0.5 | 58.0 |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019 | 4 | 0.25 | 0.06 | 60.0 |
| <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018 | 0.5 | 0.06 | 0.03 | 87.7 |
| <i>C. krusei</i> ATCC 6258 | 32 | 0.5 | 0.5 | 194.2 |
| <i>C. krusei</i> ATCC 14243 | 8 | 0.03 | 0.06 | 200.5 |
| <i>C. haemulonii</i> ATCC 22991 | 0.25 | 0.03 | 0.06 | 30.0 |

Abbreviations: MIC, minimal inhibitory concentration; GMF, geometric mean of the fluorescence intensity.

과 같다. 두 주의 *C. krusei* (ATCC 6258 및 14243)의 GMF가 각각 194.2 및 200.5로 가장 높았고, *C. haemulonii* ATCC 22991 균주가 30.0으로서 가장 낮았다. *C. albicans* ATCC 90028은 세 가지 azole 항진균제에 전형적인 감수성 양상을 보이는 균주로서 GMF가 160.4이었다. 반면, *C. albicans* ATCC 64550은 *C. albicans* ATCC 90028 균주에 비해 fluconazole, itraconazole 및 voriconazole에 대한 minimal inhibitory concentration (MIC)가 모두 3-4배 증가되어 있었고, GMF가 92.2로서 *C. albicans* ATCC 90028 균주에 비해 세포내 R6G 축적이 감소되어 있었다.

임상 검체에서 분리된 칸디다 40주의 균종별 세포내 R6G 축적 검사 성적은 Fig. 2와 같다. 칸디다의 각 균종 간의 GMF 수치는 Kruskal-Wallis 검사에 의해 통계적으로 서로 유의한 차

이를 보였다($P=0.000$). 임상 균주에서 세포내 R6G 축적을 측정하여 얻은 GMF 값은 *C. tropicalis* (167.3 ± 18.5), *C. albicans* (126.9 ± 6.6), *C. krusei* (88.5 ± 18.5), *C. parapsilosis* (50.8 ± 7.0) 및 *C. glabrata* (38.1 ± 3.9) 순이었다. 각 균종을 나머지 다른 모든 칸디다 균종과 세포내 R6G 축적 정도를 비교하였을 때 *C. tropicalis*의 GMF 평균이 다른 균종에 비해 유의하게 높았고($P<0.05$), *C. glabrata* 및 *C. parapsilosis*는 각각 다른 균종에 비해 유의하게 낮았다($P<0.05$).

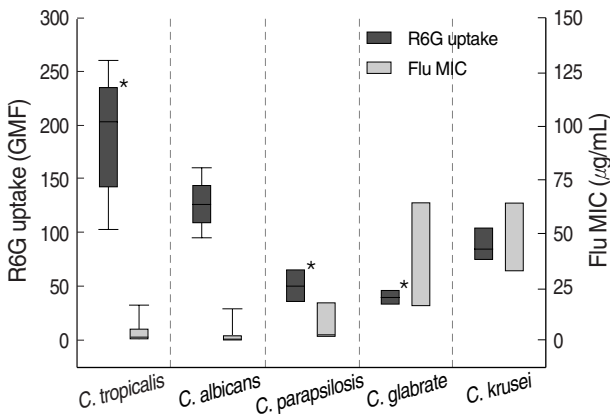


Fig. 2. Comparison of mean of rhodamine 6G GMF among clinical isolates of different *Candida* species.

* $P<0.05$, significant difference between a *Candida* species and all other *Candida* species by Student's *t*-test.

Abbreviations: GMF, geometric mean of the fluorescence intensity; Flu MIC, MIC of fluconazole.

2. Trailing 성장 혹은 azole 감수성 저하를 보이는 균주

Trailing 성장이 관찰된 *C. albicans* 2주와 *C. tropicalis* 3주 중 1주를 제외하고는 GMF가 각 균종의 GMF 평균값보다 더 높은 수치를 보였다. *C. albicans* 1주(3번)와 *C. tropicalis* 1주(7번)는 itraconazole과 voriconazole에 감수성이지만 fluconazole에는 약용량 의존성 감수성을 보였는데, 이 균주들의 GMF 값은 각 균종의 평균치보다 더 높게 관찰되었다. 한편 *C. parapsilosis* 균주의 GMF 평균값은 50.8이었는데, fluconazole에 약용량 의존성 감수성을 보인 *C. parapsilosis* 1주(11번)의 GMF 값은 32.6이었다. 또 *C. glabrata* 균주의 균주의 GMF 평균값은 38.1이었는데, fluconazole과 itraconazole에 내성을 보이고 voriconazole에 대해서도 내성 혹은 약용량 의존성 감수성을 보인 *C. glabrata* 3주 중 2주(8번과 10번)의 GMF가 각각 33.2와 22.7이었다(Table 2).

3. *C. glabrata* 균종의 다약제 유출펌프 유전자 발현과 세포내 R6G 축적의 비교

임상검체로부터 분리된 *C. glabrata* 7주의 *CgCDR1* 및 *Cg-CDR2* 유전자의 상대적 발현정도는 Table 3과 같다. Fluconazole에 감수성 또는 약용량 의존 감수성을 보이는 4주(12-15번)에서는 *CgCDR1*의 상대적 발현정도가 0.48-0.83이고 GMF는 29.1-46.5인데 비해, fluconazole에 내성을 보이는 3주(8-10번

Table 2. Antifungal susceptibility and R6G accumulation in some *Candida* isolates showing a trailing growth or decreased fluconazole susceptibility

| Isolate No. | Species | Interpretation | Azole MIC (μg/mL) at the indicated time | | | | | | R6G accumulation (GMF) |
|-------------|------------------------|----------------|---|-------|--------------|-------|--------------|-------|------------------------|
| | | | Fluconazole | | Itraconazole | | Voriconazole | | |
| | | | 24 hr | 48 hr | 24 hr | 48 hr | 24 hr | 48 hr | |
| 1 | <i>C. albicans</i> | Trailer* | 1 | 128 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 144.4 |
| 2 | <i>C. albicans</i> | Trailer* | 2 | 64 | 0.03 | 0.06 | 0.03 | 0.06 | 156.0 |
| 3 | <i>C. albicans</i> | Flu SDD† | 16 | 16 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 0.03 | 125.5 |
| 4 | <i>C. tropicalis</i> | Trailer* | 0.25 | 64 | 0.03 | 16 | 0.06 | 16 | 112.4 [§] |
| 5 | <i>C. tropicalis</i> | Trailer* | 0.25 | 128 | 0.03 | 0.125 | 0.03 | 32 | 173.6 |
| 6 | <i>C. tropicalis</i> | Trailer* | 0.5 | 64 | 0.03 | 16 | 0.06 | 16 | 222.6 |
| 7 | <i>C. tropicalis</i> | Flu SDD† | 8 | 16 | 0.03 | 0.03 | 0.125 | 0.125 | 205.4 |
| 8 | <i>C. glabrata</i> | Azole R‡ | 32 | 64 | 2 | 2 | 1 | 4 | 33.2 [§] |
| 9 | <i>C. glabrata</i> | Azole R‡ | 32 | 64 | 0.5 | 1 | 1 | 2 | 39.5 |
| 10 | <i>C. glabrata</i> | Azole R‡ | 64 | 128 | 2 | 32 | 2 | 4 | 22.7 [§] |
| 11 | <i>C. parapsilosis</i> | Flu SDD† | 8 | 32 | 0.25 | 0.25 | 0.03 | 0.25 | 32.6 [§] |

*, Susceptible after 24-hr incubation (MIC $\leq 8 \mu\text{g/mL}$) and resistant after 48-hr incubation (MIC $\geq 64 \mu\text{g/mL}$); [†], susceptible dose dependent on fluconazole (MIC 16-32 $\mu\text{g/mL}$); [‡], resistant to more than two of the three azole antifungal agents (fluconazole, itraconazole and voriconazole) tested; [§], values represent reduced R6G accumulation for corresponding *Candida* species.

Abbreviations: R6G, rhodamine 6G; SDD, dose dependent susceptible; See Table 1.

Table 3. Expression profiles of resistance-related genes for the 7 *Candida glabrata* isolates

| Isolate No. | Fluconazole MIC ($\mu\text{g/mL}$) | R6G accumulation (GMF) | Gene expression (fold increase)* | |
|-------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------------|---------------|
| | | | <i>CgCDR1</i> | <i>CdCDR2</i> |
| 8 | 64 | 33.2 | 1.12 | 2.05 |
| 9 | 64 | 39.5 | 1.69 | 2.35 |
| 10 | 128 | 22.7 | 3.03 | 4.74 |
| 12 | 16 | 36.8 | 0.83 | 3.90 |
| 13 | 16 | 46.5 | 0.53 | 2.35 |
| 14 | 8 | 29.1 | 0.59 | 2.93 |
| 15 | 16 | 42.6 | 0.48 | 2.48 |

*Values represent increases in the levels of gene expression relative to that of *C. glabrata* ATCC 90030.

Abbreviations: R6G, rhodamine 6G; See Table 1.

균주)에서는 *CgCDR1*의 발현이 1.12–3.03이었고 *CgCDR2*의 발현이 2.05–4.74로 두 유전자 모두 *C. glabrata* ATCC 90030 균주에 비해 발현이 증가하였으며 GMF는 22.7–39.5로 상대적으로 더 낮은 값을 보였다.

고 찰

Azole 항진균제는 에르고스테롤 합성의 중요한 단계를 촉매하는 효소인 lanosterol 14 α -demethylase (*ERG11* 유전자에 의해 코딩)를 억제한다. 지금까지 밝혀진 칸디다 균종의 azole 항진균제 내성 기전 중 대표적인 2가지는 첫째, *ERG11* 유전자의 돌연변이나 과발현으로 인한 표적 효소의 변화이고, 둘째, 유출펌프를 코딩하는 유전자의 과발현으로 인한 세포막 수송 단백질에 의한 약물의 유출의 증가이다. 특히 다수의 azole 내성 칸디다 균주에서 세포막 수송 유전자가 과발현됨이 보고되어 두 번째 기전인 다약제 내성 펌프를 통한 azole의 유출이 가장 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[17]. R6G는 칸디다의 다약제 내성 펌프를 통해 균 밖으로 배출되므로 이 기전에 의해 azole에 내성을 보이는 칸디다 균주의 경우 세포내 축적이 감소하게 된다. 현재까지 R6G의 세포내 축적 정도가 검사실에서 항진균제 감수성 검사로서 이용 가능한지를 확인하기 위해 다양한 임상 균주를 대상으로 비교한 연구는 아직 없다. 본 연구에서는 표준 균주와 임상검체에서 분리된 6종의 칸디다 균종(*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* 및 *C. haemulonii*) 간에 R6G의 세포내 축적 정도의 차이가 있었고, 3가지 triazole 항진균제(fluconazole, itraconazole 및 voriconazole)의 MIC가 증가된 균주에서 R6G의 세포내 축적은 감소하였다.

칸디다는 균종별로 fluconazole MIC₅₀이 다르다고 알려져 있는데, *C. albicans* 0.25 $\mu\text{g/mL}$, *C. tropicalis* 0.5 $\mu\text{g/mL}$, *C. parapsilosis* 1 $\mu\text{g/mL}$, *C. glabrata* 8 $\mu\text{g/mL}$ 및 *C. krusei* 32 $\mu\text{g/mL}$ 의 순이라고 보고되었다[18]. 본 연구 결과, 칸디다는 균종에 따라 세포내 R6G 축적량에 차이가 있었고, 균종별로 *C. tropicalis*와 *C. albicans*에서 가장 높았고 그 다음이 *C. krusei*와 *C. parapsilosis*, 그리고 *C. glabrata*에서 가장 낮았다. 균종별 fluconazole MIC 순서와 비교할 때, R6G 축적량은 *C. krusei*를 제외하고는 칸디다 균종에 따른 fluconazole MIC 순서와 어느 정도 일치함을 알 수 있었다. 특히 다른 칸디다 균종에 비해 *C. glabrata*에서 R6G 축적량이 의외로 낮게 낮은 성적을 보였는데, *C. glabrata*가 다른 균종에 비해 fluconazole MIC가 더 높고 itraconazole과 voriconazole에 대해서도 더 높은 MIC를 보인다는 사실에 비추어 볼 때, *C. glabrata*가 다른 칸디다에 비해 상대적으로 azole에 대한 감수성이 저하되어 있는 이유는 주로 세포내 약물의 축적이 적게 되는 기전에 의한 것으로 생각되었다.

Fluconazole에 자연 내성을 보여 칸디다 균종 중 가장 내성이 높은 *C. krusei*의 경우 fluconazole에 대한 주요내성 기전은 유출펌프의 활성화가 아니라 표적효소인 cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51)의 azole 약제에 대한 감수성 저하로 알려져 있다[19]. *C. krusei*의 경우 *C. glabrata*와는 달리 voriconazole 등의 새로운 triazoles에 감수성을 보이고 세 가지 triazole 항진균제에 동시에 내성을 보이는 균주는 드문 편이다[19]. 본 연구에서 *C. krusei*는 *C. parapsilosis*보다 더 높은 세포내 R6G 축적이 관찰되었는데, 이는 *C. krusei*의 fluconazole 내성기전이 약물 유출 증가와는 무관함을 증명하였다.

Trailing 효과는 주로 *C. albicans*와 *C. tropicalis*에서 관찰되는 현상으로[14, 20] 본 연구에서 *C. albicans* 2주와 *C. tropicalis* 3주에서 trailing 성장으로 판정되었는데 이 중 4주는 R6G 축적 감소가 관찰되지 않아서 trailing 성장은 다약제 내성 펌프를 통한 유출기전과는 관련이 없는 것으로 생각되었다. 그러나 본 연구에서 *C. tropicalis* 1주는 GMF가 112.4로서 동일 *C. tropicalis* 균주의 평균값(167.3)에 비해 유의하게 낮아 이 균주에 대해 추후 더 연구가 필요할 것으로 생각되었다.

*C. albicans*의 azole 내성에는 자주 한 가지 이상의 분자 내성 기전이 관여함이 밝혀졌는데[2, 3, 17], *C. albicans* ATCC 64550 균주의 경우 *C. albicans* ATCC 90028 균주에 비해 세 가지 azole 모두에 대해 MIC가 더 증가해 있었고 R6G의 GMF가 *C. albicans*의 평균이나 *C. albicans* ATCC 90028 균주에 비해 더 낮게 측정되어 이 균주의 azole 항진균제에 대한 MIC

증가는 다약제 내성 펌프를 통한 유출과 관련이 있을 것으로 생각되었다. 한편 본 연구에서 2주의 *C. albicans* 임상 균주에서 fluconazole MIC가 16 $\mu\text{g/mL}$ 으로 약용량 의존성 감수성을 보인 반면, voriconazole에는 감수성이었는데, 이 균주들의 GMF가 *C. albicans*의 평균과 비슷하거나 약간 더 높은 값을 보이고 있었다. 따라서 이 두 균주의 fluconazole MIC 증가에는 유출 펌프 유전자 발현의 증가보다는 *ERG11* 유전자의 돌연변이 등의 다른 기전이 연관되어 있을 것으로 생각되었다.

*C. glabrata*는 내재성으로 azole 항진균제에 대한 감수성이 저하되어 있는 균종이지만, azole 치료 동안에도 azole에 대한 고도내성을 획득할 수 있다. *C. glabrata*에서 다약제 내성은 ABC transporter family인 *CgCDR1*과 *CgCDR2*의 과발현에 의한 에너지의존성 azole 유출과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다[16, 17]. 본 연구에서 fluconazole 뿐 아니라 itraconazole과 voriconazole에도 동시에 MIC가 증가되어 있는 3주 중 2주에서 R6G의 세포내 축적이 감소됨이 관찰되었다. 이 균주들의 다약제 유출펌프 유전자의 발현정도를 조사한 결과 *CgCDR1* 및 *CgCDR2*의 발현정도가 표준균주 및 fluconazole에 감수성 및 약용량 의존 감수성을 보이는 균주들에 비해 증가되어 있어서, 이 균주들에서 *CgCDR1*과 *CgCDR2*의 과발현에 의한 azole 유출이 azole 계열 항진균제에 대한 내성의 주요기전임을 확인할 수 있었다[15].

본 성적에서 혈액에서 분리된 *C. parapsilosis* 1주가 fluconazole에 대해서 약용량 의존성 감수성을 보였는데 GMF가 32.6로서 동일 *C. parapsilosis* 균주의 평균값(50.8)에 비해 유의하게 낮아 증가된 약물 유출이 azole 항진균제에 대한 감수성 저하와 연관됨이 추측되었다. 아직까지 *C. parapsilosis*에 대한 보고와 내성기전 연구는 매우 접하기 어렵다. *C. parapsilosis*가 주로 카테터 사용과 관련하여 병원내 전파가 가능한 균종임을 감안하면[21] 병원환경에서 오랫동안 노출된 균주에서 항진균제 내성 획득도 가능할 것으로 생각되며 따라서 항진균제 내성 *C. parapsilosis*에 대해서도 관심과 연구가 필요하리라 생각된다. 한편, *C. haemulonii*는 매우 드물게 분리되는 균으로 amphotericin에 내성을 보이고 때로 azole 내성을 보인다고 보고되었다[22]. 본 연구에서는 R6G 축적 검사를 시행하여 보았는데, 이 균주에서 소수이지만 다른 균종에 비해 낮은 R6G의 세포내 축적을 보여, 이에 대해 추후 더 많은 균주를 대상으로 한 R6G 축적 및 유전자 검사 등의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 *Candida*의 각 균종 간에 R6G 축적 정도의 차이가 있음을 밝힐 수 있었고, R6G의 축적 검사가 azole 계열 항진균제에 교차내성을 가진 칸디다 균주를 확인하

는 검사로도 이용 가능함을 보여주었다. R6G 축적검사가 실제 임상 미생물검사실에서 칸디다 균주의 azole 내성을 판단하는 검사로 사용되기 위해서는, 각 검사실에서 재현성 있는 검사법을 정립하고 매 검사마다 표준 균주와 함께 검사하여 검사의 표준화를 확보하는 작업이 선행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

배경 : 형광물질인 rhodamine 6G (R6G)는 칸디다의 다약제 내성 펌프를 통해 균 밖으로 배출되는데, 다약제 내성 유출 유전자가 과발현된 azole 내성 칸디다 균주에서 R6G의 세포내 축적이 감소됨이 밝혀졌다. 칸디다의 azole 약제에 대한 감수성 정도는 균종에 따라 서로 다름이 관찰되고 있는데, 서로 다른 칸디다 균종 간의 세포내 R6G 축적을 비교한 연구는 아직 시행된 바가 없다. 본 연구에서는 6종의 칸디다 균종을 대상으로 세포내 R6G 축적량을 측정하여 비교하여 보았다.

방법 : 칸디다 임상균주 및 표준균주 48주(*Candida albicans* 14주, *Candida tropicalis* 9주, *Candida glabrata* 8주, *Candida krusei* 8주, *Candida parapsilosis* 7주 및 *Candida haemulonii* 2주)를 대상으로 하였다. 3가지 azole 항진균제(fluconazole, itraconazole, voriconazole)에 대한 감수성 검사는 CLSI M27-A2의 broth microdilution법을 이용하여 minimal inhibitory concentration (MIC)를 측정하였고, 칸디다 균주의 세포내 R6G 축적 정도는 FACscan flow cytometer (BD biosciences, USA)를 이용하여 geometric mean of fluorescence intensity (GMF)를 측정하였다.

결과 : 세포내 R6G 축적을 측정하여 얻은 GMF의 평균은 균종별로 *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. krusei* 및 *C. parapsilosis*에서 각각 167.3 ± 18.5 , 126.9 ± 6.6 , 88.5 ± 18.5 및 50.8 ± 7.0 순이었고, 가장 낮은 GMF를 보인 균종은 *C. glabrata*로서 (평균 38.1 ± 3.9) 다른 균종에 비해 유의하게 낮았다($P < 0.05$). Trailing성장을 보인 5주와 fluconazole에서만 약제의존성 내성(MIC 16–32 $\mu\text{g/mL}$)을 보이는 2주에서는 GMF의 감소가 관찰되지 않은 반면, 세 가지 azole 항진균제 모두에 대한 MIC가 증가된 4주 중 3주(*C. glabrata* 2주 및 *C. parapsilosis* 1주)에서 낮은 GMF가 관찰되어 다약제 유출에 의한 내성기전이 시사되었다.

결론 : 6종의 칸디다를 대상으로 세포내 R6G 축적량을 측정한 결과, GMF의 평균값은 다른 칸디다 균종에 비해 *C. glabrata*에서 낮게 측정되어 칸디다 균종에 따라 R6G 축적량에 차이가 있음을 알 수 있었다. 또한, R6G의 축적 검사는 azole 계열

항진균제에 내성을 보이는 칸디다 균주에서 다약제 약물 유출에 의한 내성기전을 조사하는데도 이용될 수 있으리라 생각된다.

참고문헌

- Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. Am J Med 1991;91:586-9.
- Sanglard D and Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. Lancet Infect Dis 2002;2:73-85.
- Sanglard D, Kuchler K, Ischer F, Pagani JL, Monod M, Bille J. Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from AIDS patients involve specific multidrug transporters. Antimicrob Agents Chemother 1995;39:2378-86.
- Sanglard D, Ischer F, Calabrese D, Majcherczyk PA, Bille J. The ATP binding cassette transporter gene *CgCDR1* from *Candida glabrata* is involved in the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:2753-65.
- Barchiesi F, Calabrese D, Sanglard D, Falconi Di Francesco L, Caselli F, Giannini Di, et al. Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:1578-84.
- Maesaki S, Marichal P, Vanden Bossche H, Sanglard D, Kohno S. Rhodamine 6G efflux for the detection of *CDR1*-overexpressing azole-resistant *Candida albicans* strains. J Antimicrob Chemother 1999;44:27-31.
- Izumikawa K, Kakeya H, Tsai HF, Grimberg B, Bennett JE. Function of *Candida glabrata* ABC transporter gene, *PDH1*. Yeast 2003;20: 249-61.
- Brun S, Berges T, Poupard P, Vauzelle-Moreau C, Renier G, Chabasse D, et al. Mechanisms of azole resistance in petite mutants of *Candida glabrata*. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1788-96.
- Tsai HF, Krol AA, Sarti KE, Bennett JE. *Candida glabrata* *PDR1*, a transcriptional regulator of a pleiotropic drug resistance network, mediates azole resistance in clinical isolates and petite mutants. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1384-92.
- Vandeputte P, Larcher G, Berges T, Renier G, Chabasse D, Bouchara JP. Mechanisms of azole resistance in a clinical isolate of *Candida tropicalis*. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4608-15.
- Woo JH, You YK, Chu WS, Park CS. Measurement of staphylococcus aureus phagocytosis by human leukocytes -comparison of flow cytometry with immune microscopy-. Korean J Immunol 1992;14: 35-40. (우준희, 유용규, 추원석, 박춘식. 백혈구의 포도구균 탐식 측정-유체 세포 측정법과 면역형광현미경 측정의 비교 -. 대한면역학회지 1992; 14:35-40.)
- Lee W and Kwak Y. Antifungal susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. J Korean Med Sci 1999;14:21-6.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.
- Yi JY, Shin JH, Lee K, Yong D, Chae MJ, Suh SP, et al. Evaluation of spectrophotometric broth microdilution method to determine the fluconazole MIC of the *Candida* species. Korean J Lab Med 2002;22: 253-9. (이지연, 신중희, 이경원, 용동은, 채명중, 서순팔 등. *Candida* 균종의 Fluconazole 감수성 검사를 위한 Spectrophotometric Broth Microdilution법의 평가. 대한진단검사의학회지 2002;22:253-9.)
- Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, Ranno S, Torelli R, Fadda G. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:668-79.
- Shin JH, Chae MJ, Song JW, Jung SI, Cho D, Kee SJ, et al. Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. J Clin Microbiol 2007;45:2385-91.
- Sanglard D and Bille J. Current understanding of the modes of action of and resistance mechanisms to conventional and emerging antifungal agents for treatment of *Candida* infections. In: Calderone RA, ed. *Candida* and Candidiasis. Washington: ASM press, 2002:349-83.
- Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, Hamill RJ, Larsen RA, Horowitz HW, et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:3149-54.
- Guinea J, Sanchez-Somolinos M, Cuevas O, Pelaez T, Bouza E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. Med Mycol 2006;44:575-8.
- Yi JY, Shin JH, Lee K, Yong D, Yang SJ, Suh SP, et al. 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. Korean J Lab

- Med 2002;22:188-95. (이지연, 신종희, 이경원, 용동은, 양성진, 서순팔 등. RPMI 배지 및 RPMI-2% Glucose 배지를 이용한 *Candida albicans*의 fluconazole 감수성 검사. 대한진단검사의학회지 2002;22:188-95.)
21. Shin JH, Kee SJ, Shin MG, Kim SH, Shin DH, Lee SK, et al. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. J Clin Microbiol 2002;40:1244-8.
22. Rodero L, Cuenca-Estrella M, Cordoba S, Cahn P, Davel G, Kaufman S, et al. Transient fungemia caused by an amphotericin B-resistant isolate of *Candida haemulonii*. J Clin Microbiol 2002;40:2266-9.