

CLSI 액체배지 미량희석법, Etest 및 Minimum Fungicidal Concentration 검사에 의한 국내 혈액에서 분리된 효모균의 시험관 내 Amphotericin B 내성 성적

박지영¹ · 신종희¹ · 어 영² · 김의종³ · 기승정¹ · 김수현¹ · 신명근¹ · 서순팔¹ · 양동욱¹

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, 연세대학교 원주의과대학 진단검사의학교실², 서울대학교 의과대학 검사의학교실³

In Vitro Amphotericin B Susceptibility of Korean Bloodstream Yeast Isolates Assessed by the CLSI Broth Microdilution Method, Etest, and Minimum Fungicidal Concentration Test

Ji Young Park, M.D.¹, Jong Hee Shin, M.D.¹, Young Uh, M.D.², Eui Chong Kim, M.D.³, Seung Jung Kee, M.D.¹,
Soo Hyun Kim, M.D.¹, Myung Geun Shin, M.D.¹, Soon Pal Suh, M.D.¹, and Dong Wook Ryang, M.D.¹

Department of Laboratory Medicine¹, Chonnam National University Medical School, Gwangju; Department of Laboratory Medicine², Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju; Department of Laboratory Medicine³, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background : Although amphotericin B (AMB) has a wide spectrum of activity that encompasses the majority of yeast isolates, there have been recent reports suggesting that some yeast isolates exhibit decreased susceptibility to AMB. However, in vitro AMB susceptibility of yeast species isolates from blood cultures in Korea has not been fully surveyed.

Methods : A total of 92 bloodstream yeast isolates from four Korean hospitals, representing 10 *Candida* species (69 isolates) and 4 non-*Candida* yeast species (23 isolates) were evaluated. AMB minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by two methods: the CLSI method and Etest. AMB minimum fungicidal concentrations (MFCs) were also determined.

Results : For all 92 yeast isolates, the CLSI method generated a restricted range of MICs (0.125 to 4 $\mu\text{g/mL}$) with 3.3% exhibiting MICs $\geq 2 \mu\text{g/mL}$, and the corresponding MFC values ranged from 0.25 to 8 $\mu\text{g/mL}$ with 26.1% showing MFCs $\geq 2 \mu\text{g/mL}$. Etest produced the widest distribution of MICs, ranging from 0.03 to 32 $\mu\text{g/mL}$. High AMB MICs ($\geq 0.38 \mu\text{g/mL}$) by Etest was observed in 34.8% of the isolates: *Candida krusei* (100%), *Candida rugosa* (100%), *Trichosporon asashii* (100%), *Candida glabrata* (82%), and *Yarrowia lipolytica* (75%). Etest disclosed that all isolates of *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida pelliculosa* and *Kodamaea ohmeri* were highly susceptible to AMB (MIC $\leq 0.19 \mu\text{g/mL}$).

Conclusions : Our study showed that Etest may be more useful to discriminate yeast isolates with reduced susceptibility to AMB, and some isolates of less common yeast species from Korea may have decreased AMB susceptibilities. (*Korean J Lab Med* 2008;28:346-52)

Key Words : *Candida*, Amphotericin B, Etest, Yeast, Minimum fungicidal concentration

접 수 : 2008년 7월 30일 접수번호 : KJLM2151
수정본접수 : 2008년 9월 6일
게재승인일 : 2008년 9월 8일
교신저자 : 신 종 희
우 501-757 광주광역시 동구 학동 8
전남대학교병원 진단검사의학과
전화 : 062-220-5342, Fax : 062-224-2518
E-mail : shinjh@jnu.ac.kr

서 론

1950년경에 소개된 amphotericin B는 아졸계 항진균제가 개발되기 이전까지 거의 30년간 전신성 진균증 치료의 유일한

표준약제이었다. Amphotericin B는 진균 세포막의 에르고스테롤에 결합하여 세포막에 원통형의 통로를 만들어 세포질 내 이온이나 각종 성분의 세포 밖 유출을 일으켜 진균의 살진균효과(fungicidal effect)를 나타낸다[1]. 이 약제는 현재까지 칸디다를 비롯한 크립토코쿠스, 아스페르길루스, 접합균증 및 두형태곰팡이 등의 다양한 진균 감염증에 유용하게 사용되고 있다.

근래 효모성 진균감염의 빈도가 증가함에 따라 항진균제 감수성 검사법의 표준법으로 알려진 CLSI M27법이 개발되었는데, 이 방법은 fluconazole, itraconazole 등의 아졸계 항진균제 내성을 검출하는데 임상적으로 유용한 반면, amphotericin B 내성 검출에는 문제가 있다고 알려져 있다[2-4]. 반면 Etest를 이용한 amphotericin B 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 검사나 amphotericin B에 대한 최소살진균농도(minimum fungicidal concentration, MFC)검사가 CLSI법에 비해 amphotericin B 내성 및 감수성 균주를 잘 구분할 수 있고 amphotericin B 치료결과를 더 잘 예측할 수 있다는 보고도 있다[4-8]. 그러나 amphotericin B에 대한 항진균제 감수성 검사법에 관한 신뢰성이나 임상적 치료 결과와의 관계에 대해서는 아직까지 일치된 의견이 없어 추천되는 표준 검사법이 없는 실정이다[9, 10].

Amphotericin B 감수성 검사는 아직 임상검사실에서 실시간으로 실시하는 것이 권장되고 있지는 않으나 여러 기관에서 다년간 수집된 균주를 대상으로 생체 외 항진균제 감수성 검사가 시행되어 왔다. 그 결과 칸디다 균종 중 *Candida glabrata*와 *Candida krusei*는 amphotericin B에 생체 외 감수성이 저하되어 있음이 보고되어 이 균종에 의한 중증감염에는 고용량의 amphotericin B 사용이 권장되고 있다[9]. 최근 드물게 분리되는 효모균 중에도 amphotericin B에 내성을 보이는 균들이 있음이 보고되고 있는데, 흔한 칸디다 균종을 제외한 다른 효모 균종의 경우 amphotericin B 내성 자료가 부족하여 더 많은 균주에 대한 내성 자료가 요구되고 있다[9, 11]. 국내에서도 흔히 분리되는 칸디다 균종에 대해 Etest를 이용한 amphotericin B 감수성 검사 성적이 보고된 바 있으나[12], 드물게 분리되는 다양한 효모 균종을 대상으로 한 연구는 아직 접하기 어렵다. 본 연구에서는 최근 국내병원의 혈액배양에서 분리된 각종 효모균에 대해 CLSI 액체배지 미량희석법과 Etest의 두 가지 방법을 이용하여 amphotericin B MIC를 측정하고 동시에 amphotericin B MFC를 검사하여 세 가지 방법 간에, 그리고 각 효모 균종 간에 amphotericin B 내성 정도를 서로 비교하여 보았다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

2005년 1월부터 2007년 12월 사이에 전남대학교병원, 화순 전남대학교병원, 연세대학교 원주기독병원 및 서울대학교병원의 혈액배양에서 분리된 총 92주의 효모균을 대상으로 검사하였다. 대상 균주로는 4가지 흔한 칸디다 균종 41주(*Candida albicans* 10주, *Candida parapsilosis* 10주, *Candida tropicalis* 10주 및 *C. glabrata* 11주), 드물게 분리되는 칸디다 균종 28주(*C. krusei* 9주, *Candida guilliermondii* 9주, *Candida famata* 3주, *Candida lusitanae* 3주, *Candida rugosa* 2주 및 *Candida pelliculosa* 2주) 및 그 외 효모균 23주(*Kodamaea ohmeri* 8주, *Cryptococcus neoformans* 7주, *Yarrowia lipolytica* 4주 및 *Trichosporon asashii* 4주)이었다. 매 검사마다 항진균제 감수성 검사의 정도관리를 위해서 표준균주인 *C. parapsilosis* ATCC 22019 및 *C. krusei* ATCC 6258를 이용하였다.

2. CLSI 액체배지 미량희석법

CLSI M27-A2의 지침에 따라 액체배지 미량희석법으로 시행하였다[2, 10]. 사용배지는 RPMI-MOPS로서 L-glutamine이 든 RPMI-1640 배지(Gibco, Gaithersburg, MD, USA) 10.4 g을 증류수 900 mL에 녹인 후 여기에 0.165 M MOPS (3-N-morpholinopropanesulfonic acid) 완충액 34.53 g을 녹여 최종 양이 1,000 mL가 되도록 한 다음 pH를 7.0으로 맞추어 제조하였다. Amphotericin B (Sigma, Saint Louis, MO, USA)는 dimethyl sulfoxide (Sigma)용액을 이용하여 1,600 µg/mL의 농도로 용해시켰다. 각 항진균제는 다시 연속 배수 희석하여 0.03-16 µg/mL 사이의 최종농도가 되도록 하였다. 각 칸디다 균주는 Sabouraud dextrose agar (SDA)에서 35°C로 24시간 배양 후 0.85% 식염수에 균을 풀어 잘 섞은 후 0.5 McFarland 탁도(분광광도계, 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, 96-well 마이크로플레이트 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 µL를, 12번 well은 배지의 대조 well로서 RPMI-MOPS 배지 100 µL만을 분주하였다. 균 접종이 끝난 마이크로플레이트는 35°C에서 48시간(칸디다) 및 72시간(그 외 효모균) 동안 배양하였다. 결과 판정은 검사자에 의한 오차를 방지하기 위하여 두 사람의 관찰자가 맹검으

로 실시하여 일치하지 않을 경우 두 관찰자가 동시에 다시 확인하여 최종적으로 결정하였다. Amphotericin B MIC는 육안으로 관찰하여 균의 증식이 완전히 억제된 well의 최소 항균제 농도로 판정하였다. Amphotericin B MIC₅₀과 MIC₉₀은 각각 실험한 전체 균주의 50% 및 90%의 증식이 억제된 MIC로 정하였다.

3. Etest

Amphotericin B Etest에는 2% 포도당이 포함된 RPMI 배지를 사용하였다[13]. 배지용액은 1,000 mL의 멸균 증류수에 RPMI 1640 8.4 g, MOPS 분말 34.5 g, 포도당 20 g과 Bacto 한천배지 15 g을 첨가하여 pH를 7.0으로 맞추어 만들었고 멸균된 배양접시에 배지액을 부어서 한천배지의 깊이가 40±0.5 mm 정도 되게 하였다. 효모균 균액은 0.5 McFarland 농도로 맞춘 용액을 면봉에 충분히 묻혀 Etest 배지에 골고루 바르고 15분 뒤에 Etest strip (AB Biodisk, Solna, Sweden)을 놓았고, 35°C에서 48시간(칸디다) 및 72시간(그 외 효모균) 배양하여 MIC를 판정하였다. Etest의 MIC 판정은 항진균제 strip의 수치 스케일을 가로지르는 타원형에서 100% 억제된 경계상에 있는 가장 낮은 농도의 약물 농도를 MIC로 판정하였다.

4. 최소살진균농도

MFC는 진균을 99.9% 죽이는 항진균제의 최소농도로 하였다[10]. 최종 균액 0.5–2.5×10⁴ cells/mL을 사용하여 시행한 액체배지 미량희석법에서 48시간 혹은 72시간 배양 후 육안적으로 100% 성장이 억제된 모든 well에서 각각 100 µL씩 균액을 취하여 SDA 평판배지에 세 개씩 따로 분주하였다. 항진균제의 잔효(carry over)를 막기 위해, 점종액을 15분 동안 배지에 젖어 들게 한 다음 백금으로 배지에 골고루 퍼 발랐다. 균종에 따라 48시간 내지 72시간 동안 35°C 또는 실온에서 키운 다음 배지에 자란 총 집락의 수가 1개 이하가 되는 제일 낮은 농도를 MFC로 결정하였다. MFC₅₀은 전체 실험한 균주의 50%가 억제된 MIC 농도, MFC₉₀은 90%가 억제된 MIC 농도로 정하였다.

결 과

1. 액체배지 미량희석법에 의한 amphotericin B MIC와 MFC의 비교

Table 1은 각종 효모균 92주에 대하여 CLSI 액체배지 미량희

석법, Etest 및 MFC 검사의 세 가지 방법을 이용하여 amphotericin B 감수성 검사를 시행한 결과를 나타낸 것이다. CLSI 액체배지 미량희석법으로 검사한 결과, 가장 흔히 분리되는 4가지 균종인 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* 및 *C. parapsilosis* 등 41주의 amphotericin B MIC는 모두 0.25–1 µg/mL 사이의 범위였으며, 비교적 드물게 분리되는 칸디다 균종 28주의 MIC의 범위도 0.125–1 µg/mL로 비슷하였다. 각 칸디다 균종의 amphotericin B MIC₅₀은 0.125–0.5 µg/mL 사이로 균종 간에 큰 차이를 보이지 않았으나 amphotericin B MIC₉₀은 *C. krusei*의 경우 1 µg/mL이었고 다른 칸디다 균종은 0.25–0.5 µg/mL이었다. 칸디다 이외의 효모 균종의 amphotericin B MIC 범위는 *K. ohmeri*와 *C. neoformans*의 경우 0.25–0.5 µg/mL 사이였으며, *T. asashii*는 1–4 µg/mL였다. 전체적으로 효모균 92주의 CLSI법에 의한 amphotericin B MIC는 0.125–4 µg/mL 사이였으며, MIC가 2 µg/mL 이상인 균주는 *T. asashii* 3주(3%)뿐이었다.

전체 칸디다 균종의 amphotericin B MFC의 범위는 0.25–8 µg/mL로 MIC에 비해 비슷한 범위로 항진균제 희석농도에서 한두 단계 정도 높은 농도를 보였다. 칸디다 균종 중 *C. krusei*의 amphotericin B MFC₅₀은 2 µg/mL이었고 다른 균종은 0.5–1 µg/mL이었다. *K. ohmeri* 8주의 MFC는 0.5–1 µg/mL인 반면, *T. asashii* 4주는 2–8 µg/mL이었다. 전체적으로 amphotericin B MFC가 2 µg/mL인 균주는 26.1% (24/92)였는데, *C. krusei* (9주)와 *T. asashii* (4주)의 두 균종은 검사 균주 모두가 amphotericin B MFC 2 µg/mL이었다. 전체 92주에 대해 CLSI법으로 검사한 amphotericin B MIC와 MFC 성적의 2배 희석배수 내 일치율은 97.8%이었다.

2. Etest에 의한 amphotericin B MIC 분포

92주의 효모균을 대상으로 Etest를 이용하여 MIC를 검사한 결과, 전체 칸디다의 amphotericin B MIC 범위는 0.03–2 µg/mL 사이였고 칸디다 이외의 효모균의 경우 0.03–32 µg/mL 사이로 더 넓게 분포하였다(Table 1). 4가지 흔한 균종인 *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* 및 *C. parapsilosis*의 amphotericin B MIC₅₀은 각각 0.25, 0.38, 0.19 및 0.12 µg/mL이었고 *C. krusei*의 경우 0.75 µg/mL로 가장 높았다. 그리고 그 외 드물게 분리된 칸디다 균종 중 *C. rugosa* 2주의 amphotericin B MIC가 각각 0.75와 1 µg/mL이었다. Etest에 의한 칸디다 이외의 효모 균종의 amphotericin B MIC는 *K. ohmeri*와 *C. neoformans*의 경우 각각 0.03–0.19 µg/mL과 0.06–0.19 µg/

Table 1. Amphotericin B minimum inhibitory concentration by the CLSI method and Etest, and minimum fungicidal concentration for 92 bloodstream yeast isolates

Species (N tested)	Methods	N of isolates at MIC or MFC (μg/mL) of*															% agree- ment [†]
		≤0.03	0.06	0.12	0.19	0.25	0.38	0.5	0.75	1	1.5	2	4	8	16	≥32	
<i>C. albicans</i> (10)	CLSI-MIC				-	10	-	-	-	-							100
	MFC				-	-	6	-	4	-							
	Etest				2	7	1										
<i>C. glabrata</i> (11)	CLSI-MIC				-	10	-	1	-	-							100
	MFC				-	-	2	-	8	-	1						
	Etest				1	1	4	4	1								
<i>C. tropicalis</i> (10)	CLSI-MIC				-	6	-	4	-	-							100
	MFC				-	-	5	-	3	-	2						
	Etest			3	3	3	1										
<i>C. parapsilosis</i> (10)	CLSI-MIC				-	1	-	8	-	1	-						90.9
	MFC				-	-	1	-	7	-	1	1					
	Etest	1	3	1	1	2	1				1						
<i>C. krusei</i> (9)	CLSI-MIC				-	-	5	-	4	-							100
	MFC				-	-	-	-	-	-	8	1					
	Etest					1	1	5	2								
<i>C. guilliermondii</i> (9)	CLSI-MIC			6	-	2	-	1	-	-							100
	MFC			-	1	-	8	-	-	-							
	Etest	2	2	4	1												
<i>C. famata</i> (3)	CLSI-MIC			1	-	1	-	1	-	-							100
	MFC			-	-	-	1	-	2	-							
	Etest			1	1		1										
<i>C. lusitanae</i> (3)	CLSI-MIC	1	-	2	-	-	-	-	-	-							100
	MFC		-	1	-	1	-	1	-	-							
	Etest	2		1													
<i>C. rugosa</i> (2)	CLSI-MIC				-	-	2	-	-	-							100
	MFC				-	-	-	-	1	-	1						
	Etest							1	1								
<i>C. pelliculosa</i> (2)	CLSI-MIC			1	-	1	-	-	-	-							100
	MFC			-	1	-	1	-	-	-							
	Etest	1		1													
<i>K. ohmeri</i> (8)	CLSI-MIC				-	8	-	-	-	-							100
	MFC				-	-	2	-	6	-							
	Etest	2	2	3	1												
<i>C. neoformans</i> (7)	CLSI-MIC				-	1	-	6	-	-							100
	MFC				-	-	-	-	5	-	2						
	Etest		2	4	1												
<i>Y. lipolytica</i> (4)	CLSI-MIC				-	1	-	1	-	2	-						75
	MFC				-	-	1	-	-	-	1	2					
	Etest					1		1	1		1						
<i>T. asahii</i> (4)	CLSI-MIC				-	-	-	-	1	-	1	2					100
	MFC				-	-	-	-	-	-	1	1	2				
	Etest							1				1				2	
Total (92)	CLSI-MIC			9	-	43	-	29	-	8	-	1	2				97.8
	MFC			-	3	-	28	-	37	-	17	5	2				
	Etest	8	9	18	11	14	6	8	9	4		2	1			2	

* -, not tested; †, Percentage of MFCs that are within ± 2 dilutions of CLSI-MICs.

Abbreviations: MIC, minimum inhibitory concentration; MFC, minimum fungicidal concentration; CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute.

mL로 낮은 반면, *Y. lipolytica*와 *T. asashii*는 각각 0.25–2 $\mu\text{g/mL}$ 및 0.75–32 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 전체적으로 Etest에 의해

amphotericin B MIC 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 32주(34.8%) 이었고, 균종별로는 *C. krusei* (100%), *C. rugosa* (100%), *T.*

Table 2. Distribution of Etest MICs in relation with the CLSI MICs or MFCs for 92 yeast isolates

Test method	N of isolates displaying the dilution difference when Etest MICs are compared:							% agreement*
	>-2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	
Etest with CLSI	7	8	9	57	9	0	2	90.2
Etest with MFCs	24	17	34	10	5	0	2	71.7

*, Percentage of Etest MICs that are within ± 2 dilutions of CLSI-MICs or MFCs.

Abbreviations: See Table 1.

asashii (100%), *C. glabrata* (82%) 및 *Y. lipolytica* (75%)의 순서로 많이 관찰되었다. Etest에 의한 amphotericin B MIC와 MFC의 두 검사 결과를 동시에 살펴보면, *C. krusei*와 *T. asashii*는 검사한 모든 균주가 높은 amphotericin B MIC (0.38 $\mu\text{g/mL}$ 이상)와 MFC (2 $\mu\text{g/mL}$ 이상)를 보인 반면, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. pelliculosa* 및 *K. ohmeri* 균주는 모두 amphotericin B Etest MIC가 0.19 $\mu\text{g/mL}$ 이하이었고 동시에 MFC도 1 $\mu\text{g/mL}$ 이하이었다. 세 가지 방법 모두에 의해 다른 에 비해 상대적으로 높은 MIC와 MFC를 보인 균종은 *T. asashii*뿐이었다. 한편, Etest에 의한 MIC 값은 전체적으로 CLSI법이나 MFC 값에 비해 더 낮은 경향을 보였다. Etest와 CLSI법에 의한 amphotericin B MIC 값의 2배 희석배수 내 일치율은 90.2%이었고, Etest에 의한 MIC와 MFC 값의 2배 희석배수 내 일치율은 71.7%이었다(Table 2).

고 찰

최근 다양한 항진균제가 개발됨에 따라 진균에 대한 생체 외 항진균제 감수성 검사가 널리 시행되고 있다. 특정 항진균제에 대한 진균의 내성에는 획득내성과 내재성 내성의 두 가지가 있을 수 있는데, amphotericin B처럼 획득내성이 거의 보고되지 않는 약제의 경우 균종별 생체 외 감수성 성적을 참고하면 해당 균의 약제 내성을 예측하는데 도움을 받을 수 있다[9, 11]. 본 연구에서는 국내 4개 병원 혈액배양에서 분리된 총 14가지(총 92주)를 선택하여 3가지 방법으로 amphotericin B에 대한 생체 외 감수성 검사를 실시하여 amphotericin B 내성 정도를 조사하여 보았다.

Nguyen 등[4]은 CLSI M27법으로 검사된 대부분 칸디다 균주의 amphotericin B MIC가 0.25–1 $\mu\text{g/mL}$ 사이의 좁은 범위로 모여 있어 치료실패를 잘 예측할 수 없는 반면, MFC 검사를 amphotericin B의 치료실패의 가장 강력한 예측인자라고

하였다. 본 연구에서는 MFC 결과와 치료실패와의 관계에 대해서는 알아보기 못했으나 CLSI법에 의한 amphotericin B MIC는 칸디다 균종의 경우 0.125–1 $\mu\text{g/mL}$ 로서 역시 좁은 범위 내에 모여있음을 확인할 수 있었다. 전체 효모균 92주의 CLSI법에 의한 amphotericin B MIC는 0.125–4 $\mu\text{g/mL}$ (6 희석배수 이내)사이의 범위였으며, 동시에 실시한 amphotericin B MFC의 범위는 0.25–8 $\mu\text{g/mL}$ (6 희석배수 이내)로 한두 단계 정도 높은 농도를 보였을 뿐 큰 차이는 관찰할 수 없었다. Johnson 등[14]은 각 균종의 MIC₅₀과 MIC₉₀ 값이 이에 대응하는 MFC₅₀과 MFC₉₀에 비해 1 희석배수만 더 낮다고 보고하였다. 본 연구에서 MIC와 MFC의 2 희석배수 내 일치율이 97.8%였는데, Canton 등[15]은 81.1%로 보고하였다. 이러한 결과는 연구자마다 사용한 균액의 농도 및 양, 대상이 된 효모균의 종류 및 MFC 결정 인자 등에 의해 다소 차이가 있으리라 생각된다[15].

Amphotericin B Etest에 의한 칸디다 균주의 MIC 분포는 CLSI법에 비해 더 넓은 범위를 가지기 때문에 amphotericin B 내성 있는 균주를 감별하는데 있어서는 더 우월하다고 보고되었다[5–8, 16]. 본 연구에서도 총 92주의 효모균을 대상으로 Etest를 이용하여 검사한 결과, amphotericin B MIC가 0.03–32 $\mu\text{g/mL}$ 사이(14단계로 구분)로서 세 가지 방법 중 가장 넓게 분포함을 알 수 있었다. 본 연구에서 Etest에 의한 MIC와 CLSI법에 의한 amphotericin B MIC 값의 2배 희석배수 내 일치율은 90.2%로 Koc 등[17]의 성적과 유사했다. Etest와 CLSI법의 일치율이 낮은 이유로는 amphotericin B의 Etest MIC가 CLSI법에서 얻은 값에 비해 전체 균주에서 전반적으로 낮은 경향 때문으로 알려져 있다[6, 16]. 본 성적에서 각 균주의 MFC값은 CLSI법에 의한 MIC값에 비할 때 한두 단계 정도 더 높은 농도를 보였다. 따라서 Etest에 의한 MIC와 MFC의 일치율은 71.7%로서, Etest와 CLSI법보다 더 낮음을 알 수 있었다.

Amphotericin B 내성과 감수성 기준은 아직 결정되지 않았으나 본 연구에서는 효모의 각 균종 간의 내성정도의 차이를 알아보기 위하여 이전의 보고 기준을 참고로 하여 amphotericin B 내성균주의 빈도를 알아보았다. Amphotericin B 내성의 기준으로 CLSI법의 경우 MIC 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상[4, 10], MFC의 경우 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상[4, 10], 그리고 Etest의 경우 MIC 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 이상[5, 7]이 각각 제시되고 있다. 본 성적에서 대상이 된 효모균 총 92주 중 CLSI법에 의한 MIC 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 3.3%이었고, MFC 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상이 26.1%, 그리고 Etest에 의해 MIC 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 이상은 34.8%이었다. Pfaller와 Diekmann[11]는 다년간 수집된 다기관 연구의 결과로서 amphotericin B 감수성이 저하된 칸디다 균종으로 *C. krusei*, *C. kefyr*, *C.*

rugosa, *C. inconspicua*, *C. glabrata* 및 *C. lipolytica* 등을 보고한 바 있는데, 본 연구에서는 Etest에 의해 amphotericin B MIC가 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 주요 균종으로 *C. krusei* (100%), *C. rugosa* (100%), *C. glabrata* (82%) 및 *C. lipolytica* (75%)로서 다른 2가지 방법 성적에 비해 가장 잘 일치함을 알 수 있었다.

*C. lusitaniae*는 악성종양 환자에서 진균혈증의 원인균으로 보고되고 있으며, amphotericin B 치료 도중에 amphotericin B에 대한 획득 내성이 보고되었다[11]. 칸디다증 치료 지침에서는 이 균종에 의한 감염에 amphotericin B를 피하고 아졸계 항진균제를 사용할 것을 권하고 있다[9]. 그러나 최근 혈액에서 분리된 *C. lusitaniae* 균주 중 amphotericin B 감수성인 균주가 96.7%로서 *C. albicans*와 비슷하다고 보고되었는데[11] 본 성적에서 검사된 *C. lusitaniae* 3주는 모두 amphotericin B 감수성을 보였다. 한편, *C. rugosa*는 amphotericin B 치료도중에 균혈증이 발생한 예도 보고되어 amphotericin B 내성 칸디다로 간주되고 있는데[11], 본 연구에서도 Etest에 의해 *C. rugosa* 2주의 amphotericin B MIC가 각각 0.75 와 1 $\mu\text{g/mL}$ 로서 이를 확인할 수 있었다.

본 성적에서 Etest에 의한 MIC와 MFC 검사결과 모두에서 *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* 및 *C. pelliculosa* 균주는 amphotericin B에 매우 감수성이었으며, 이는 다른 보고[11]와 일치하는 소견이었다. 한편, *K. ohmeri*는 식품공장에서 피클 등을 발효시키는데 이용되는 효모균으로 이전에는 *Pichia ohmeri*로 불리어졌는데, 최근 국내에서 진균혈증의 원인균으로 새롭게 나타나고 있다[18]. 본 연구 결과, CLSI법에 의한 amphotericin B MIC가 0.25 $\mu\text{g/mL}$, MFC는 0.25–0.5 $\mu\text{g/mL}$, 그리고 Etest에 의한 MIC가 0.06–0.19 $\mu\text{g/mL}$ 로 낮아 amphotericin B에 대해 감수성일 가능성을 시사하였다.

본 연구에서 *Y. lipolytica* 4주의 Etest에 의한 MIC는 0.25–2 $\mu\text{g/mL}$ 로서 일부 균주에서 MIC가 높음을 관찰할 수 있었다. 이러한 성적은 최근 임상적으로 amphotericin B 치료에 반응하지 않는 *Y. lipolytica* 감염 예도 보고되고 있음을 감안하여 더 많은 균주를 대상으로 한 연구가 필요하다 생각된다[19]. 한편, Arikan과 Hascelik [16]은 칸디다에 대해 amphotericin B 내성을 검출할 수 없다고 알려진 CLSI법을 이용하여 검사한 결과, *T. asashii* 균주의 amphotericin B MIC₅₀과 MIC₉₀가 둘 다 4 $\mu\text{g/mL}$ 이었다고 하였고, Rodriguez-Tudela 등[20]도 CLSI법을 이용하여 이와 유사한 높은 amphotericin B MIC 값을 보고하였다. 본 연구에서도 4주의 *T. asashii* 균주가 CLSI법에 의해서 amphotericin B MIC가 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상을 보임을 확인할 수 있었고 전체적으로 본 연구에서 실험된 4주의 *T. asashii* 균

주는 세 가지 방법 모두에 의해 다른 효모균종에 비해 상대적으로 높은 MIC나 MFC를 보임을 알 수 있었다. 이러한 성적은 최근 드문 효모균에 의한 침습성 진균 감염의 빈도가 증가 추세에 비추어 앞으로 이들 드문 효모균에 대한 생체 외 amphotericin B 내성에 대한 검사 및 검사정보가 더욱 필요할 것으로 생각된다.

요 약

배경 : Amphotericin B는 대부분의 효모균에 광범위한 활성을 나타내는 항진균제로서 흔히 사용되고 있는데, 최근 혈액에서 분리된 효모균 중 일부 균주가 amphotericin B에 대한 감수성이 저하되어 있음이 보고되었다. 그런데 아직까지 국내에서 분리된 각종 효모균에 대한 amphotericin B 생체의 감수성에 대한 보고는 접하기 어렵다.

방법 : 국내 4개 병원의 혈액배양에서 분리된 총 92주(10종의 칸디다 균종 69주 및 4종의 비칸디다 효모 균종 23주)의 효모균을 대상으로 하였다. 생체 외 amphotericin B 감수성 검사는 CLSI 액체배지 미량희석법, Etest 및 최소살진균농도(minimum fungicidal concentrations, MFC) 검사의 세 가지 방법으로 동시에 실시하였다.

결과 : 총 92주의 효모균을 대상으로 amphotericin B 감수성 검사를 실시한 결과, CLSI법을 이용한 amphotericin B MIC 범위는 0.125–4 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 MFC 범위는 0.25–8 $\mu\text{g/mL}$ 사이인데 비해, Etest를 이용한 amphotericin B MIC는 0.03–32 $\mu\text{g/mL}$ 사이로 가장 넓게 분포하였다. 대상이 된 효모균 총 92주 중 CLSI법에 의한 MIC 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 3.3%이었고, MFC 2 $\mu\text{g/mL}$ 이상이 26.1%, 그리고 Etest에 의해 MIC 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 이상은 34.8%이었다. Etest 검사결과 *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida pelliculosa* 및 *Kodamaea ohmeri*의 모든 균주는 amphotericin B에 높은 감수성을 보인 반면(MIC 0.19 $\mu\text{g/mL}$ 이하), amphotericin B MIC가 0.38 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 *Candida krusei* (100%), *Candida rugosa* (100%), *Trichosporon asashii* (100%), *Candida glabrata* (82%) 및 *Yarrowia lipolytica* (75%)의 순서로 많이 관찰되었다.

결론 : Etest는 CLSI법과 MFC에 비해 amphotericin B에 대한 감수성이 저하된 효모균을 감별하는데 더 유용하며, 국내에서 드물게 분리되는 효모균 중 amphotericin B에 대한 생체 외 감수성이 저하된 균종이 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Ghannoum MA and Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:501-17.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.
3. Antoniadou A, Torres HA, Lewis RE, Thornby J, Bodey GP, Tarand 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.
4. Nguyen MH, Clancy CJ, Yu VL, Yu YC, Morris AJ, Snyderman DR, et al. Do in vitro susceptibility data predict the microbiologic response to amphotericin B? Results of a prospective study of patients with *Candida* fungemia. *J Infect Dis* 1998;177:425-30.
5. Wanger A, Mills K, Nelson PW, Rex JH. Comparison of Etest and National Committee for Clinical Laboratory Standards broth microdilution method for antifungal susceptibility testing: enhanced ability to detect amphotericin B-resistant *Candida* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2520-2.
6. Arendrup M, Lundgren B, Jensen IM, Hansen BS, Frimodt-Moller N. Comparison of Etest and a tablet diffusion test with the NCCLS broth microdilution method for fluconazole and amphotericin B susceptibility testing of *Candida* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:521-6.
7. Clancy CJ and Nguyen MH. Correlation between in vitro susceptibility determined by E test and response to therapy with amphotericin B: results from a multicenter prospective study of candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1289-90.
8. Peyron F, Favel A, Michel-Nguyen A, Gilly M, Regli P, Bolmstrom A. Improved detection of amphotericin B-resistant isolates of *Candida lusitanae* by Etest. *J Clin Microbiol* 2001;39:339-42.
9. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, et al. Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 2004;38:161-89.
10. Park BJ, Arthington-Skaggs BA, Hajjeh RA, Iqbal N, Ciblak MA, Lee-Yang W, et al. Evaluation of amphotericin B interpretive breakpoints for *Candida* bloodstream isolates by correlation with therapeutic outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1287-92.
11. Pfaller MA and Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4419-31.
12. Kim M, Lim WH, Shin JH, Suh SP, Yang DW. E-test for antifungal susceptibility testing of *Candida* species. *Korean J Clin Pathol* 1999;19:78-85. (김민, 임우현, 신종희, 서순팔, 양동욱. E-test를 이용한 *Candida* species의 항진균제 감수성 검사. 대한임상병리학회지 1999;19:78-85.)
13. Pfaller MA, Messer SA, Bolmström A. Evaluation of Etest for determining in vitro susceptibility of yeast isolates to amphotericin B. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:223-7.
14. Johnson EM, Ojwang JO, Szekeley A, Wallace TL, Warnock DW. Comparison of in vitro antifungal activities of free and liposome-encapsulated nystatin with those of four amphotericin B formulations. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1412-6.
15. Canton E, Peman J, Viudes A, Quindos G, Gobernado M, Espinel-Ingroff A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:203-6.
16. Arikan S and Hascelik G. Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asashii* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;43:107-11.
17. Koc AN, Gokahmetoglu S, Oguzkaya M. Comparison of E-test with the broth microdilution method in susceptibility testing of yeast isolates against four antifungals. *Mycoses* 2000;43:293-7.
18. Lee JS, Shin JH, Kim MN, Jung SI, Park KH, Cho D, et al. *Kodamaea ohmeri* isolates from patients in a university hospital: identification, antifungal susceptibility, and pulsed-field gel electrophoresis analysis. *J Clin Microbiol* 2007;45:1005-10.
19. Belet N, Ciftçi E, Ince E, Dalgic N, Oncel S, Güriz H, et al. Caspofungin treatment in two infants with persistent fungaemia due to *Candida lipolytica*. *Scand J Infect Dis* 2006;38:559-62.
20. Rodriguez-Tudela JL, Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cano V, Tapia C, Perkins A, et al. Susceptibility patterns and molecular identification of *Trichosporon* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4026-34.