

Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Yeasts Isolated from Ear Specimens

Yong Jun Kwon, Seung A Byun, Min Ji Choi, Eun Jeong Won, Soo Hyun Kim, Jong Hee Shin

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

Background: *Candida auris* was first isolated from the ears of Japanese and Korean patients. However, the prevalence of yeast isolates from ear cultures and their antifungal susceptibility profiles in these nations remain unclear.

Methods: We assessed yeast isolates recovered from ear cultures from a university hospital in Korea over a 4-year period from January 2014 to December 2017. Species identification was performed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and/or sequence analysis. Antifungal minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using the broth microdilution method of the Clinical and Laboratory Standards Institute.

Results: Among 81 non-duplicate isolates from ear cultures, *Candida parapsilosis* was the most frequently detected yeast species (34.6%), followed by *C. auris* (28.4%), *Candida metapsilosis* (9.9%), *Candida orthopsilosis* (8.6%), *Candida albicans* (7.4%), and others

(11.1%). The MICs of the isolates were 0.125 to > 64 $\mu\text{g/mL}$, ≤ 0.03 to 4 $\mu\text{g/mL}$, 0.25 to 1 $\mu\text{g/mL}$, 0.125 to 1 $\mu\text{g/mL}$, and ≤ 0.03 to 2 $\mu\text{g/mL}$ for fluconazole, voriconazole, amphotericin B, caspofungin, and micafungin, respectively. Of the 81 isolates, 44.4% (36/81) showed decreased susceptibility to fluconazole (MIC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$). Of the 23 *C. auris* isolates, 19 (82.6%) had a fluconazole MIC of ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$. None of the isolates showed resistance to amphotericin B or echinocandins. Most of these patients suffered from chronic otitis media (84%).

Conclusion: *Candida parapsilosis* complex and *C. auris* were the yeast species identified most frequently from ear cultures and they exhibited a high rate of fluconazole non-susceptibility, particularly *C. auris*. (Ann Clin Microbiol 2019;22:81-89)

Key Words: Antifungal resistance, *Candida auris*, Ear, Fluconazole, Yeast

INTRODUCTION

귀 검체 배양은 흔히 외이도염, 중이염 혹은 유양돌기염 등의 원인균을 검출하기 위해 의뢰된다[1]. 외이도염이 의심되어 의뢰되는 면봉 검체는 피부나 외이도의 상재균을 포함할 수 있는 반면, 중이염 환자에서 의뢰된 중이 흡인액 등은 오염이 없는 한 모든 배양균을 보고하고 항진균제 감수성 검사를 시행해야 한다[1]. 중이염과 연관되어 분리되는 세균의 경우 지역과 시간에 따라 다르기는 하나 항균제 내성이 널리 퍼져있고 그 빈도가 증가하고 있으며, 특히 항균제 고도 내성을 획득한 균주에 의한 감염으로 인해 치료에 어려움을 겪고 있다[2,3]. 외이도염을 유발하는 병원균으로는 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* 혹은 *Pseudomonas aeruginosa* 등 세균이 주로 알려져 있는 반면, 진균에 의한 감염은 흔하지 않다[4].

급성 중이염의 원인균으로는 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* 혹은 *Moraxella catarrhalis* 등이 잘 알려져 있고, 만성중이염의 원인균으로는 *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* 혹은 *S. aureus* 등의 세균이 자주 분리되지만[5], 아스페르길루스와 칸디다 등의 진균도 비교적 드물게 분리된다[2,3,6].

귀 검체에서 자주 분리되는 군사형 진균은 주로 아스페르길루스인데, *Aspergillus niger*가 가장 흔하고 *Aspergillus flavus* 순으로[7,8] 주로 외이도염 환자에서 분리된다. 그러나 귀 검체에서 분리되는 효모형 진균의 균종 종류와 항진균제 내성양상 등에 대해서는 알려진 바가 많지 않다. *Candida auris*는 효모형 진균으로서 2009년 우리나라와 일본 환자의 귀 검체에서 최초 분리 보고된 바 있고[9,10], 2011년 국내에서 최초의 혈류감염 증례가 보고되었다[11]. *C. auris*는 항진균제 다제내성을 보이

Received 22 April, 2019, Revised 6 June, 2019, Accepted 6 June, 2019

Correspondence: Jong Hee Shin, Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Medical School, 42 Jebongro, Dong-gu, Gwangju 61469, Korea. (Tel) 82-62-220-5342, (Fax) 82-62-224-2518, (E-mail) shinjh@chonnam.ac.kr

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

며 의료관련감염의 원인균으로 확산되고 있어 전세계적으로 문제가 되고 있으나 통상적 검사법으로는 동정이 잘 되지 않을 수 있다[12]. 현재까지 국내병원 귀 검체에서 분리된 *C. auris*를 포함한 효모 균종의 분포와 감수성 양상에 관한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 본 연구에서는 1개 대학병원에서 최근 4년 동안 귀 검체에서 분리된 효모균을 대상으로 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) 검사법과 추가적인 유전자 염기서열분석법을 시행하여 균종을 동정하고, 분리 균주의 항진균제 감수성 양상을 조사하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 대상 균주 및 동정법

2014년 1월에서 2017년 12월까지 4년 동안 전남대학교병원에서 귀 검체 배양에서 분리되어 보관중인 총 81주의 효모균을 대상으로 하였다. 검체 채취 방법은 멸균된 면봉으로 귀 검체를 최대한 상재균에 오염되지 않게 채취한 뒤, 검체를 채취한 면봉을 Amies 운송배지(COPAN, Brescia, Italy)에 담아 검사실에 의뢰하였다. 귀 검체에 대한 일반적인 동정이 의뢰된 경우 혈액천배지, MacConkey 배지, 초콜릿배지(Synergynnovation, Seongnam, Korea)에 접종하여 37°C에서 배양하였고, 진균 배양이 의뢰된 경우 Sabouraud dextrose 배지(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea) 및 potato dextrose 배지에 접종하여 30°C 및 실온에서 배양 후 관찰하였다. 혐기성배양이 의뢰된 경우에는 brucella 배지 및 phenylethanol 배지(Asan Pharmaceutical)에 접종 후 혐기성 파우치에 담아, 37°C에서 배양하여 관찰하였다.

동일 환자에서 반복적으로 의뢰된 귀 검체 배양에서 동일 균종이 분리되면 처음 분리된 균주만을 분석 대상으로 하였다. 배양된 균주는 CHROMagar Candida (CHROMagar, Paris, France), VITEK 2 시스템(bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), 혹은 MALDI-TOF MS Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)를 이용하여 동정하였다. 위 방법으로 정확한 균종 동정이 되지 않은 경우, *C. auris*로 동정되거나 의심되는 경우에는 모두 리보솜 DNA의 D1/D2 부위를 염기서열분석을 시행하여 다시 확인하였다[12,13].

2. 항진균제 감수성 검사

항진균제 감수성 검사는 모든 균주에 대하여 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27-A3 지침에 따라 액체배지 미량 희석법을 이용하여 시행하였다[14]. 검사한 항진균제는 fluconazole (Sigma, Saint Louis, MO, USA), voriconazole (Pfizer Global Research & Development, Sandwich, UK), amphotericin B (Sigma, Saint Louis, MO, USA), caspofungin (Sigma, Saint Louis, MO, USA)과 micafungin (Astellas

Toyama Co., Ltd. Takaoka Plant, Japan)이었다. 균 접종이 끝난 96 well 플레이트는 35°C에서 배양하였고, 결과 판정은 24시간 배양 후 실시하였다. Fluconazole, voriconazole, caspofungin 및 micafungin의 minimal inhibitory concentrations (MICs)는 24시간에서 성장 대조 well에 비해 성장이 50% 이상 억제된 지점을, amphotericin B MIC는 100%의 증식이 억제된 지점으로 판정하였다. 매 검사마다 항진균제 감수성 검사의 정도 관리를 위해서 표준 균주인 *Candida parapsilosis* ATCC 22019 및 *Candida krusei* ATCC 6258를 검사하였다. 분리된 각 균주를 각 항진균제에 대한 CLSI M60에서 정한 균종 특이적 임상적 임계점(clinical breakpoints, CBPs)을 기준으로 감수성, 중간, 약제용량의존성 감수성 혹은 내성으로 구분하였다[15,16]. 즉, *C. parapsilosis* 경우에는 CLSI CBP를 이용하여 fluconazole MIC가 각각 8 µg/mL 및 4 µg/mL 이상이면 각각 내성 및 약제용량의존성 감수성으로 판정하였고, voriconazole, caspofungin 및 micafungin에 대해서는 MIC가 각각 1 µg/mL, 8 µg/mL 및 8 µg/mL 이상이면 내성으로, 각각 0.25-0.5 µg/mL, 4 µg/mL 및 4 µg/mL 이상이면 중간내성으로 판정하였다. *C. auris*의 경우에는 미국 질병관리본부에서 발표한 tentative MIC breakpoint 기준을 적용하여 fluconazole, amphotericin B, caspofungin 및 micafungin에 대하여 MIC가 각각 32 µg/mL, 2 µg/mL, 2 µg/mL 및 4 µg/mL 이상이면 내성으로 판정하였고, voriconazole에 대한 임시적 기준은 아직 성립되지 않아 내성 유무를 판정하지 않았다[17]. 그리고 해당되는 균종에 대해 항진균제에 대한 CBP 기준이 없을 경우에는 epidemiological cutoff values (ECVs)를 이용하여 감수성 및 내성으로 구분하였다[15,16].

3. 임상적 특성 분석

해당 기간동안 귀 검체의 배양의뢰에서 효모균이 자란 환자들의 나이, 성별, 분리연도 및 이전 항생제 및 항진균제 사용 여부, 이비인후과 수술기왕력, 면역억제 여부, 만성 중이염 여부, 진균의 반복 동정 여부 등을 조사하였다[18]. 본 연구는 전남대학교병원 기관위원회(Institutional Review Board, IRB)에 의해 승인되었다(IRB CNUH-2014-290).

4. 통계처리

주요 효모 균종에 의한 임상적 특성이 다른 효모 균종과 통계적으로 유의한 차이가 있는지를 알아보기 위해 통계처리를 시행하였다. 통계적 유의성은 Fisher's exact test를 이용하여 검정하였고, $P < 0.05$ 인 경우 유의한 것으로 간주하였다. 통계처리는 SPSS 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다.

Table 1. Annual species distribution of yeasts recovered from ear cultures

Species	Year				Total (%)
	2014	2015	2016	2017	
<i>Candida parapsilosis</i>	6	7	8	7	28 (34.6)
<i>Candida auris</i>	6	4	6	7	23 (28.4)
<i>Candida metapsilosis</i>	0	1	2	5	8 (9.9)
<i>Candida orthopsilosis</i>	1	2	0	4	7 (8.6)
<i>Candida albicans</i>	1	1	0	4	6 (7.4)
<i>Candida guilliermondii</i>	0	0	2	0	2 (2.5)
<i>Candida ciferrii</i>	1	0	1	0	2 (2.5)
<i>Candida glabrata</i>	0	1	0	0	1 (1.2)
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	1	1 (1.2)
<i>Candida utilis</i>	0	0	0	1	1 (1.2)
<i>Candida krusei</i>	1	0	0	0	1 (1.2)
<i>Kodamaea ohmeri</i>	0	0	0	1	1 (1.2)
Total	16	16	19	30	81 (100)

Table 2. *In vitro* susceptibility of yeast isolates recovered from ear specimens for azole antifungal agents

Species (No. of isolates)	Antifungal agent	No. of occurrence at MIC ($\mu\text{g/mL}$)												Percent non-susceptible*	
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		>64
<i>C. parapsilosis</i> (28)	Fluconazole			1		7	13	5	2						7.1
	Voriconazole	22	4		2										7.1
<i>C. auris</i> (23)	Fluconazole										4	2	4	13	82.6
	Voriconazole		1	4	1	5	9	3							NA
<i>C. metapsilosis</i> (8)	Fluconazole							5	3						NA
	Voriconazole	1	5	2											NA
<i>C. orthopsilosis</i> (7)	Fluconazole						7								0
	Voriconazole	3	3	1											14.3
<i>C. albicans</i> (6)	Fluconazole				5	1									0
	Voriconazole	6													0
<i>C. guilliermondii</i> (2)	Fluconazole										2				100
	Voriconazole				2										0
<i>C. glabrata</i> (1)	Fluconazole												1		100
	Voriconazole								1						100
<i>C. tropicalis</i> (1)	Fluconazole					1									0
	Voriconazole		1												0
<i>C. krusei</i> (1)	Fluconazole												1		100 [†]
	Voriconazole					1									0
Others (4) [‡]	Fluconazole									3		1			NA
	Voriconazole		1		2	1									NA
Total (81)	Fluconazole			1	5	9	20	10	5	3	6	3	6	13	36.2 (25/69)
	Voriconazole	32	15	7	7	7	9	3	1						8.7 (4/46)

*Results of percent non-susceptible included isolates showing resistance (R), susceptible-dose dependence (SDD) or intermediate (I) to each azole, and they were determined for *Candida* species which species-specific clinical breakpoints (CBPs) or epidemiological cutoff values (ECVs) were available (69 isolates for fluconazole and 46 isolates for voriconazole) [13-15].

[†]Isolates of *C. krusei* are considered resistant to fluconazole, irrespective of the MIC.

[‡]Others included *C. ciferrii* (2 isolates), *C. utilis* (1 isolate), and *K. ohmeri* (1 isolate).

Abbreviation: NA, non-applicable because species-specific CBPs or ECVs are not at present available.

RESULTS

1. 귀 검체에서 분리된 효모 균종

조사 기간인 4년 동안 총 80명의 환자로부터 81주의 효모균이 분리되었고(Table 1), 전체 균주 중 *C. auris* 23주, *Candida guilliermondii* 2주, *Candida metapsilosis* 2주 및 *Candida orthopsilosis* 1주 등은 추가 염기서열분석에 의하여 확정 동정되었다. 80명 중 1명의 성인 환자에서 두 가지 효모균(*C. auris*, *Candida glabrata*)이 각기 다른 시기에 1주씩 분리되었다. 분리된 81주의 효모균 중 *C. parapsilosis*가 34.6% (28주)로 가장 흔

한 균종이었으며, *C. auris* 28.4% (23주), *C. metapsilosis* 9.9% (8주), *C. orthopsilosis* 8.6% (7주), *Candida albicans* 7.4% (6주) 순으로 5종의 칸디다가 전체 균주의 88.9%를 차지하였다. 그 이외에도 *C. guilliermondii* 2.5% (2주), *Candida ciferrii* 2.5% (2주), *C. glabrata* 1.2% (1주), *Candida tropicalis* 1.2% (1주), *C. krusei* 1.2% (1주), *Candida utilis* 1.2% (1주), *Kodamaea ohmeri* 1.2% (1주)가 분리되었다.

2. 귀 검체에서 분리된 효모균의 항진균제 감수성

전체 81주의 fluconazole과 voriconazole에 대한 MIC 분포는

Table 3. *In vitro* susceptibility of yeast isolates recovered from ear specimens for amphotericin B and echinocandin antifungal agents

Species (No. of isolates)	Antifungal agent	No. of occurrence at MIC (μ g/mL)												Percent non-susceptible*	
		≤ 0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		>64
<i>C. parapsilosis</i> (28)	Amphotericin B				1	25	2								0
	Caspofungin				4	24									0
	Micafungin					6	18	4							0
<i>C. auris</i> (23)	Amphotericin B				1	19	3								0
	Caspofungin				4	19									0
	Micafungin	4	2	13	4										0
<i>C. metapsilosis</i> (8)	Amphotericin B				3	5									NA
	Caspofungin				6	2									NA
	Micafungin				1	4	3								NA
<i>C. orthopsilosis</i> (7)	Amphotericin B				2	5									0
	Caspofungin				5	2									0
	Micafungin					5	2								0
<i>C. albicans</i> (6)	Amphotericin B					2	4								0
	Caspofungin				4	2									0
	Micafungin	4	2												0
<i>C. guilliermondii</i> (2)	Amphotericin B				1	1									0
	Caspofungin					2									0
	Micafungin					1	1								0
<i>C. glabrata</i> (1)	Amphotericin B						1								0
	Caspofungin					1									0
	Micafungin		1												0
<i>C. tropicalis</i> (1)	Amphotericin B					1									0
	Caspofungin					1									0
	Micafungin	1													0
<i>C. krusei</i> (1)	Amphotericin B						1								0
	Caspofungin					1									0
	Micafungin			1											0
Others (4) [†]	Amphotericin B				1	2	1								NA
	Caspofungin				2	1	1								NA
	Micafungin	2	1		1										NA
Total (81)	Amphotericin B				9	60	12								0
	Caspofungin				10	40	30	1							0
	Micafungin	11	6	14	6	16	24	4							0

*Results of percent non-susceptible included isolates showing resistance (R) or intermediate (I) to each of three antifungals and they were determined for *Candida* species which species-specific CLSI clinical breakpoints (CBP) or epidemiological cutoff values (ECVs) were available [13,14].

[†]Others included *C. ciferrii* (2 isolates), *C. utilis* (1 isolate), and *K. ohmeri* (1 isolate).

Abbreviation: NA, non-applicable because species-specific CBPs or ECVs are not at present available.

Table 4. Clinical data of patients with yeast isolates from ear cultures

Species	Total No. of isolates	No. of patients								
		Adult	Male	Prior use of antibiotics	Operation or trauma history of ear	Diabetes	Otitis media	Use of antifungal agents	Previous or concomitant bacterial or mold recovery from ear	Repeated Isolation of yeast
<i>C. parapsilosis</i>	28	24	10	18	15	3	24	0	5	2
<i>C. auris</i>	23	23	12	18	16	5	21	1	8	4
<i>C. metapsilosis</i>	8	8	4	5	3	2	6	0	3	0
<i>C. orthopsilosis</i>	7	7	0	6	4	0	6	0	2	1
<i>C. albicans</i>	6	5	3	6	5	2	6	0	3	0
<i>C. guilliermondii</i>	2	2	1	2	1	0	1	1	1	1
<i>C. ciferrii</i>	2	2	0	1	1	0	1	0	0	1
<i>C. glabrata</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
<i>C. tropicalis</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
<i>C. utilis</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
<i>C. krusei</i>	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0
<i>K. ohmeri</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
Total	81*	76	32	60	48	15	69	2	24	9

*One patient showed positive blood cultures for both *C. auris* and *C. glabrata*.

각각 0.125->64 $\mu\text{g/mL}$ 및 $\leq 0.03\text{-}4$ $\mu\text{g/mL}$ 이었다(Table 2). 전체 균주 중 fluconazole MIC가 4 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 총 36주(44.4%)로 *C. auris* 23주, *C. metapsilosis* 3주, *C. parapsilosis* 2주, *C. guilliermondii* 2주, *C. ciferrii* 2주, *C. glabrata* 1주, *C. krusei* 1주, *C. utilis* 1주, *K. ohmeri* 1주였다. 특히 *C. auris*는 fluconazole 및 voriconazole에 대해 16->64 $\mu\text{g/mL}$, 0.06-2 $\mu\text{g/mL}$ 의 상대적으로 높은 MIC 분포를 보였고, fluconazole에 MIC가 32 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 경우는 82.6%였다. 전체 균주 중 fluconazole에 대해 CLSI CBP 혹은 ECV를 적용할 수 있는 69주를 대상으로 하였을 때 fluconazole MIC가 CBP 또는 ECV를 넘는 균주는 36.2% (25/69)였다. Voriconazole MIC가 CBP 또는 ECV를 넘는 균주는 8.7% (4/46)였다. Amphotericin B, caspofungin 및 micafungin에 대한 MIC 분포는 각각 0.25-1 $\mu\text{g/mL}$, 0.125-1 $\mu\text{g/mL}$ 및 $\leq 0.03\text{-}2$ $\mu\text{g/mL}$ 이었다(Table 3). Amphotericin B, caspofungin 및 micafungin에 대해 CLSI CBP 및 ECV를 적용할 수 있는 균주를 대상으로 조사하였을 때 MIC가 CBP 또는 ECV를 넘는 균주는 없었다.

3. 임상적 특성

연구 기간 동안 80명의 환자에서 동정된 81주의 효모균을 대상으로 임상 정보를 후향적으로 조사하였다(Table 4). 총 81주의 효모균은 성인 75명, 소아 5명에서 분리되었으며, 귀에서 효모균이 분리되기 전에 항생제를 복용한 기왕력이 있는 환자에서 분리된 균주는 74.1% (60/81)로 많았다. 귀 수술 및 귀에 외상 경력이 있는 환자에서 분리된 균주는 59.3% (48/81)가 있었다. 만성중이염이 진단된 환자에서 분리된 균주는 85.2%

(69/81)로 대부분을 차지하였고, 당뇨병 환자에서 분리된 경우는 18.5% (15/81) 있었다. 효모균이 분리된 환자에서 세균이 동시에 분리된 경우는 22예로, 그 중 *P. aeruginosa*가 9주로 가장 많았고, *S. aureus*가 6주로 그 다음으로 많았다. 사상균이 분리된 경우는 2예가 있었는데, *A. niger* 1주가 *C. tropicalis*가 동정된 환자에서 동정된 바 있었고, *Aspergillus terreus* 1주가 *C. parapsilosis*와 함께 동정되었다. 총 23주의 *C. auris*는 모두 성인에서 분리되었으며, 이 중 항생제 복용력이 있는 경우는 78.3%, 귀 수술이나 외상 경력이 있는 경우는 69.6%, 만성중이염이 있는 경우는 91.3%, 당뇨병이 있는 경우는 21.7% 있었고, 세균이나 다른 진균이 분리된 경우는 34.8%였다. 80명의 환자 중 추가 귀검체 배양에서 효모균이 분리된 환자는 9명(*C. auris* 분리 환자 4명 포함)이었다. 그러나 전체적으로 80명 중 2명의 환자(*C. auris*와 *C. guilliermondii*)에서만 배양 전과 배양 후에 항진균제 치료를 받았고, 이들은 이후 1년이 넘는 기간 동안 증상이 호전 및 재발이 반복되고 있음이 확인되었다. 귀에서 분리된 주요 균종인 *C. parapsilosis* complex와 *C. auris*의 임상적 특성은 다른 효모균과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

DISCUSSION

본 연구에서는 최근 4년 동안 1개 대학병원 귀 검체에서 분리된 효모균의 균종 분포를 조사하였는데, *C. parapsilosis* (34.6%)가 가장 많았고, 다음으로는 *C. auris* (28.4%), *C. metapsilosis* (9.9%), *C. orthopsilosis* (8.6%) 및 *C. albicans* (7.4%)

순이었다. 이들 중 *C. parapsilosis*, *C. metapsilosis* 및 *C. orthopsilosis*의 세 균종은 *C. parapsilosis* complex에 속한다[19]. 국내외 보고에서 귀에서 분리된 효모 균종 중 *C. parapsilosis*가 가장 흔하다는 보고는 많으나[20], *C. parapsilosis* complex에 관한 보고는 거의 없다. *C. parapsilosis* complex에 속하는 균주들은 흔히 사용되는 상품화된 효모균 동정제품인 API ID 32 (bioMérieux), Vitek 2 시스템(Vitek 2 YST, bioMérieux) 혹은 ATB-Fungus III (bioMérieux) 등에 의해서는 *C. parapsilosis*로 모두 동일하게 동정되지만, internal transcribed spacer (ITS) 혹은 D1/D2 유전자 염기서열분석에 의해서 *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis* 혹은 *C. parapsilosis sensu stricto*의 세 가지 균종으로 분류된다[21]. *C. orthopsilosis*와 *C. metapsilosis*는 *C. parapsilosis sensu stricto*보다 임상 검체에서 상대적으로 드물게 분리되며, 특히 혈액에서 더욱 드물게 분리된다[21]. 최근에 도입된 MALDI-TOF MS Biotyper를 이용하면 *C. metapsilosis*와 *C. orthopsilosis*를 정확하게 동정할 수 있는데[22], 본 연구에서는 MALDI-TOF MS Biotyper와 추가적인 유전자 염기서열분석을 이용한 동정을 시행함으로써, *C. parapsilosis* complex가 최근 4년간 본 병원의 귀에서 분리되는 효모균의 약 절반(53.1%)을 차지하며 이 중 *C. parapsilosis sensu stricto*는 65.1%, *C. metapsilosis* 18.6% 및 *C. orthopsilosis* 16.3%임을 알 수 있었다.

조사기간인 2014년부터 2017년까지 본 검사실로 의뢰된 귀 검체 배양 건수는 각각 609, 513, 892, 707건으로 이를 통한 양성률은 2.6%, 3.1%, 2.1%, 4.2%였다. 2017년이 다른 연도에 비해 다소 높은 양성률을 보이긴 했으나 통계적 의의는 없었고, 2017년내 짧은 기간 내에 특정 균종의 증가는 확인되지 않았다. 최근 국내 한 연구에서는 약 2년 동안 귀 검체에서 *C. auris*가 분리된 79명의 환자의 나이는 평균 56세(43-65세)로 모두 성인이었다고 하였고[23], 또 다른 연구에서도 15명의 *C. auris*가 분리된 환자 중 12명이 성인이었으며 3명만이 소아임을 보고한 바 있다[9]. 본 연구에서도 *C. auris*가 모두 성인에서만 분리되었으나, 전체적으로 총 81주의 효모균이 성인 76명, 소아 5명에서 분리되어 *C. auris*뿐 아니라 다른 효모 균종도 주로 성인에서 분리됨을 알 수 있었다. 효모 균종이 주로 성인에서 분리된 이유에 대해서는 더 조사가 필요하겠으나 귀 검체 배양을 의뢰한 환자가 주로 이비인후과 성인 환자인 것이 하나의 이유일 가능성도 있다. 특히 국내에서 첫 보고된 *C. auris* 진균혈증 3예 중 2예가 1세의 소아 환자인 점을 감안할 때[11], 소아에서 *C. auris* 등의 감염이나 집락화에 대한 연구가 더 필요하다고 생각한다.

C. auris 균종은 흔히 사용되는 상품화된 효모균 동정제품으로 동정되기 어렵고, 리보솜 DNA의 ITS 부위나 D1/D2 부위 염기서열분석에 의해 정확히 동정될 수 있다[9]. 귀에서 분리된 칸디다는 임상적으로 거의 감염의 원인균으로는 간주되지 않기 때문에 미생물검사실에서 정규적으로 *C. auris*를 동정하지

않을 가능성이 있다. *C. auris*는 최근 검사실에서 사용되기 시작한 MALDI-TOF MS를 이용하여 동정이 가능하다고 알려져 있다[12]. 본 연구팀은 Biotyper 및 Vitek MS의 두 가지 MALDI-TOF MS의 research-use-only (RUO) library를 이용하여 국내에서 20년간 수집된 *C. auris* 균주 중 각각 83.6%와 93.4%가 정확하게 동정됨을 보고한 바 있다[24]. 본 연구에서는 MALDI-TOF MS Biotyper와 추가적인 유전자 염기서열분석을 이용한 동정을 시행함으로써 *C. auris*가 *C. parapsilosis* 다음으로 두 번째로 귀에서 가장 흔히 분리되는 효모 균종임을 확인할 수 있었다.

*C. parapsilosis*는 아시아, 라틴아메리카 및 유럽에서 *C. albicans*에 이어 혈액에서 두 번째로 흔하게 분리되는 칸디다 균종이다[21,25]. 다른 칸디다와는 달리 *C. parapsilosis*는 인체 점막 내 상재하기보다는 의료진의 손 등 피부에 존재하며[26], 병원 환경에 존재하여 중심정맥관이나 다른 의료기기를 통하여 혈류감염을 자주 유발한다[27,28]. *C. parapsilosis*는 대개 항진균제에 감수성을 보이지만 국내 혈액에서 분리되는 균주는 fluconazole에 내성을 보이기도 하는데[29], 본 연구결과 fluconazole과 voriconazole에 내성을 보이는 균주는 없었으나, fluconazole에 약제용량의존성 감수성인 균주가 7.1%, voriconazole에 중간내성인 균주가 7.1%였다.

세계 여러 나라에서 분리된 *C. auris* 균주의 항진균제 감수성 보고에 의하면, 이 균종이 지속적으로 높은 fluconazole MIC를 보이고 amphotericin B와 echinocandins에 대해 다양한 내성을 보인다[30-32]. 최근 다제내성 *C. auris*가 인도를 비롯한 아시아, 아프리카, 유럽 및 미국에서 보고되었고 이들은 주로 칸디다혈증을 유발하였다[30,31,33]. 현재 CLSI에서는 *C. auris*에 대한 CBP값을 제시하지 않았으나, 미국 질병관리본부에서는 유사 균종과 전문가 의견을 기반으로 임시로 CBP값을 정하였다[17]. 이러한 미국 질병관리본부에서 제공한 MIC breakpoints에 의해 파키스탄, 인도, 남아프리카 및 베네수엘라에서 온 *C. auris* 균주의 93%가 fluconazole 내성을 보였고, amphotericin B에 35%, echinocandins에 7% 내성을 보였고 다제내성 균주는 무려 41%였다[30]. 반면, 최근 국내에서 13개 병원 균주에서 fluconazole 내성은 62.3% (38/61)였으나, echinocandin 내성이나 다제내성은 없었다[24]. 본 연구결과에서 국내 1개 병원에서 최근 4년간 귀에서 분리된 *C. auris*는 echinocandin 내성이나 다제내성은 없었고 fluconazole 내성은 82.6%로서 본 병원이 국내 이전 성적보다 다소 높은 것을 알 수 있었다.

본 연구에서는 전체적으로 귀 검체 배양에서 가장 흔히 분리되는 효모 균종이 혈액 배양과 다소 차이가 있음을 보여주었다. 즉, 국내외 혈액배양에서 가장 흔하게 분리되는 효모 균종은 *C. albicans*로서 주로 인체 소화기관 점막에 존재하는 반면[34], 본 연구결과 귀에서 가장 흔하게 분리되는 균종은 *C. parapsilosis* complex와 *C. auris*로서 이들은 병원 환경에서 숙주

바깥에서 수주간 생존하고 지속적으로 존재하는 특성이 있다[27]. 국내 혈액에서 분리된 칸디다의 항진균제 감수성과 본 연구의 귀 분리 균주의 감수성을 비교해 볼 때 amphotericin B, caspofungin 및 micafungin 등의 내성은 거의 없었으나 fluconazole 내성에서 차이를 보였다. 즉, 국내 9개 병원 혈액배양에서 분리된 칸디다 항진균제 감수성 성적을 보면, 450주 중 16.0%가 fluconazole MICs가 4 $\mu\text{g/mL}$ 이상이었는데[35], 본 연구에서 귀에서 분리된 효모 균주 중 44.4% (36/81)가 fluconazole MIC가 4 $\mu\text{g/mL}$ 으로 훨씬 더 높았다. 이렇게 차이를 보이는 이유로는 귀에서 분리된 균종의 분포가 *C. auris* 23주 이외에 *C. guilliermondii* 2주, *C. ciferrii* 2주, *C. krusei* 1주, *C. utilis* 1주, *K. ohmeri* 1주 등의 fluconazole MIC가 내재성으로 증가된 드문 효모 균종이 상대적으로 더 많이 분리되는 까닭으로 생각된다.

본 연구에서 귀에서 분리되는 효모 균종은 주로 중이염 환자 (85.2%)에서 분리되었고, 항생제를 복용한 기왕력이 74.1%, 귀 수술 및 귀에 외상 경력이 59.3%로서 귀 효모균은 중이염, 항균제 사용 혹은 이전의 귀 수술 등과 연관이 있는 것으로 보인다[9,18]. 조직검사나 직접 검경 등에서 효모균, 가균사 혹은 진균사를 보이는 양성소견이 없기 때문에 판정하기 어려우나, 전체적으로 항진균제 치료를 받은 환자가 거의 없었고, 세균이나 다른 균사형 진균과 함께 분리된 예들이 상당수 있음을 고려할 때 귀에서 분리되는 효모 균종들은 대부분 감염의 원인균이라기보다 중이에 존재하는 상재균일 가능성이 있다[5]. 면역약화가 없는 중이 내에서 만성 비후성 염증으로 점액의 생산증가는 *C. parapsilosis* 같은 진균의 집락화를 촉진할 수 있다는 가능성이 이미 보고된 바 있다[21]. 그러나 세균감염에 따른 항균제 사용은 2차 진균감염을 유발할 수 있으며, 이미 염증이 있는 귀에서는 진균이 병독성을 가질 수 있어, 중이염을 악화시킬 수도 있다[36,37]. 또한 다양한 기저질환을 가진 환자에서 항생제 및 스테로이드와 같은 약제나 각종 처치 및 기구 사용과 연관되어 진균에 의한 귀감염증이 나타날 수 있으며 다양한 항진균제가 그 치료에 이용되고 있다[18].

본 연구에서는 대부분의 환자가 이비인후과 외래를 내원한 환자였고, 80명 중 2명(2.5%)에서만 항진균제 치료가 시행되었다. 이러한 성적은 귀에서 분리된 효모균의 대부분이 감염의 원인균이라기보다는 집락화 균주로 판정되었음을 보여준다. 앞서 언급한 최근 국내 한 병원의 약 2년간 귀에서 분리된 79주의 *C. auris*를 분석한 연구에서, 본 연구와 유사하게 모두 성인에서 분리되었고, 귀 수술률(56%), 만성중이염(87%) 및 당뇨병(19%)과 연관되었다[23]. 또한 이 연구에서는 *C. auris* 대부분은 귀에 집락화한 균주였으나, 귀에 침습성 감염이 6% (5예) 있었다고 하였다[23]. *C. auris*는 드물지만 외이염, 혹은 중이염 뿐 아니라 유아돌기염의 원인이 될 수 있어, 감염인 경우 외과적 절제와 적절한 항진균제 치료제로 치료되어야 한다[38-40].

또한 국내 환자의 귀배양에서 분리된 *C. auris*는 국내에서 혈류 감염을 유발한 균주와도 유전자형이 유사함이 밝혀져[24], 드물긴 하겠지만 국내 귀에서 분리된 *C. auris*는 면역약화나 위험 인자가 있는 환자에서는 혈류감염을 유발할 가능성이 있다. 따라서 귀에서 효모균이 분리되는 경우 적절한 균종의 동정과 이에 따른 환경소독, 손 위생 등의 적절한 주의가 필요할 수 있으며, 감염의 원인균인지 여부를 결정하여 항진균제 치료를 시행하여야 한다[40]. 이상 본 연구의 결과를 요약하면, 최근 4년 동안 1개 대학병원의 귀에서 분리된 효모 균주를 분석한 결과, *C. parapsilosis* complex와 *C. auris*가 귀에서 분리되는 효모 균주의 대부분을 차지하며, 상대적으로 fluconazole에 내성을 보이는 균주가 많음을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Jorgensen J, Pfaller M, et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. Washington: ASM Press; 2015:295.
- Kashyap S, Pandey A, Thakuria B, Saxena AK, Asthana AK, Madan M. Resistant microorganisms isolated from cases of chronic suppurative otitis media: a therapeutic concern. Nat J Lab Med 2017;6:MC01-6.
- Dagan R. Clinical significance of resistant organisms in otitis media. Pediatr Infect Dis J 2000;19:378-82.
- Rosenfeld RM, Schwartz SR, Cannon CR, Roland PS, Simon GR, Kumar KA, et al. Clinical practice guideline: acute otitis externa. Otolaryngol Head Neck Surg 2014;150(1 Suppl):S1-24.
- van Cauwenberge PB, Vander Mijnsbrugge AM, Ingels KJ. The microbiology of acute and chronic sinusitis and otitis media: a review. Eur Arch Otorhinolaryngol 1993;250 Suppl 1:S3-6.
- Kumar H and Seth S. Bacterial and fungal study of 100 cases of chronic suppurative otitis media. J Clin Diagn Res 2011;5:1224-7.
- Ali K, Hamed MA, Hassan H, Esmail A, Sheneef A. Identification of fungal pathogens in otomycosis and their drug sensitivity: our experience. Int Arch Otorhinolaryngol 2018;22:400-3.
- Heo MS, Shin JH, Choi MJ, Park YJ, Lee HS, Koo SH, et al. Molecular identification and amphotericin B susceptibility testing of clinical isolates of *Aspergillus* from 11 hospitals in Korea. Ann Lab Med 2015;35:602-10.
- Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, Ryoo N, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. Clin Infect Dis 2009;48:e57-61.
- Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. Microbiol Immunol 2009;53:41-4.
- Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KH, et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. J Clin Microbiol 2011;49:3139-42.
- Mizusawa M, Miller H, Green R, Lee R, Durante M, Perkins R, et al. Can multidrug-resistant *Candida auris* be reliably identified in clinical microbiology laboratories? J Clin Microbiol 2017;55: 638-40.
- Prakash A, Sharma C, Singh A, Kumar Singh P, Kumar A, Hagen F, et al. Evidence of genotypic diversity among *Candida auris* isolates by multilocus sequence typing, matrix-assisted laser desorption

- ionization time-of-flight mass spectrometry and amplified fragment length polymorphism. *Clin Microbiol Infect* 2016;22:277.e1-9.
14. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
 15. CLSI. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. CLSI document M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
 16. Pfaller MA, Diekema DJ. Progress in antifungal susceptibility testing of *Candida* spp. by use of Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution methods, 2010 to 2012. *J Clin Microbiol* 2012;50:2846-56.
 17. WHO. WHO web sites on fungal diseases. <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/health-professionals.html> [Online] (last visited on 25 March 2019).
 18. Viswanatha B and Naseeruddin K. Fungal infections of the ear in immunocompromised host: a review. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2011;3:e2011003.
 19. Tavanti A, Davidson AD, Gow NA, Maiden MC, Odds FC. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. *J Clin Microbiol* 2005;43:284-92.
 20. Vennewald I, Schönlebe J, Klemm E. Mycological and histological investigations in humans with middle ear infections. *Mycoses* 2003;46:12-8.
 21. Silva AP, Miranda IM, Lisboa C, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. *J Clin Microbiol* 2009;47:2392-7.
 22. Lee HS, Shin JH, Choi MJ, Won EJ, Kee SJ, Kim SH, et al. Comparison of the Bruker Biotyper and VITEK MS matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry systems using a formic acid extraction method to identify common and uncommon yeast isolates. *Ann Lab Med* 2017;37:223-30.
 23. Jung J, Kim MJ, Kim JY, Lee JY, Kwak SH, Hong MJ, et al. *Candida auris* colonization or infection of the ear: a single-center study in South Korea from 2016 to 2018. *Med Mycol* 2019;myz020. doi: 10.1093/mmy/myz020. [Epub ahead of print]
 24. Kwon YJ, Shin JH, Byun SA, Choi MJ, Won EJ, Lee D, et al. *Candida auris* clinical isolates from South Korea: identification, antifungal susceptibility, and genotyping. *J Clin Microbiol* 2019;57:e01624-18.
 25. Tay ST, Na SL, Chong J. Molecular differentiation and antifungal susceptibilities of *Candida parapsilosis* isolated from patients with bloodstream infections. *J Med Microbiol* 2009;58(Pt 2):185-91.
 26. Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, et al. Survival, persistence, and isolation of the emerging multidrug-resistant pathogenic yeast *Candida auris* on a plastic health care surface. *J Clin Microbiol* 2017;55:2996-3005.
 27. Trofá D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:606-25.
 28. van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*: a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility. *Crit Rev Microbiol* 2009;35:283-309.
 29. Choi YJ, Kim YJ, Yong D, Byun JH, Kim TS, Chang YS, et al. Fluconazole-resistant *Candida parapsilosis* bloodstream isolates with Y132F mutation in *ERG11* gene, South Korea. *Emerg Infect Dis* 2018;24:1768-70.
 30. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, Farooqi J, Chowdhary A, Govender NP, et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by whole-genome sequencing and epidemiological analyses. *Clin Infect Dis* 2017;64:134-40.
 31. Chowdhary A, Anil Kumar V, Sharma C, Prakash A, Agarwal K, Babu R, et al. Multidrug-resistant endemic clonal strain of *Candida auris* in India. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33:919-26.
 32. Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, Masih A, Kumar A, et al. Multidrug-resistant *Candida auris* misidentified as *Candida haemulonii*: characterization by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and DNA sequencing and its antifungal susceptibility profile variability by Vitek 2, CLSI broth microdilution, and Etest method. *J Clin Microbiol* 2015;53:1823-30.
 33. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006290.
 34. Dobb KS, Kaye SJ, Beckmann N, Thain JL, Stateva L, Birch M, et al. Characterisation of the *Candida albicans* phosphopantetheinyl transferase Ppt2 as a potential antifungal drug target. *PLoS One* 2015;10:e0143770.
 35. Won EJ, Shin JH, Choi MJ, Lee WG, Park YJ, Uh Y, et al. Antifungal susceptibilities of bloodstream isolates of *Candida* species from nine hospitals in Korea: application of new antifungal breakpoints and relationship to antifungal usage. *PLoS One* 2015;10:e0118770.
 36. Verhoeff M, van der Veen EL, Rovers MM, Sanders EA, Schilder AG. Chronic suppurative otitis media: a review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:1-12.
 37. Ibekwe AO, al Shareef Z, Benayam A. Anaerobes and fungi in chronic suppurative otitis media. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997;106:649-52.
 38. Pekard-Amenitsch S, Schriebl A, Posawetz W, Willinger B, Kölli B, Buzina W. Isolation of *Candida auris* from ear of otherwise healthy patient, Austria, 2018. *Emerg Infect Dis* 2018;24:1596-7.
 39. Schwartz IS and Hammond GW. First reported case of multidrug-resistant *Candida auris* in Canada. *Can Commun Dis Rep* 2017;43:150-3.
 40. Yang A, Carlton DA, Hamula C, Patel G, Iloretta AMC. First prospectively identified case of *Candida auris* in the United States. *Otolaryngol Case Rep* 2017;5:6-7.

=국문초록=

귀 검체에서 분리된 효모 균종과 항진균제 감수성 성적

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실

권용준, 변승아, 최민지, 원은정, 김수현, 신종희

배경: *Candida auris*는 우리나라와 일본 환자의 귀배양에서 처음 분리 보고된 바 있으나, 귀 검체에서 분리되는 효모균의 균종 분포 및 항진균제 감수성에 관해서는 알려진 바가 많지 않다.

방법: 본 연구는 1개 대학병원에서 2014년 1월부터 2017년 12월까지 최근 4년 동안 귀 검체에서 분리된 효모균의 균종 분포를 알아보고, 분리 균주의 항진균제 감수성 성적을 조사하였다. 효모균의 동정은 matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry를 이용하여 시행하였고, 필요한 경우 염기서열분석법을 시행하였다. 각 균주의 항진균제 minimal inhibitory concentrations (MICs) 검사는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 액체배지미량희석법을 이용하여 시행하였다.

결과: 해당 기간동안 귀에서 분리된 효모균은 총 81주로서 *Candida parapsilosis* (28주, 34.6%)가 가장 많았고, 다음으로는 *C. auris* (23주, 28.4%), *Candida metapsilosis* (8주, 9.9%), *Candida orthopsilosis* (7주, 8.6%), *Candida albicans* (6주, 7.4%) 순이었다. Fluconazole, voriconazole, amphotericin B, caspofungin 및 micafungin에 대한 MIC 분포는 각각 0.125->64 $\mu\text{g/mL}$, ≤ 0.03 -4 $\mu\text{g/mL}$, 0.25-1 $\mu\text{g/mL}$, 0.125-1 $\mu\text{g/mL}$ 및 ≤ 0.03 -2 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 전체 균주 중 fluconazole MIC가 4 $\mu\text{g/mL}$ 이상인 균주는 총 36주(44.4%)였다. 특히 *C. auris* 23주 중 19주(82.6%)가 fluconazole에 MIC 32 $\mu\text{g/mL}$ 이상이었다. 균주 대부분은 만성 중이염 환자(85.2%)에서 분리되었다.

결론: *C. parapsilosis* complex와 *C. auris*는 귀에서 분리되는 효모 균주의 대다수를 차지하였다. 특히, *C. auris*는 대부분 fluconazole에 내성을 보였으며, 그 외 다른 균종들 역시 상대적으로 fluconazole MIC가 높은 것을 알 수 있었다. [Ann Clin Microbiol 2019;22:81-89]

교신저자 : 신종희, 61469, 광주시 동구 제봉로 42
전남대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 062-220-5342, Fax: 062-224-2518
E-mail: shinjh@chonnam.ac.kr