

Real-time PCR법을 이용한 *Candida glabrata*의 Azole 내성 유전자 발현 분석: Northern 교잡법과의 비교

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실

채명종 · 송정원 · 신종희 · 이진솔 · 김수현 · 신명근 · 서순팔 · 양동욱

= Abstract =

Comparison of Real-Time Quantitative PCR with Northern Hybridization for Quantification of *CgCDR1* and *CgCDR2* Gene Expression in *Candida glabrata*

Myung Jong Chae, Jung Won Song, Jong Hee Shin, Jin Sol Lee, Soo Hyun Kim, Myung Geun Shin, Soon Pal Suh and Dong Wook Ryang

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

Background: One of main mechanisms responsible for acquired azole resistance of *Candida glabrata* is the increased drug efflux mediated ABC transporters, which are encoded by *CgCDR1* and *CgCDR2* genes.

Objectives: We compared real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR) with northern hybridization for quantitative analysis of *CgCDR1* and *CgCDR2* expression in bloodstream isolates of *C. glabrata*.

Methods: Nineteen blood isolates of *C. glabrata* were selected, including nine fluconazole susceptible (MIC ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$), nine susceptible dose-dependent (S-DD, MIC 16~32 $\mu\text{g/ml}$), and one resistant (MIC 128 $\mu\text{g/ml}$), isolates. The expression of *CgCDR1* and *CgCDR2* was quantified using real-time RT-PCR with ROTOR Gene 3000 (Corbett research, Austria). The results were compared with northern hybridization with sequence-specific probes.

Results: Correlation of quantification results between real-time RT-PCR and northern hybridization yielded correlation coefficients of 0.92 for *CgCDR1* and 0.82 for *CgCDR2* gene. By both methods, no significant differences were observed in the levels of expression of *CgCDR1* and *CgCDR2* between fluconazole-susceptible isolates and S-DD isolates. In contrast, a strain with high fluconazole resistance (MIC 128 $\mu\text{g/ml}$) revealed a greater abundance of *CgCDR1* by both methods, compared to the other isolates.

Conclusion: This study show that real-time PCR method for *C. glabrata* RNA quantification correlates well with traditional northern hybridization and can be a valuable alternative to northern hybridization for rapid quantification of *CgCDR1* and *CgCDR2* genes in clinical isolates of *C. glabrata*.

[Kor J Med Mycol 2008; 13(2): 43-52]

Key Words: *Candida glabrata*, Real time PCR, Northern hybridization, Resistance, Mechanisms

†별책 요청 저자: 신종희, 501-757 광주광역시 동구 학1동 8번지, 전남대학교병원 진단검사의학과
전화: (062) 220-5342, Fax: (062) 224-2518, e-mail: shinjh@chonnam.ac.kr

*본 논문의 일부는 전남대학교병원 임상의학연구소 학술연구비 (CUHRICM-2007-024)에 의하여 연구되었음.

서 론

*Candida glabrata*는 정상인에 상재하는 흔한 칸디다 균종의 하나로 최근 혈류감염의 주요 원인균으로 대두되고 있다¹. *C. glabrata*에 의한 혈류감염은 치료가 어려우며 치명율이 높다고 알려져 있다^{2,3}. 그 이유 중의 하나는 이 균종이 다른 칸디다 균종들에 비해 내재성으로 azole 항진균제에 대한 낮은 감수성을 보이며, fluconazole에 노출 후 단시간 이내에 azole 고도내성을 획득할 수 있기 때문이다⁴⁻⁶. *C. glabrata*가 azole 내성을 획득하는 주요 기전 중의 하나는 약물 유출펌프를 코딩하는 *C. glabrata CDR1 (CgCDR1)* 및 *CgCDR2* 유전자의 과발현이다⁴⁻⁶. 따라서 *C. glabrata* 균주의 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자의 발현양을 측정하는 것은 해당 균주의 fluconazole 내성 기전을 이해하고 내성 균주의 출현을 추적하는데 있어 유용한 방법이 될 수 있다⁷.

고전적으로, northern 교잡법을 이용한 mRNA 정량은 칸디다에서 유전자 발현을 분석하는데 있어 가장 좋은 방법으로 알려져 왔다⁷. 그러나 이 방법은 노동력이 많이 들고, 많은 단계를 거쳐야 하는 번거로움이 있고, 상대적으로 더 많은 양의 RNA를 필요로 하며, 유전자 발현에 있어 적은 변화를 알아내는데 민감도가 부족하다고 알려져 있다. 반면, 최근 소개된 정량적 실시간 역전사 중합효소연쇄반응 (real-time reverse-transcription PCR, real-time PCR법)법은 신속하며 민감하고, 또 재현성이 높은 방법으로 인정되어 임상미생물학 분야를 포함한 다양한 분야에서 유전자 발현을 측정하는데 성공적으로 이용되어 오고 있다^{7,8}. 그런데, 아직까지 *C. glabrata* 균주에서 azole 항진균제 내성과 연관된 유전자의 발현을 northern 교잡법과 real time PCR법으로 동시에 정량하여 두 가지 방법을 비교한 연구는 접하기 어렵다. 이에 본 연구에서는 혈액에서 분리된 *C. glabrata* 균주를 대상으로 *C. glabrata*의 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자 발현 정도를 real-time PCR법과 northern

교잡법으로 동시에 분석하고 이를 비교하여 보았다.

대상 및 방법

1. 대 상

전남대학교병원 환자의 혈액에서 분리된 *C. glabrata* 19주를 대상으로 하였고 대조 균주로 *C. glabrata* ATCC 90030를 이용하였다. 대상 균주는 1998년부터 2004년 사이에 전남대학교병원에서 분리되었고 *C. glabrata* 균종의 동정은 혈액한천배지나 Sabouraud dextrose agar에 계대배양한 후 발아관 시험, API 20C (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) 및 Vitek 2 YST system (bioMérieux) 검사 성적, 그리고 cornmeal agar와 CHROMagar Candida (BBL, Beckton Dickinson, Sparks, MD)에서 48시간 배양 후 형태관찰 등을 이용하여 동정하였다.

2. 항진균제 감수성 검사

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M27의 지침⁹에 따라 broth microdilution법으로, fluconazole (Diflucan, 한국화이자, Korea), voriconazole (Pfizer Global Research & Development, Sandwich, UK), itraconazole (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium)에 대해 MIC (minimal inhibitory concentrations)를 검사하였다. 사용한 배지는 L-glutamine이 든 RPMI-1640 배지 (Gibco, Gaithersburg, USA)로서 0.165 M MOPS를 사용하여 pH를 7.0으로 맞추었다. 최종 칸디다 균액은 분광광도계를 이용하여 mL 당 $0.5 \sim 2.5 \times 10^3$ 개로 하였다. 균 접종이 끝난 microplate는 35°C에서 48시간 동안 배양하였다. 결과 판정은 육안으로 성장대조 well에 비해 성장이 현저히 감소된 지점 (score 2)를 MIC로 판정하였다. 이때 검사자에 의한 오차를 방지하기 위하여 두 사람의 관찰자가 맹검으로 판정하였다. 정도 관리를 위하여 매 검사 때마다 *C. parapsilosis* ATCC 22019 및 *Candida krusei* ATCC 6258의 두 주의 표준 균주를 검사하

였다. 각 균주의 항진균제 감수성 및 내성 판정은 fluconazole과 itraconazole의 경우 CLSI에서 제시한 MIC breakpoint에 따라⁹, voriconazole의 경우, Pfaller 등의 성적¹⁰을 기준으로 하였다.

3. Azole 내성 유전자 발현량 검사

CgCDR1 및 *CgCDR2* 유전자의 발현 검사를 위한 RNA 추출과 real-time RT-PCR법은 이전에 보고된 방법에 따라 상대적 정량 분석을 시행하였다⁴.

1) RNA 추출

전체 RNA 추출을 위해 각 균주는 10 mL의 Sabouraud dextrose broth (SDB, Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA)에서 35°C로 하루 밤 배양한 후 다시 새 SDB로 옮겨 흔들면서 계속 배양하여, mid-exponential phase (optical density at 600 nm에서 OD, 약 0.6)에 도달한 *C. glabrata* 배양액을 취하였다. *C. glabrata* 배양액을 5분간 3000 g로 원심 분리한 후 3 mL의 phosphate-buffered saline (PBS)으로 한번 세척하였다. Glass bead를 이용하여 기계적으로 칸디다 세포를 손상시킨 후 RNAeasy Protect mini KIT (Qiagen, Hilden, Germany)로 세포를 용해시켰다. RNA 순도는 자외선 분광광도계 (Nanodrop technology, San Diego, CA, USA)에서 260과 280 nm에서의 흡광도의 비 (OD_{260}/OD_{280} absorption ratio)를 측정하여 1.95 이상임을 확인하였다. 염색체 DNA 오염을 제거하기 위하여 RNA 검체는 15 μ L RNA 당 2 units의 DNase I (Roche, Mannheim, Germany)로 37°C에서 1시간 동안 처리하였다.

2) cDNA 합성

RT 반응액은 1st Strand cDNA synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 200 ng RNA, 200 U MMLV reverse transcriptase, 0.2 μ M dNTP, 40 U RNase inhibitor 및 250 ng random primer p(dN)₆을 넣어 총 20 μ L의 양으로 시행하였다. 합성된 cDNA는 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하고 자외선 분광광도계 (Nanodrop technology)를 이용

하여 A_{260} 및 A_{280} 에서 정량하였다.

3) 정량적 real-time PCR

CgCDR1 및 *CgCDR2* 유전자 발현의 상대적 정량 검사는 ROTOR Gene 3000 (Corbett research, Sydney, Australia)을 이용한 real time PCR법으로 시행하였다. 각각의 반응에 사용한 *CgCDR1* 시발체 쌍 (TAGCACATCAACTACACGAACGT; AG-AGTGAACATTAAGGATGCCAT-G) 및 *CgCDR1* probe (6FAM-TGCTGCTGCTTCTGCCACCTGGTT-BHQ-1), *CgCDR2* 시발체 쌍 (GTGC-TTTATGA-AGGCTACCAGATT; TCTTAGGACAGAAGTAA-CCCATCT) 및 *CgCDR2* probe (6FAM-TACCTTT-GCGTGCTGGGCGTCACC-BHQ-1), 그리고 *URA3* 대조 유전자 시발체 쌍 (GAAAACCAATCTTT-GTGCTTCTCT; CATGAGTCTTAAG-CAAGCA-AATGT) 및 *URA3* probe (Hex-ACGTCACCACC-ACCAGCGAATTGC-BHQ-1)는 Operon Biotechnologies (Huntsville, AL, USA)에서 제조되었다. Real-time PCR은 Quantitect PCR probe kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 2 \times Quantitect buffer, 각 시발체 쌍 0.25 μ M, probe 0.1 μ M 및 cDNA 8 μ L를 넣어 총 25 μ L의 양으로 시행하였다. 온도 조건은 95°C에서 15분간 전변성 반응 후, 95°C 15초, 59°C 60초의 2단계를 한 주기로 45주기를 반복하였다.

각각의 azole 내성 유전자 정량에 대한 표준곡선은 내성 균주에서 얻은 각 유전자 (*CgCDR1*, *CgCDR2* 및 *CgURA3*) cDNA를 세정한 후 10배 순차적 희석을 하여 PCR을 시행한 후 작성하였다 (Fig. 1). 유전자의 증폭 효율은 *CgCDR1*, *CgCDR2* 및 *CgURA3* 유전자에서 각각 1.07, 1.06 및 1.15이었다. 각 유전자의 농도는 Corbett research software의 도움으로 각각의 표준곡선을 참조하여 계산하여 대상 유전자 (*CgCDR1* 및 *CgCDR2*) 및 housekeeping (*CgURA3*) 유전자의 비로서 표시하였다. 모든 균주에서 각 검사 결과는 *C. glabrata* ATCC 90030 균주 (1.0으로 정함; fluconazole의 MIC, 8 μ g/mL)를 기준으로 상대적 배수로 표시하였다. Real-time PCR은 각 균주 당

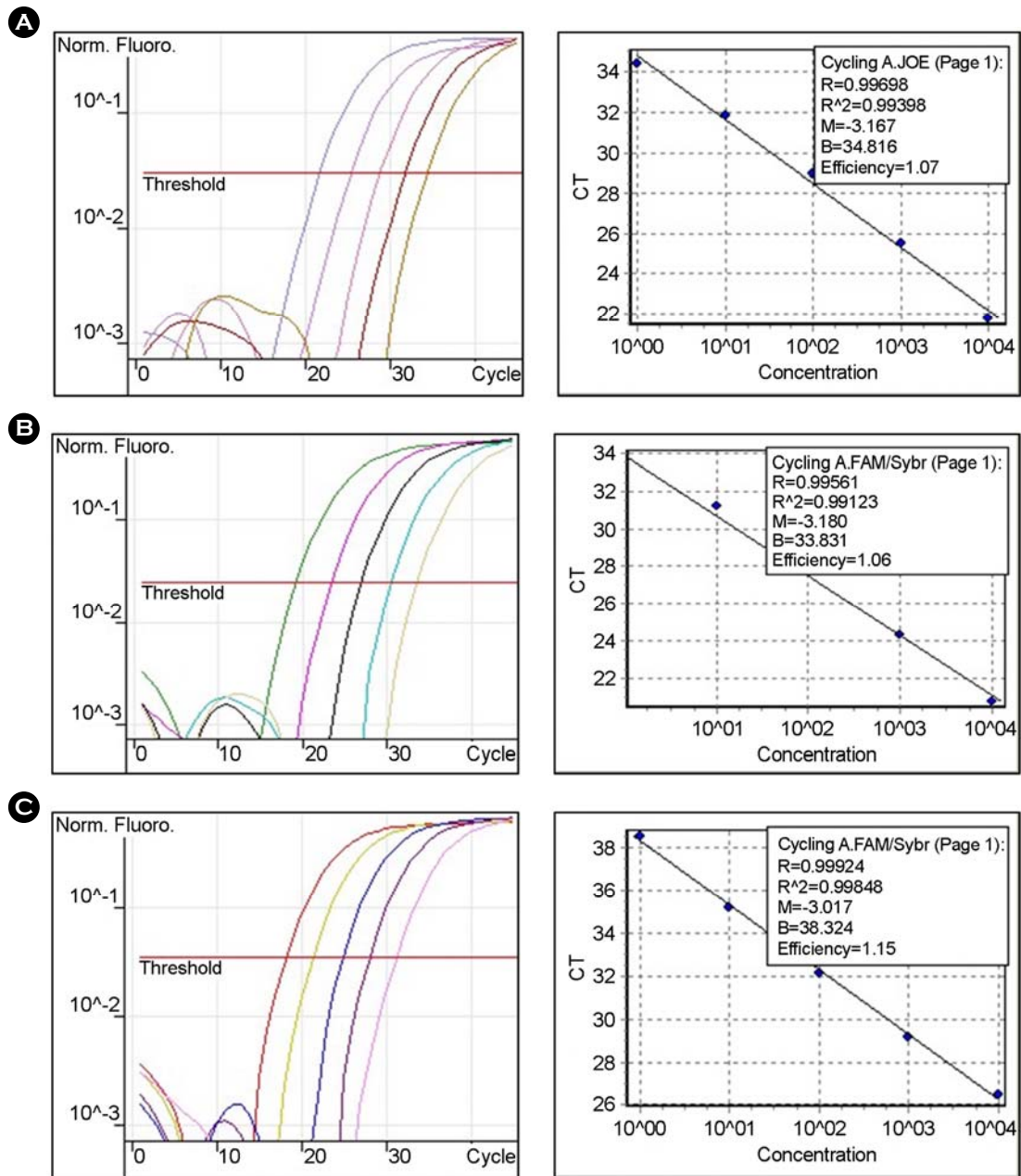


Fig. 1. Standard curves from 10-fold serial dilutions of cDNA of *C. glabrata* genes *CgCDR1* (A), *CgCDR2* (B) and *CgURA3* (C). For the standard curves, log concentration of each standard was plotted against the cycle number where fluorescence emerged from background during amplification. The E (efficiency) value and R value (Pearson's r) are shown for each standard curve.

3회 시행하였는데 CV (coefficient of variation) 값은 18% 이내이었다.

4. Northern 교잡법을 이용한 유전자 발현 분석

Northern 교잡법은 기존의 보고된 방법을 변형하여 실시하였다¹¹. *CgCDR1* 및 *CgCDR2*의 발현

을 검사하였으며 Housekeeping 유전자인 *CgURA3* 수치를 사용하여 적정화 (normalization)하였다. Northern 교잡법은 5 µg의 총 RNA를 1.2% agarose gel에서 전기영동으로 분리한 후 나일론 막 (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, ID, USA)에 부착시켰다. *CgCDR1*, *CgCDR2* 및 *CgURA3* 탐색자는 *CgCDR1* 시발체 쌍 (CTCCGCTTACCTACGTCAACC; CCCAAGTACTCACCA-CAAGTC)와 *CgCDR2* 시발체 쌍 (GGGATAACGCTAGGAGAGG; GGTATGCAAGAGGGTTGATG),

CgCDR2 시발체 쌍 (GTGCTTTATGAAGGCTAC-CAGATT; TCTTAGGACAGAA-GTAACCCATCT)을 이용하여 각각 PCR을 시행하고, ³²P-dCRP로 무작위 표지하여 제작하였다¹². 나일론 막은 서로 다른 세 가지 P³²탐색자 (*CgCDR1*, *CgCDR2* 및 *CgURA3*)로 각각 교잡시켰다. 막은 세척한 후 필름에 자가 방사 노출하여 이미지를 디지털카메라로 촬영하였다. Northern 교잡법에 의한 각 균주의 band density는 Gel Documentary system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 숫자화 하였

Table 1. Quantification of *C. glabrata* *CgCDR1* and *CgCDR2* mRNA by RT real-time PCR and northern hybridization

Isolate No.	MICs (µg/ml)*			Flu Susceptibility Category†	Gene Expressed (Fold Increase‡)			
					RT Real Time PCR		Northern Hybridization	
	Flu	Itra	Vori		<i>CgCDR1</i>	<i>CgCDR2</i>	<i>CgCDR1</i>	<i>CgCDR2</i>
1	4	0.125	0.125	S	0.8±0.05	3.4±0.59	0.8	2.7
2	8	0.25	0.06	S	3.0±0.18	1.2±0.08	2.5	2.3
3	8	0.125	0.25	S	1.9±0.03	1.3±0.16	1.1	1.4
4	8	0.25	0.25	S	1.9±0.03	4.7±0.70	1.0	3.0
5	8	0.25	0.25	S	3.8±0.29	1.7±0.02	3.1	2.2
6	8	0.5	0.25	S	5.2±0.74	2.8±0.37	5.0	2.4
7	8	0.25	0.06	S	2.1±0.32	3.9±0.24	1.3	2.8
8	8	0.25	0.06	S	1.5±0.07	5.5±0.14	1.3	5.0
9	8	0.25	0.03	S	1.4±0.02	1.0±0.18	1.0	0.9
10	16	1	0.5	S-DD	3.3±0.25	2.6±0.14	2.8	1.6
11	16	1	0.5	S-DD	3.2±0.35	2.8±0.14	2.9	2.4
12	16	1	0.5	S-DD	3.0±0.08	4.5±0.01	2.4	3.1
13	16	0.5	0.25	S-DD	2.5±0.36	1.6±0.15	1.2	1.9
14	16	1	0.25	S-DD	2.6±0.21	4.7±0.37	1.5	3.2
15	32	2	0.5	S-DD	3.1±0.06	2.8±0.15	3.4	3.5
16	32	2	0.5	S-DD	3.1±2.86	3.0±0.14	2.6	2.9
17	32	1	0.5	S-DD	2.0±0.25	4.5±0.09	1.4	3.9
18	32	1	0.5	S-DD	2.3±0.33	3.2±0.10	1.9	3.1
19	128	4	2	R	145±2.12	3.5±0.60	18.7	2.8

* Flu, fluconazole; Itra, itraconazole; Vori, voriconazole.

† S, susceptible (fluconazole MIC, ≤8 µg/mL); S-DD, susceptible dose dependent (MIC, 16 to 32 µg/mL); R, resistant (MIC, ≥64 µg/mL).

‡ The values represent increases in the levels of gene expression relative to that of *C. glabrata* ATCC 90030 (set as 1.0). The values (mean ± SD) obtained by real-time RT-PCR are averages of three independent experiments. The values obtained by northern hybridization was accomplished using densitometry of signals

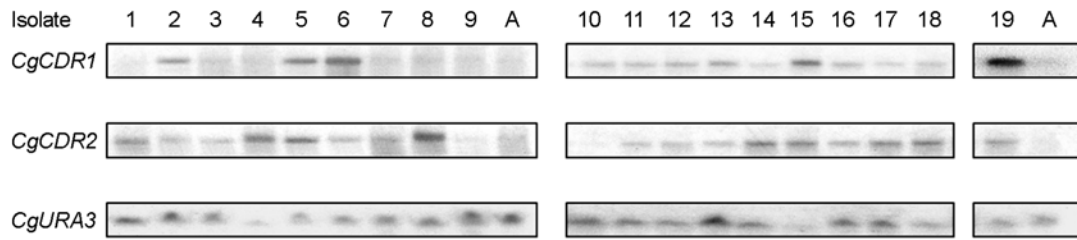


Fig. 2. Quantification of *CgCDR1* and *CgCDR2* mRNA by northern hybridization for 19 blood isolates of *C. glabrata* (isolates 1~19). See Table 2 for detailed information on each isolate. Expression of drug resistance genes was normalized to that of *CgURA3* expression in the same isolate. A, *C. glabrata* ATCC 90030.

고, 모든 균주에서 각 검사 결과는 *C. glabrata* ATCC 90030 균주 (1.0으로 정함)를 기준으로 상대적 배수로 표시하였다.

5. 통계처리

Fluconazole 감수성, 약제의존성 감수성 및 내성 균주에 대한 각 유전자 발현 정도의 차이는 Student t test를 이용하여 검정하였고 *p* 값이 0.05 이하인 경우 유의있는 것으로 간주하였다. 각 유전자에 대한 real time RT-PCR과 northern 교잡법의 상관성을 알아보기 위해 Pearson's correlation coefficient *r* 값을 구하였다.

결 과

대상 19주의 세 가지 azole 항진균제에 대한 생체 외 감수성 성적 및 real time PCR법과 northern 교잡법에 의한 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자 발현 정도는 Table 1에 표시하였다. Fluconazole MIC 성적으로 분류할 때 fluconazole 감수성인 균주 (MIC, 4~8 µg/mL)가 9주 (1~9번 균주), 약제의존성 감수성 균주 (MIC, 16~32 µg/mL)가 9주 (10~18번 균주), 그리고 내성 균주 (MIC, 128 µg/mL)가 1주 (19번 균주)이었다.

Real time PCR법에 의한 azole 내성 유전자 정량 결과를 표준 균주와 비교하여 배수로 표시했을 때, fluconazole에 감수성인 9주의 경우 *CgCDR1* 발현 정도는 평균 2.4±1.4배 (0.8~5.2 배)이었고 약제의존성 감수성인 9주는 평균 2.8±0.5배 (2.0~3.3배)로서 두 군간에 차이를 보이

지 않았다 (*p*>0.05). *CgCDR2* 또한 fluconazole에 감수성인 9주의 경우 평균 2.8±1.6배 (1.0~5.5 배), 약제의존성 감수성인 9주는 평균 3.3±1.1배 (1.6~4.7배)로서 서로 유의 있는 차이를 보이지 않았다 (*p*>0.05). 반면 fluconazole MIC가 128 µg/mL로서 fluconazole 내성인 1주의 경우 표준 균주에 비해서 *CgCDR1* 유전자는 145배로 검사 균주 중 가장 높은 수치를 보였고, *CgCDR2*는 3.5 배로서 다른 균주와 유사하였다.

Fig. 2는 northern 교잡법에 의한 *CgCDR1*, *CgCDR2* 및 *CgURA3* 유전자 발현 정도를 보여주는 결과이다. *CgCDR1* 및 *CgCDR2* band density는 Gel Documentary system을 이용하여 *CgURA3* band density에 비교하여 숫자화하였다. 그 결과를 표준 균주와 비교하여 배수로 나타냈을 때, fluconazole 감수성인 9주의 경우 *CgCDR1* 유전자 발현 정도는 평균 1.9±1.4배 (0.8~5.0배)이었고 약제의존성 감수성인 9주는 평균 2.2±0.8배 (1.2~3.4배)로서 두 군간에 차이를 보이지 않았다 (*p*>0.05). *CgCDR2*는 fluconazole 감수성 9주의 경우 평균 2.5±1.1배 (0.9~5.0배), 약제의존성 감수성인 9주는 평균 2.8±0.7배 (1.6~3.9배) 균주의 fluconazole MIC에 따른 유전자 발현의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다 (*p*>0.05). 반면, fluconazole 내성인 1주의 경우 표준 균주에 비해서 *CgCDR1* 유전자 발현 정도는 18.7배로 역시 검사 균주 중 가장 높았고, *CgCDR2*는 2.8배로서 다른 검사 균주와 유사하였다. 전체적으로 real-time PCR을 이용한 *CgCDR1* 유전자의 정량 분석 결과는 northern 교잡법과 비교할 때 상관계수가 0.92이었고,

CgCDR2의 경우 0.84이었다.

고 찰

*C. glabrata*는 내재성으로 azole 항진균제에 대한 감수성이 저하되어 있는 칸디다 균종이다¹⁻³. 칸디다 균종의 생체의 fluconazole 감수성 검사 성적에 의하면 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*의 경우 fluconazole MIC₅₀은 0.25~1 µg/mL 인데 비해, *C. glabrata*의 경우 8 µg/mL이었다^{13,14}. 또 최근 국내 혈액에서 분리된 *C. glabrata* 균주 중 6%가 fluconazole 내성으로 보고되었다¹⁴. 본 성적에서는 7년간 전남대학교병원 환자의 혈액에서 분리되어 보관중인 균주를 대상으로 fluconazole MIC별로 균주를 선택하고자 하였는데, 전체적으로 fluconazole 감수성 균주와 약제의존성 감수성 균주는 각각 9주씩 포함되었으나 보관된 균주 중 fluconazole 내성인 균주는 매우 드물어 내성 균주는 1주만이 포함되었다.

Fluconazole 치료 후 발생한 *C. glabrata*의 azole 획득내성은 두경부 방사성치료를 받은 후 발생한 구인두 칸디다증에서 처음 관찰되었고¹², 이어 조혈모세포 이식 환자의 구인두 배양에서 분리된 균주에서 fluconazole 예방요법을 시행한 평균 30일 후 거의 규칙적으로 fluconazole MIC가 2배 이상 증가함이 관찰되었다¹⁵. 또 최근에는 동일인의 혈액에서 연속 분리된 *C. glabrata*를 조사한 결과 획득내성이 관찰되었다⁴⁻⁶. 혈액에서 분리된 *C. albicans*를 비롯한 다른 칸디다 균종에서는 azole 획득내성의 보고가 거의 없는 반면, *C. glabrata*에서는 혈류감염 동안 단기간의 fluconazole 치료 후에도 azole 내성을 획득할 수 있는데, 그 이유로는 *C. albicans*를 비롯한 다른 칸디다 균종의 염색체는 배수체인 반면, *C. glabrata*는 반수체 (haploid)인 점에 기인하는 것으로 생각되고 있다³. 본 연구에서는 fluconazole 획득내성이 확인되어 본 연구자들이 이미 보고한 혈액분리 균주 1주가 포함되었다. 이 균주 (19번 균주)는 항진균제 치료를 받았던 신이식 환자

에서 분리되었는데, fluconazole, itraconazole, 및 voriconazole MIC가 각각 128, 4, 및 2 µg/ml로서 치료 전 혈액에서 분리된 균주에 비해 세 가지 azole 항진균제에 대한 MIC가 각각 2~3배의 증가된 균주이었다⁴.

*C. glabrata*의 azole 획득내성의 주요 기전으로는 ATP binding cassette (ABC) transporter 유전자인 CgCDR1 및 CgCDR2의 발현의 증가로 알려지고 있다^{5,15,16}. *C. glabrata*의 내성 유전자를 분석하는 초기 연구에서는 주로 잘 정립된 RNA 분석법인 northern 교잡법을 이용하였으나^{15,16} 최근에는 real time PCR법이 시도되고 있다^{4,5}. 그러나 real time PCR과 northern 교잡법을 동시에 실시한 연구는 아직 접하기 어렵다. 본 연구에서는 real-time PCR 법과 northern 교잡법의 두 가지를 동시에 이용하여 *C. glabrata*의 내성 유전자 발현을 분석하였는데, real-time PCR법은 각 균주 당 3회 이상 실시하였는데 비해, northern 교잡법은 한 번 시행할 경우에도 많은 노력과 시간 등이 많이 드는 까닭에 결과를 여러 번 다시 확인하기 어려운 단점이 있었다. 특히 본 연구에서도 reference 유전자 발현 정도가 서로 많은 차이를 보이고 있는데, 이는 한 번 시행한 결과로서 이에 따른 오차가 있을 가능성이 있다고 생각되었다. 본 연구에서 real-time PCR을 이용한 CgCDR1 유전자의 정량 분석 결과는 northern 교잡법과 비교할 때 상관관계수가 0.92이었고, CgCDR2의 경우 0.82이었다. 따라서 본 연구 결과는 real-time PCR을 이용한 *C. glabrata* 균주의 azole 내성 유전자 발현 검사가 northern 교잡법과 높은 상관성을 보임을 확인시켜 주었다.

Sanguinetti 등⁵은 fluconazole 내성 (MIC 64~256 µg/mL) 및 약제의존성 감수성 균주를 대상으로 연구한 결과 내성 균주 20주 중 18주에서는 CgCDR1 혹은 CgCDR2의 발현이 증가되어 있었고 약제의존성 감수성 9주에서는 증가 정도가 더 적었다고 하였다. 본 연구에서는 fluconazole 내성 균주가 1주 밖에 포함되지 않아 비교가 어려웠고, fluconazole 감수성 균주와 약제의존성 감수

성 균주사이의 유전자 발현 정도의 평균을 비교하여 보았는데, real time PCR법이나 northern 교잡법에 의한 성적 모두에서 두 균간에 의의 있는 차이를 관찰할 수 없었다. 이는 본 연구에 포함된 대상 균주의 fluconazole MIC가 2주 (4 µg/mL)와 128 µg/mL인 각 1주)를 제외하고는 17주 모두가 MIC 8~32 µg/mL사이의 3배 희석 배수 상에 모두 모여있어 전체적으로 fluconazole 내성이 유사한 특성에 기인한 것으로 생각된다. 이 균주들의 real-time PCR법에 의한 *CgCDR1* 값은 1.4~5.2배 사이의 범위였고 northern 교잡법에 의한 density는 1.0~5.0배 사이로서, 균주의 fluconazole MIC에 따른 유전자 발현의 유의한 차이는 관찰할 수 없었다.

본 연구에서 사용된 한 주의 azole 항진균제 내성 획득 균주는 real time PCR법에 의해 다른 균주에 비해 *CgCDR1* 유전자가 매우 과발현되어 있음을 이미 보고되었다⁴. 본 연구에서는 northern 교잡법을 이용하여 실험한 결과 이 내성균은 표준 균주에 비해 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자 발현양이 각각 18.7배 및 2.8배로서 azole계 내성 획득에 *CgCDR2*보다는 *CgCDR1*이 밀접한 연관이 있음을 다시 확인할 수 있었다. Sanguinetti 등⁵도 혈액에서 분리된 azole 내성 *C. glabrata* 균주에서 *CgCDR1*과 *CgCDR2* 발현빈도를 비교한 결과 *CgCDR1* 과발현은 거의 항상 높게 나오는 반면 *CgCDR2*는 중등도로서 이러한 소견은 *CgCDR2*보다 *CgCDR1*이 더 azole 내성에 연관이 있음을 시사한다고 하였다. 본 성적에서 내성 균주의 *CgCDR1* 발현 정도는 표준 균주에 비해 real time PCR법에 의해서는 145배, northern 교잡법에 의해서는 18.7배로서 real time PCR법이 northern 교잡법에 비해 상대적으로 더 발현 정도를 더 잘 검출할 가능성을 보여주었으나 좀 더 많은 내성 균주로 시험할 필요가 있었다.

본 논문의 제한점 중의 하나는 fluconazole 내성주가 1개 밖에 없었다는 것이다. 내성주가 감수성이나 약제 의존성 감수성주 같이 9주 정도였다면 두 방법의 상관계수가 더 신빙성이 있을

것이나 내성주가 1주 밖에 안 되는 본 연구에서 real time PCR과 northern 교잡법의 상관계수가 높다고 단정짓기는 어려움이 있다. 특히 실험에 사용된 1주의 내성주는 *CgCDR1* 유전자 발현이 높지만 *CgCDR2* 유전자 발현은 상대적으로 낮았는데, 추후 더 많은 내성주를 포함한 실험에서 이를 확인할 필요가 있었다.

최근 유전자 발현의 상대적 정량을 실험법으로 과거에 비해 real time PCR법으로 정착되고 있는 추세이다^{7,8}. Real time PCR의 도입은 핵산정량을 간단하게 하였고 특히 약제내성 기전 연구에 있어 내성 유전자 확인에 정확하고 재현성이 있는 결과를 얻을 수 있었다¹⁷. 본 연구 결과는 *C. glabrata* 균주의 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자 발현 검사에 있어 real-time PCR을 이용한 결과가 northern 교잡법과 높은 상관성을 보임을 보여주었다. 따라서 최근 칸디다의 의한 감염이 증가하고 항진균제 사용이 증가하는 추세에 맞추어¹⁸, real time PCR법은 칸디다 균주의 내성 기전 연구에 있어 northern 교잡법을 대체할 수 있는 보다 간편한 좋은 검사법으로 생각되었다.

결 론

*C. glabrata*가 azole 항진균제 획득내성을 얻는 주요 기전은 약물 유출펌프를 코딩하는 *C. glabrata CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자의 과발현이다. 본 연구에서는 혈액에서 분리된 *C. glabrata* 균주를 대상으로 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자 발현 정도를 real-time PCR법과 northern 교잡법으로 동시에 분석하여 다음의 결과를 얻었다

1. Real-time PCR을 이용한 *CgCDR1* 유전자의 정량 분석 결과는 northern 교잡법과 비교할 때 상관계수가 0.92이었고, *CgCDR2*의 경우 0.82이었다.
2. 두 가지 방법에 의해서 검사된 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 발현 정도는 fluconazole에 감수성 균주 (MIC ≤8 µg/ml, 9주)와 약제 의존성 감수성 균주 (MIC 16~32 µg/ml, 9주) 사이에 큰 차이를 보이

지 않았다.

3. 반면, fluconazole 내성 (MIC 128 µg/ml)인 1주의 *CgCDR1* 유전자 발현 정도는 표준 균주에 비해서 northern 교잡법에 의해서는 18.7배로, real time PCR법에 의해서는 145배의 심한 증가를 보였다. 반면 이 균주의 *CgCDR2* 유전자 발현 정도는 두 방법 모두에서 다른 균주에 비해 높지 않았다.

본 연구 결과 real-time PCR을 이용한 *C. glabrata* 균주의 *CgCDR1* 및 *CgCDR2* 유전자 발현 검사는 northern 교잡법과 높은 상관성을 보였다. 따라서 real time PCR법은 *C. glabrata* 균주의 내성 유전자 발현 검사에 northern 교잡법을 대체할 수 있는 보다 간편한 좋은 검사방법으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, et al. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3142-3146
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4419-4431
3. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 80-96
4. Shin JH, Chae MJ, Song JW, et al. Changes in karyotype and azole susceptibility of sequential bloodstream isolates from patients with *Candida glabrata* candidemia. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2385-2391.
5. Sanguinetti M, Posteraro B, Fiori B, et al. Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 668-679
6. Magill SS, Shields C, Sears CL, Choti M, Merz WG. Triazole cross-resistance among *Candida* spp.: case report, occurrence among bloodstream isolates, and implications for antifungal therapy. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 529-535
7. Frade JP, Warnock DW, Arthington-Skaggs BA. Rapid quantification of drug resistance gene expression in *Candida albicans* by reverse transcriptase LightCycler PCR and fluorescent probe hybridization. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2085-2093
8. Okeke CN, Tsuboi R, Ogawa H. Quantification of *Candida albicans* actin mRNA by the LightCycler system as a means of assessing viability in a model of cutaneous candidiasis. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3491-3494
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
10. Pfaller MA, Diekema DJ, Rex JH, et al. Correlation of MIC with outcome for *Candida* species tested against voriconazole: analysis and proposal for interpretive breakpoints. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 819-826
11. Borst A, Raimer MT, Warnock DW, Morrison CJ, Arthington-Skaggs BA: Rapid acquisition of stable azole resistance by *Candida glabrata* isolates obtained before the clinical introduction of fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 783-787
12. Redding SW, Kirkpatrick WR, Saville S, et al. Multiple patterns of resistance to fluconazole in *Candida glabrata* isolates from a patient with oropharyngeal candidiasis receiving head and neck radiation. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 619-622
13. Ostrosky-Zeichner L, Rex JH, Pappas PG, et al. Antifungal susceptibility survey of 2,000 bloodstream *Candida* isolates in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3149-3154
14. Lee JS, Shin JH, Lee K, et al. Species distribution

- and susceptibility to azole antifungals of *Candida* bloodstream isolates from eight university hospitals in Korea. *Yonsei Med J* 2007; 48: 779-786
15. Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1773-1777
 16. Sanglard D, Ischer F, Bille J. Role of ATP-binding-cassette transporter genes in high-frequency acquisition of resistance to azole antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1174-1183
 17. Hwang BY, Kee SY, Kim JY, Jeong HW, Park CW, Park YH, Kim MK, Cheong HJ, Kim WJ. The Relation between the High-level Resistance to Fluoroquinolones and the Over-expression of the *acrA* among Quinolone-Resistant *Escherichia coli* -Quantification of *acrA* by Using Real time PCR and Northern hybridization. *Infect Chemother* 2005; 37: 185-192
 18. Kim TH, Dae-Sung Chung DS, Lee MK. Risk factors for hospital-acquired urinary tract infection due to *Candida* Species. *Kor J Med Mycol* 2007; 12: 156-162
-