

Fluconazole 첨가 사브로덱스트로오스 한천 배지를 사용한 *Candida* 종의 Fluconazole 내성 검색

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실, 비뇨기과학교실¹

이 미 경 · 김 태 형¹

= Abstract =

Screening of Fluconazole-Resistant *Candida* Species with Fluconazole-Containing Sabouraud Dextrose Agar Plates

Mi-Kyung Lee and Tae-Hyoung Kim¹

Departments of Laboratory Medicine and Urology¹,
Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Antifungal susceptibility testing methods are relatively expensive and laborious and are not easily applicable for screening purposes in routine laboratories.

Objective: We have developed a susceptibility screening method by adding fluconazole to Sabouraud dextrose agar (SDA) plate. In this study, SDA plates screening was compared with the Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) broth microdilution method for determining fluconazole susceptibility of *Candida* spp.

Methods: A total 186 isolates of *Candida* spp. (134 *C. albicans*, 24 *C. tropicalis*, 15 *C. glabrata*, 13 *C. parapsilosis*) were tested with the CLSI document M27-A2 method and fluconazole-containing SDA plate (0, 8, 16 µg/mL of fluconazole). By this method, colony count and diameter were read after 24 hr of incubation.

Results: Fluconazole-susceptible *Candida* spp. are significantly smaller (≤50%) on SDA with fluconazole than on fluconazole-free SDA. On SDA with 8 and 16 µg of fluconazole per mL, 80.7% (150/186) and 87.1% (162/186) of isolates were correctly predicted, respectively.

Conclusions: These data suggest that the fluconazole-containing SDA plates can be used as a routine screening procedure for susceptibility of *Candida* spp. in clinical laboratories.

[Kor J Med Mycol 2009; 14(1): 16-22]

Key Words: *Candida*, Fluconazole susceptibility, Sabouraud dextrose agar

서 론

Candida 균종에 대한 항진균제 감수성 검사는 아직까지 일상적 검사로는 권장되지 않으나^{1,2}, *Candida* 균종에 의한 심각한 감염의 증가와 non-

albicans Candida 감염의 증가로 인하여 항진균제 감수성 검사의 필요성이 증가하고 있다³⁻⁵. 항진균제 감수성 검사는 항균제 감수성 검사와 마찬가지로 임상적 치료반응을 예측하거나 치료실패를 예상하는데 있다. 즉 경험적으로 사용하는 항진균제의 선택 시 도움을 주고, 칸디다 혈증이나 심부 칸디다 감염에서 경험적 치료실패 시 치료연장에 필요한 자료를 제시하고, 반복적인 점막의 칸디다증에서 대체할 수 있는 약제의 선택에

[†]별책 요청 저자: 김태형, 140-755 서울시 용산구 한강로 3가 65-207, 중앙대학교 용산병원 비뇨기과
전화: (02) 748-9715, Fax: (02) 797-3471
e-mail: kthlmk@hanafos.com

도움을 줄 수 있어야 한다⁶.

항진균제 감수성 검사는 크게 액체배지 희석법, E test, 디스크 확산법, 유세포 분석기를 사용하는 방법, 세포내의 ergosterol 측정법 등으로 분류할 수 있다². 또한, 최근 자동화 장비를 사용한 fluconazole, amphotericin B, flucytosine 및 voriconazole에 대한 항진균제 감수성 검사가 개발되어, 이중 fluconazole 감수성 검사가 미국 식품 의약품국 (Food and Drug Administration, FDA)에 의해 임상 사용이 승인되었다⁷. 액체배지 희석법은 Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI)에서 권장한 표준검사법이지만 검사할 균주수가 적은 일반 검사실에서 일상적 검사법으로 도입하기에는 노동집약적이고 결과 판독 시 나타날 수 있는 trailing 성장 현상이 문제점으로 남아 있다. 반면 E test는 비용이 많이 들고, 디스크 확산법은 간편하게 일상 검사로 도입하기에 적합하지만⁸ 아직까지 시판되지 않고 있다. 유세포 분석기를 사용하는 방법은 배양 시간을 줄임으로 신속한 보고와 trailing 성장 현상으로 인한 문제는 없지만, 일부 균종에서 표준법과 차이 나는 결과를 보이고 있고 균주수가 많을 경우 역시 노동집약적이다⁹. 세포내의 ergosterol 측정법 역시 노동집약적이고 스캐닝 기능을 가진 분광광도계가 필요하여 일반 검사실에서 일상 검사로 도입하기는 어렵다.

이에 본 연구에서는 일반 병원 미생물 검사실에서 간편하고 신속한 fluconazole 내성 검색을 위하여, 각종 임상검체에서 분리된 *Candida* 균종에서 fluconazole이 첨가된 사브로덱스트로오스 한천 (Sabouraud dextrose agar, SDA) 배지를 사용한 내성 검색을 시도하여 그 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

중앙대학교 용산병원을 내원한 환자의 각종 임상검체에서 분리된 186균주 (*C. albicans* 134균

주, *C. tropicalis* 24균주, *C. glabrata* 15균주, *C. parapsilosis* 13균주)의 *Candida* 균종을 대상으로 하였으며, 정도관리를 위한 표준 균주로는 *C. parapsilosis* ATCC 22019와 *C. krusei* ATCC 6258 균주를 사용하였다. 임상 분리 균주들은 SDA에 계대 배양하여 발아판 시험, cornmeal agar에서의 형태관찰 및 Vitek 2 system의 Yeast Biochemical Card (bioMerieux Vitek, Hazelwood, MO, USA) 등을 이용하여 동정하였다.

2. SDA 배지를 사용한 fluconazole 내성 검색

Fluconazole (Diflucan, 한국화이자, Korea) 원액은 멸균 증류수에 10,000 µg/mL의 농도가 되도록 분말을 녹여 제조한 후 1 mL씩 분주하여 -70°C에 보관하였다. SDA 검색 배지는 fluconazole 최종 농도가 각각 0, 8, 및 16 µg/mL이 되도록 제조하여 1주일까지 냉장 보관하면서 사용하였다.

Fluconazole 내성 검색을 위한 균주는 SDA에 2번 계대 배양하여 0.85% 식염수에 풀어 잘 섞은 후 0.5 McFarland 탁도로 맞추고, 멸균 증류수로 1,000배 희석하여 3가지 농도의 fluconazole이 함유된 SDA 배지에 20 µL씩 분주하여 loop로 배지 표면에 골고루 잘 발라 35°C에 24시간 배양 후에 집락수와 집락크기를 판독하였다.

즉, *Candida* spp.에서 SDA 배지를 사용한 fluconazole 내성 검색은 fluconazole이 첨가되지 않은 배지를 기준으로 하여 fluconazole이 8과 16 µg/mL이 첨가된 배지에서의 집락수가 ½ 이상 감소하거나 집락크기가 ½ 이하인 경우를 각각 감수성으로 판정하였으며, CLSI broth microdilution 법과 비교하여 평가하였다 (Fig. 1).

3. CLSI broth microdilution법 (M27-A2)¹⁰

RPMI 1640 배지는 L-glutamine이 들어있는 RPMI 1640 분말 1봉지, MOPS (3-N-morpholinopropanesulfonic acid) 34.53 g, glucose 2 g을 800 mL 증류수에 녹인 후, 1 mol/L HCl로 pH를 7.0으로 맞추고 증류수를 더하여 1,000 mL로 만들어 진공 여과 (vacuum filter)하여 4°C에 보관하며 사용

하였다.

Fluconazole 원액은 멸균 증류수에 6400 µg/mL의 농도가 되도록 분말을 녹여 400 µL씩 분주하여 -70°C에 보관하였다. Fluconazole 용액은 멸균 증류수와 RPMI 배지로 희석하여 64~0.125 µg/mL의 농도로 만들고, 96 well plate (FALCON MICROTEST™ U-Bottom, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)의 1번에서 10번 well에 100 µL씩 분주하였으며, 성장대조 (growth control)와 배지대조 (purity control)를 위하여 11번과 12번째 well에 fluconazole이 없는 RPMI 배지를 각각 100 µL와 200 µL씩 분주하여, 즉시 사용하거나 -70°C에 보관하였다.

-70°C에 보관 중인 균주를 SDA에 35°C로 2번

계대 배양하여, 0.85% 식염수에 균을 풀어 잘 섞은 후 0.5 McFarland 탁도로 맞추고, 이 균액을 멸균 증류수로 1:1,000으로 희석하여 준비된 96 well plate의 1번에서 11번 well에 100 µL씩 분주하였다. 균이 접종된 96 well plate는 35°C에서 48시간까지 배양하면서 24시간과 48시간 배양 후 판독하여 육안으로 성장대조 well에 비하여 50% 이상 성장이 억제된 well을 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 판정하였으며, MIC의 최종 판정은 24시간 배양 후 육안 판독한 결과를 기준으로 하였다. *Candida* spp.에서 fluconazole MIC는 8 µg/mL 이하이면 감수성, 16에서 32 µg/mL 사이이면 약용량 의존 감수성 (susceptible-dose dependent, SDD), 64 µg/mL 이

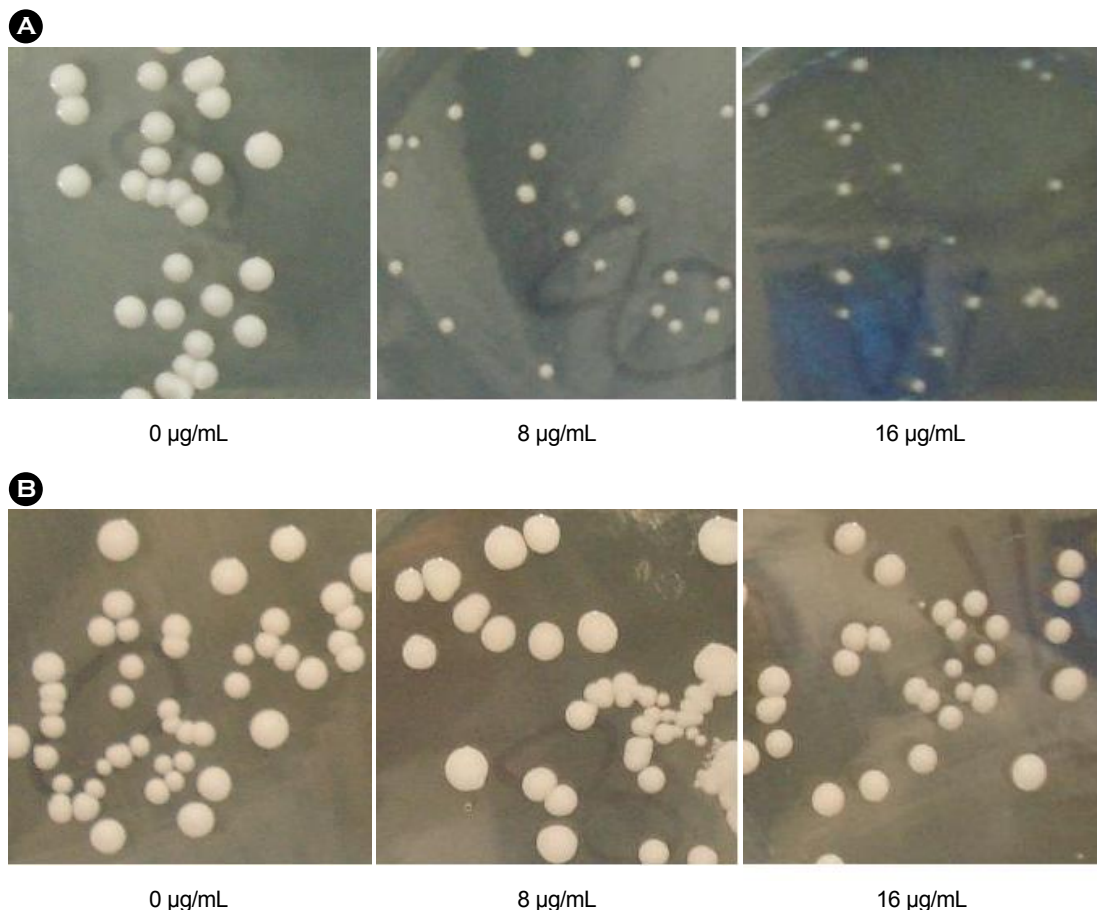


Fig. 1. (A) Fluconazole susceptible *Candida* spp. on SDA plates containing 0, 8, and 16 µg of fluconazole/mL. (B) Fluconazole resistant *Candida* spp. on SDA plates containing 0, 8, and 16 µg of fluconazole/mL.

상이면 내성으로 분류한다.

결 과

1. 집락수에 의한 fluconazole 내성 검색

집락수로 fluconazole 내성을 검색한 경우, CLSI broth microdilution법으로 fluconazole 감수성이었던 175균주 중 fluconazole 8 µg/mL이 첨가된 배지에서 4균주 (2.3%), 16 µg/mL이 첨가된 배지에서 18균주 (10.3%)만이 감수성으로 판독되어 2가지 농도의 fluconazole이 첨가된 SDA 배지에서 집락수 판독에 의한 fluconazole 내성 검색은 불가능하였다.

2. 집락크기에 의한 fluconazole 내성 검색

집락크기로 fluconazole 내성을 검색한 경우 집락크기가 ½ 이하로 자란 기준을 적용할 때 판독

이 가능하였으며 (Fig. 1), fluconazole이 8 µg/mL 첨가된 배지에서는 fluconazole 감수성 175균주 중 141균주 (80.6%)가 감수성, SDD 5균주 중 3균주와 내성 6균주 모두에서 비감수성으로 나타나 총 186균주 중 150균주 (80.7%)에서 일치하는 결과를 보였다. 또한 fluconazole이 16 µg/mL 첨가된 배지에서는 fluconazole 감수성 175균주 중 153균주 (87.4%)가 감수성, SDD 5균주 중 3균주와 내성 6균주 모두에서 비감수성으로 나타나 총 186균주 중 162균주 (87.1%)에서 CLSI broth microdilution법과 감수성 결과가 일치하였다. CLSI broth microdilution법에서는 감수성이었으나 fluconazole 첨가 SDA 배지에서 비감수성으로 판독되어 불일치를 보인 감수성 균주들의 균종별 불일치 빈도는, fluconazole이 8 µg/mL 첨가된 배지에서는 (34균주) *C. albicans* 18.3%, *C. tropicalis* 13.0%, *C. glabrata* 75.0%, *C. parapsilosis*

Table 1. Distribution of 24 hr broth microdilution fluconazole MICs for *Candida* isolates evaluated in the present study

Species (No.)	No. of Isolates with Fluconazole MIC (µg/mL) of:									
	≤0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	≥64
<i>C. albicans</i> (134)	18	25	28	46	12	2		2		1
<i>C. tropicalis</i> (24)		2	3	6	7	3	2	1		
<i>C. glabrata</i> (15)			1	1		4	2	1	1	5
<i>C. parapsilosis</i> (13)			3	5	3	1	1			
Total (186)	18	27	35	58	22	10	5	4	1	6

Table 2. Correlation between decrease in colony diameter observed on fluconazole-containing SDA and CLSI interpretive categorization based on broth microdilution fluconazole MICs

Categories ^a (No. of Isolates)	No. of Isolates in Test Conditions (µg) of Fluconazole ^b			
	8 µg/mL		16 µg/mL	
	≤½	>½	≤½	>½
S (175)	141	34	153	22
SDD (5)	2	3	2	3
R (6)	0	6	0	6

^a Fluconazole susceptibility categories: S, susceptible, MIC of ≤8 µg/mL; SDD, susceptible-dose dependent, MIC of 16 to 32 µg/mL; R, resistant, MIC of ≥64 µg/mL.

^b ≤½: typical colony diameter ≤50% of the diameter seen on fluconazole-free SDA agar.

>½: typical colony diameter >50% of the diameter seen on fluconazole-free SDA agar

7.7%였고, fluconazole이 16 µg/mL 첨가된 배지에서는 (22균주) *C. albicans* 9.9%, *C. tropicalis* 13.0%, *C. glabrata* 62.5%, *C. parapsilosis* 7.7%였다. SDD 5균주 중 8과 16 µg/mL의 fluconazole이 첨가된 SDA 검색 배지 모두에서 감수성으로 나타나 불일치를 보인 2균주는 CLSI broth microdilution법으로 MIC가 16 µg/mL으로 판독된 *C. tropicalis*와 *C. glabrata*였으며, 특히 본 연구에 사용된 6균주의 내성 균주는 2가지 농도의 fluconazole이 첨가된 SDA 검색 배지에서 모두 비감수성으로 판독되어 CLSI broth microdilution법 결과와 모두 일치하였다 (Table 1, 2).

고 찰

Candida spp.에 대한 항진균제 감수성 검사는 무균 검체에서 *Candida*가 분리되었거나, *Candida* 균종에 따른 경험적 항진균 요법이 실패한 경우, *C. albicans* 이외의 균종이 분리되어 항진균제에 대한 감수성 양상을 예측할 수 없을 때 필요하게 된다³⁻⁶. 또한 대규모 또는 장기간의 역학 조사를 통하여 항진균제에 대한 내성균의 빈도와 검출을 시도하는 경우, 간편하고 경제적으로 감수성 검색이 가능한 항진균제 감수성 검사가 요구되어진다^{11,12}. CLSI에서 권장하는 표준검사법을 비롯한 여러 가지의 항진균제 감수성 검사는 아직까지는 일반 검사실에서 일상적 검사로 도입하기에 어려움이 있거나 많은 수의 균주에 시행하기에는 노동집약적이고 검사비용의 부담이 있다^{2,7-9}.

본 연구에서는 *Candida* spp.에서 항진균제에 대한 내성 검색을 간편하고 경제적으로 시행하고자 진균 배양의 일차 배지로 사용되고 있는 SDA 배지에 2가지 농도의 fluconazole을 첨가하여 제조한 후 임상 분리 *Candida* spp.를 대상으로 fluconazole 내성 검색을 시도하였으며, 집락수로는 fluconazole 내성 검색이 불가능하여 집락크기로 판독하였다. CLSI broth microdilution법과 비교하여, fluconazole이 8 µg/mL 첨가된 배

지에서는 80.7%, 16 µg/mL 첨가된 배지에서는 87.1%에서 감수성 결과가 일치하여 16 µg/mL의 fluconazole이 첨가된 배지를 사용할 때 broth microdilution법과 일치율이 높았다. 즉, fluconazole 감수성 175균주에서는 fluconazole이 8 µg/mL 첨가된 배지에서는 34균주 (19.4%), 16 µg/mL 첨가된 배지에서는 22균주 (12.6%)가 비감수성으로 판독되어 CLSI broth microdilution법과 불일치를 보였다. 이들 불일치 균주 중 *C. glabrata*의 불일치 빈도가 매우 높았는데, 이는 다른 균종에 비해 fluconazole MIC가 4~8 µg/mL 사이로 비교적 높은 농도로 분포하였기 때문으로 생각된다. 또한 SDD 5균주 중 MIC가 16 µg/mL인 *C. albicans* 2균주와 32 µg/mL인 *C. glabrata* 1균주는 2가지 농도의 fluconazole 첨가 배지 모두에서 비감수성으로 판독되었으나, 나머지 2균주는 2가지 농도의 fluconazole 첨가 배지 모두에서 감수성을 보여 비감수성 균주로 검색되지 않았다. 그러나 본 연구에 사용된 6균주의 fluconazole 내성 균주는 MIC가 모두 64 µg/mL인 *C. albicans* 1균주와 *C. glabrata* 5균주로 2가지 농도의 fluconazole 첨가 배지에서 모두 비감수성으로 나타나, 내성 균주가 감수성으로 판독되는 very major error를 보이는 균주는 없었다. 그러므로 fluconazole 첨가 SDA 배지에서 fluconazole 내성 검색뿐 아니라 감수성이 저하된 균주를 검색하기 위해서는, 더 많은 수의 SDD 균주를 대상으로 SDA 검색 배지의 유용성 확인이 필요할 것으로 판단되었다.

현재까지 *Candida* spp.에서 fluconazole 내성 균주의 검출을 위하여 시도된 감수성 검색은, 대부분 일부 *Candida* spp.의 추정 동정이 동시에 가능한 발색 배지 (CHROMagar *Candida*)에 fluconazole을 첨가하여 시도되었으며 집락크기로 판독하였다¹¹⁻¹³. 이들 보고에서는 MIC가 8 µg/mL 미만인 감수성 균주의 97~99%에서 감수성으로 검색이 가능하였다고 보고하였으며^{11,12}, Nelson과 Cartwright¹³는 fluconazole 감수성 *C. albicans*의 100% (47/47균주)가 정확하게 감수성으로 검색되었고, MIC가 8 µg/mL 이하인 *C. glabrata*의 95.7%

(66/69균주)가 감수성으로 검색되어 동시에 검사한 디스크 확산법보다 더 우수하다고 보고하였다. 그러나 발색 배지는 배지 가격이 저렴하지 않아 비용 효과적인 면에서 효율적이지 않다고 생각된다. 본 연구에서는 표준검사법과의 일치 정도가 발색 배지를 사용한 기존 보고보다 낮은 것으로 평가되었는데, 이는 사용한 배지, 배양기간 및 판독 기준의 차이 때문으로 추측해 볼 수 있으며, 추후 더 많은 수의 균주에서 평가할 필요가 있겠다.

결론적으로 병원 검사실에서 진균 배양의 일차 배지로 사용하고 있는 SDA 배지에 fluconazole을 첨가하여 내성 검색을 시도한 본 연구를 통하여, SDA 검색 배지에서 CLSI broth microdilution법과 불일치를 보이는 균주는 있었지만 대부분 감수성 균주가 비감수성으로 판독되어 fluconazole 첨가 SDA 배지는 일반 검사실에서 간편하고 저렴하게 fluconazole 내성 검색을 시도할 수 있는 유용한 방법으로 생각되었다.

결 론

아직까지 *Candida* 균종에 대한 항진균제 감수성 검사는 일상적 검사로는 권장되지 않으나, 최근 항진균제 감수성 검사의 필요성이 증가하고 있다. 이에 본 연구에서는 일반 병원 미생물 검사실에서의 간편하고 신속한 fluconazole 내성 검색을 위하여, 각종 임상검체에서 분리된 *Candida* 균종에서 fluconazole이 첨가된 SDA 배지를 사용한 내성 검색을 시도하여 그 유용성을 평가하고자 하였다.

Candida spp.에서 fluconazole이 8과 16 µg/mL이 첨가된 SDA 배지를 사용하여 시도하였으며, CLSI broth microdilution법과 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 2가지 농도의 fluconazole이 첨가된 SDA 배지에서 집락수 판독에 의한 fluconazole 내성 검색은 불가능하였다.
2. CLSI broth microdilution법과 비교하여, flu-

conazole이 8 µg/mL 첨가된 배지에서는 80.7%, 16 µg/mL 첨가된 배지에서는 87.1%에서 감수성 결과가 일치하여 16 µg/mL의 fluconazole이 첨가된 배지를 사용할 때 broth microdilution법과 일치율이 높았다.

3. 불일치 균주는 fluconazole이 8과 16 µg/mL 첨가된 배지에서 각각, 감수성 균주 (175균주)가 비감수성으로 판독된 경우가 34균주와 22균주, SDD 균주 (5균주)가 감수성으로 판독된 경우가 모두 2균주였으며, 내성 균주 (6균주)는 모두 비감수성으로 판독되었다.

이상의 결과를 통하여, SDA 검색 배지에서 CLSI broth microdilution법과 불일치를 보이는 균주는 있었지만 대부분 감수성 균주가 비감수성으로 판독되어 fluconazole 첨가 SDA 배지는 일반 검사실에서 간편하고 저렴하게 fluconazole 내성 검색을 시도할 수 있는 유용한 방법으로 생각되었다.

REFERENCES

1. Vandenbossche I, Vaneechoutte M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth microdilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 918-921
2. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 643-658
3. Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottredsson M. Increasing incidence of candidemia: Results from a 20-year nationwide study in Iceland. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3489-3492
4. Mcneil MM. Fungal infections. In: Mayhall CG. *Hospital epidemiology and infection control*. 3rd ed. Philadelphia; Lippincott Williams and Wilkins, 2004: 685-707
5. Kim TH, Chung DS, Lee MK. Risk factors for Hospital-Acquired Urinary Tract Infection due to

- Candida* species. Kor J Med Mycol 2007; 12: 156-162
6. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 153-160
 7. Pfaller MA, Diekema DJ, Procop GW, Rinaldi MG. Multicenter comparison of the VITEK 2 yeast susceptibility test with the CLSI broth microdilution reference method for testing fluconazole against *Candida* spp. J Clin Microbiol 2007; 45: 796-802
 8. Lee MK, Kim HR. Evaluation of disk diffusion test with glucose- and methylene blue-enriched Mueller-Hinton agar for in vitro susceptibility testing of fluconazole against *Candida* isolates. Kor J Lab Med 2005; 25: 247-251
 9. Joung YH, Kim HR, Lee MK, Park AJ. Fluconazole susceptibility testing of *Candida* species by flow cytometry. J Inf 2007; 54: 504-508
 10. Clinical and Laboratory Standards Institutes. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2002
 11. Patterson TF, Revankar SG, Kirkpatrick WR, et al. Simple method for detecting fluconazole-resistant yeasts with chromogenic agar. J Clin Microbiol 1996; 34: 1794-1797
 12. Patterson TF, Kirkpatrick WR, Revankar SG, et al. Comparative evaluation of macrodilution and chromogenic agar screening for determining fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. J Clin Microbiol 1996; 34: 3237-3239
 13. Nelson SM, Cartwright CP. Detection of fluconazole-resistant isolates of *Candida glabrata* by using an agar screen assay. J Clin Microbiol 2003; 41: 2141-2143
-