

대한의진균학회 제5차 심포지엄 초록

- 일 시 : 2002년 11월 2일 (토) 13:00-18:00
- 장 소 : 서울 소공동 롯데호텔 2층 에메랄드룸
- ▶ 주제 : 항진균제의 감수성 검사◀

대한의진균학회 발행

Published by the Korean Society for Medical Mycology

◆ 대한의진균학회 제5차 심포지엄 진행계획표 ◆

시 간	내 용
13 : 00 - 13 : 50	등록 및 슬라이드 접수
13 : 50 - 14 : 00	개회사
14 : 00 - 14 : 30	SP1 김봉수 박사 (국립보건원)
14 : 30 - 15 : 20	SL 백용기 교수 (연세대학교)
15 : 20 - 15 : 50	Coffee break
15 : 50 - 16 : 20	SP2 김정애 교수 (서울의대)
16 : 20 - 16 : 50	SP3 신중희 교수 (전남의대)
16 : 50 - 18 : 00	간담회

● 대한의진균학회 제5차 심포지엄 연제 순서 ●

◆ 특별강연 SL 14:30-15:20

좌 장 : 노병인 (중앙의대 피부과학교실)

제 목 : A Novel Strategy for the Development of Antifungal Drug

연 자 : 백용기 (연세대학교 생화학과)

◆ 연제 발표 SP1 14:00-14:30

좌 장 : 최강원 (서울의대 내과학교실)

제 목 : 칸디다균의 항진균제 감수성 시험 비교

연 자 : 김봉수 (국립보건원 내성세균과)

◆ 연제 발표 SP2 15:50-16:20

좌 장 : 김기홍 (영남의대 피부과학교실)

제 목 : 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사

연 자 : 김정애 (서울의대 피부과학교실)

◆ 연제 발표 SP3 16:20-16:50

좌 장 : 신완식 (가톨릭의대 내과학교실)

제 목 : 항진균제 감수성 검사의 임상적 이용

연 자 : 신중희 (전남의대 진단검사의학교실)

A Novel Strategy for the Development of Antifungal Drug

**Young-Ki Paik, Kang-Sik Park, Yu Kyong Shin, ¹Jung-Ho Kim,
Yong-Kun Jeon and Ki-Young Kim**

*Department of Biochemistry, Bioproducts Research Center and Yonsei Proteome Research Center,
Yonsei University, Seoul 120-749, Korea, and Hanwha Chemical Research and
Development Center, Taejon, Korea*

Candida albicans (CA) is an opportunistic pathogen that can infect virtually any tissue in immunocompromised patients such as AIDS, chemotherapy, antibiotic treatment, diabetes, and a variety of other circumstances. The treatment of candidiasis has been greatly facilitated by the introduction of azoles particularly fluconazole (FCZ) but the frequent use of FCZ in therapy leads to development of resistance among clinical isolates and the patients who received FLZ therapy were liver side effects. The success of the development of a new drug will depend upon the identification of new antifungal targets, which have no mammalian host counterpart. In addition, new antifungal drugs should be active against a broad spectrum of pathogenic fungi. We have previously demonstrated that HWY-289, a novel derivative of the protoberberines, exhibits the significant anti-*Candida* activity (MICs 1.56 mg/L for *Candida*) by inhibiting the synthesis of membrane sterols, sterol esterification or cell wall chitin (Park *et al.*, *J Antimicrob Chemother.* 43: 667-674, 1999; Park *et al.*, *ibid.* 47: 513-519, 2001). However, mechanism of action at proteome level by which HWY-289 exerts its antifungal activity against CA is not well understood, To determine how HWY-289 exert its therapeutic effect proteome analysis using proteomic techniques was carried out on the CA extracts that had been treated with HWY-289 *in vivo*. We have found more than two dozen of proteins that were related to metabolic pathway and cell wall transportation were affected by HWY-289 treatment.

There are several clinical, cellular and molecular factors that contribute to azole-resistance including less accumulation of drug inside the cell due to changes in the phospholipids and sterol membrane composition or more efflux of drug outside the cell through multidrug transporters, alteration in the target enzyme of azoles (cytochrome P450 14-demethylase) or other enzymes of ergosterol synthesis pathway. However, it is not known how CA gets specific resistance when they were exposed to fluconazole. The determination of azole resistant *C. albicans* proteome changes will aid providing new antifungal drug targets as well as understanding of the mechanisms of their resistance. Here we examined the protein profiles of azole resistant strains-azole resistant strain (ATCC 62342), ketoconazole resistant strain (ATCC 64124), fluconazole resistant strain (ATCC 64550). CA lysates were subjected to two-dimensional (2-D) electrophoresis and protein spots were identified by mass spectrometry and sequence analysis. Preliminary results will be discussed in this presentation. In addition, several hyphae inducing factors were identified when CA were grown under the hyphae induction condition.

Taken together, we hope that characterization of these proteins involved in drug action, drug resistance and

칸디다균의 항진균제 감수성 시험 비교 (Comparison of Antifungal Susceptibility Testing of *Candida*)

국립보건원 세균부 내성세균과

김 봉 수 (Bong Su Kim)

*Candida*는 인체내 피부, 소화기, 구강 및 여성의 질 내에 흔히 발견되는 진균으로 과거 약 20년 동안 증가하고 있는 당뇨병, 백혈병, 암, 장기이식환자 등 면역이 억제된 환자에게 기회감염 원인균으로 크게 대두되었다. *C. albicans*가 주로 감염을 일으키지만 최근에는 *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* 및 *C. krusei* 등 non-*albicans*가 증가하면서 항진균제 내성균이 크게 문제시 되고 있다. 이들 내성균을 퇴치할 치료제는 한정되어 있고 개발은 매우 더디어 내성균의 출현을 신속하게 진단하고 적절한 항생제를 사용하는 것이 내성균의 확산을 미연에 방지하고 환자를 조기에 치료하는데 도움이 될 것이다. 따라서 신속하고 정확하며 재현성이 있는 항진균제 감수성 시험이 필요하다.

항진균제 감수성 시험은 1983년 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)에서 처음 소위원회를 설립하여 항진균제 감수성 시험에 대한 기준을 설정하였다. 대부분 효모균에 대한 감수성 시험을 표준화하였지만 배양시간, 균집중액의 농도, MIC endpoint 결정 등 중요한 요인들이 1990년 까지 해결되지 못하였다. 예를 들어 *C. krusei*의 flucytosine에 대한 감수성 시험에서는 10^6 cell/ml의 높은 농도가 보다 더 좋은 감수성 결과를 나타내 접종균액의 농도 10^4 cell/ml가 항상 맞지 않았다¹. 1997년에는 효모균의 항진균제 감수성 방법으로 표준미량액체희석법을 제정하여 (M27-A) 검사방법의 재현성을 안정화시켰으며 항진균제에 대한 MIC값 결정을 임상적 결과와 연계하여 최종 fluconazole, flucytosine, itraconazole, amphotericin B에 대한 breakpoint을 확립하였다². 이처럼 항진균제의 감수성 시험은 균의 종류, 항균제의 종류, 접종균액의 농도, 배양시간, 온도 등에 따라 차이가 있어 시험 자체가 매우 한정적일 수밖에 없다. 특히 최근에 내성균으로 문제시 되고 있는 fluconazole 같은 azole계 항진균제는 amphotericin B처럼 살균효과가 아닌 정균효과 (fungistatic effect)가 있어 일부 균주에서 균 배양시 "trailing" 성장을 나타내 정확한 MIC endpoint의 값을 판단할 수 없다. 더욱이 칸디다혈증은 자주 fluconazole 예방적 투여와 관련이 있는 것으로 진단이 어렵고 치료가 잘 안되고 있으므로 fluconazole 내성의 조기진단은 매우 중요하다³.

*Candida*에서 "trailing" 현상을 보이는 균은 *C. albicans*와 *C. tropicalis*로 이들 균주 중 약 5% 차지한다. 이런 현상을 나타내는 균들은 일방적으로 24시간 관찰에서 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 MIC를 나타내나 48시간 배양 후에는 MIC값이 $64 \mu\text{g/ml}$ 이상을 나타내 내성으로 판정하는 오류를 범하게 된다. 또한, 여러 임상실험 결과에서 low dose의 fluconazole 투여로도 충분히 치료가 되는 것으로 보아 24시간 배양 후 MIC값이 임상치료에 도움이 될 것이다⁴.

이처럼 NCCLS (M27-A)의 시험을 보완할 방법 중 세포내 sterol의 양을 측정하는 SQM (sterol quantitation method)이 *Candida*균 중 "trailing" 성장을 보이는 임상분리주의 MIC를 결정하는데 유용할 것이다. 이 방법은 fluconazole 같은 azole계 항진균제가 진균세포막의 주요한 구성성분인 ergosterol 생합성을 억

제한으로 fungistatic 상태의 세포내에서 ergosterol의 양을 spectrophotometer (240, 281.5 nm)로 측정함으로써 낮은 농도의 fluconazole에 대한 세포내 sterol의 양 변화를 측정할 수 있다. 이 SQM 방법의 MIC값은 NCCLS의 MIC값의 2배 범위 내에 일치하여 안전할 수 있으나 대조군 (drug-free)에 비해 80% 감소하는 ergosterol 양을 MIC로 결정짓는 것 이외 그 이상이나 이하의 감소%는 근사치의 감소량을 MIC로 결정해야 하는 번거로움이 있다. 이밖에 세포내 미토콘드리아의 환원효소에 의해 yellow salt의 XTT가 dark blue XTT formazan을 생성함으로써 한천배지상에서 성장한 칸디다균의 color색의 변화를 육안으로 관찰하는 방법도 fluconazole이나 itraconazole처럼 fungistatic 상태의 "trailing" 성장을 하는 균종에서 MIC값 결정에 도움이 되지만 5회 정도 재시험을 해야 NCCLS 방법의 MIC값과 거의 일치하는 어려움이 있다⁵. 이런 방법은 fluconazole에 대해 본래부터 내성을 지니고 있는 *C. krusei*와 *C. glabrata*에서도 유용하여 broth microdilution이나 E-test 등 육안을 통해 관찰할 경우 S-DD (susceptible dose dependent)와 resistant 균주 사이를 결정짓기가 훨씬 수월해진다.

한편 간편하게 사용하는 disk diffusion 방법은 약물용량의존 (S-DD) 감수성 균주와 내성 균주의 구분이 뚜렷하지 않으며 RPMI-glucose 한천배지에서 성장이 poor한 *C. glabrata*와 *Cryp. neoformans*에는 적용하기가 어렵다. 이런 경우는 일반적으로 E-test나 microdilution 방법을 추가로 사용한다⁶. 또한, 최근에 연구한 보고에 의하면 반고체 한천 항진균 감수성 시험 (SAAS; semi-solid agar antifungal susceptibility screening)이 심부성 칸디다증의 조기진단으로 내성균을 screening하는데 큰 도움이 된다고 한다. 이 방법은 조기진단과 치료가 필요한 심부성 칸디다증 환자의 경우 더욱 그렇다⁷.

이와 같이 칸디다균의 항진균제 감수성 시험은 1997년에 개정된 NCCLS 방법이 유용하나 매우 실험에 한계점이 나타나 그 밖의 좀더 자세한 실험이 필요할 경우 1~2가지 방법은 더 추가로 사용함으로써 NCCLS 방법에서 해결되지 못한 부분을 보완하는 것이 바람직 할 것이다.

참 고 문 헌

1. John N. Galgiani. Susceptibility testing of fungi; Current Status of the Standardization Process, Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 1993; 37(12): 2517-2521
2. Pfaller MA, J.h.Rex, Rinaldi MG. Antifungal Clinical Applications, Clin, Infect., Diseases, 1997; 24: 776-784
3. Beth A, Arthington-Skaggs, et al. Comparison of visual and spectrophotometric methods evolution of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole agent trailing and nontrailing *Candida* isolates, Antimicrobial Agent and Chemotherapy, 2002; 46(8): 2477-2481
4. Beth A, Arthington-Skaggs, et al. Quantitation of ergosterol Content: Novel method for determination of fluconazole susceptibility of *C. albicans*. J Clin Microbiol 1999; 37(10): 3332-3337
5. Hawser SP et al. Comparison of a 2,3 - Bis (2-methoxy-4-Nitro-5-sulfophenyl)-5[(phenylamino)Carbonyl]-2H-Tetrazolium Hydroxide (XTT) colorimetric method with the standardized NCCLS method of testing clinical yeast isolate for susceptibility to antifungal agents. J Clin Microbiol 1998; 36(5): 1450-1452
6. Barry AL, Brown SD. Fluconazole Disk diffusion procedure for determining susceptibility of *Candida* species. J Clin Microbiol 1996; 2154-2157
7. Susan Hadley, Jose' A. Martiney et al. Real-time antifungal susceptibility screening, aids management of invasive yeast infections immunocompromised patients. J Antimicrobial Chemotherapy 2002; 49: 415-419

● 연자 소개 ●

성 명 : 김 봉 수

1976. 2	이화여자대학교 졸업
1984. 2	고려대학교 이학박사 학위취득
1988. 7 ~ 1990. 1	국립보건안전연구원 보건연구관
1990. 2 ~ 1996. 4	국립보건원 진균과 보건연구관
1997. 6 ~ 2001. 2	국립보건원 병원감염과 과장
2001. 3 ~ 현재	국립보건원 내성세균과 과장

피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사 (Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes)

서울대학교 의과대학 피부과학교실

김 정 애 (Jeong Aee Kim)

표제성 진균감염에 의한 피부 질환은 전 피부 질환의 약 20% 정도를 차지하는 중요한 질환으로서 대표적 원인균으로는 피부사상균 (dermatophytes), 칸디다 (*Candida*) 및 말라세지아 (*Malassezia*)가 있다. 이중 피부사상균이 가장 흔한 원인균으로서 피부 및 피부부속기 (모발, 조갑)에 감염이 되어 조갑진균증을 포함한 각종 백선증을 일으킬 수 있다. 근래 생활상의 변화에 의하여 이러한 표제성 진균 질환의 발생 빈도는 점점 더 높아지고 있으며, 경제의 성장에 따라 환자들의 치료 요구도 점차 높아지고 있으나 지금 사용중인 항진균제들은 그 완치율이나 부작용에 있어서 만족스럽지 못하므로 더욱 새로운 항진균제의 개발이 요구되고 있다. 한편 최근 여러 가지 이유로 인하여 면역억제 상태의 환자가 증가하고 있으며 이에 따라 다양한 원인균에 의한 심재성 진균감염증 환자도 날로 증가되고 있다. 이러한 경우 가장 효과가 좋을 것으로 생각되는 항진균제를 선택하여야 할 필요가 생긴다. 이와 같이 가장 적절한 항진균제의 선택, 내성 진균의 확인, 새로운 항진균제의 개발 등을 위하여 표준화된 항진균제 감수성 검사법의 확립이 필요하다^{1,2}.

본 강의에서는 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사 방법이 현재 어느 정도 표준화되어 있는지 알아보고자 한다. 한편 피부사상균증에 대한 임상적인 치료 효과와 관련성이 높은 감수성 검사 모델을 개발하기 위한 다양한 연구에 대하여 소개하고자 한다. 또한 2002년도에 발표된 『일본의진균학회 표준화 위원회』의 활동 보고서를 소개하고자 한다.

1. 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사

항진균제의 치료 효과를 알기 위한 연구 방법은 사람을 대상으로 한 임상 연구, 동물 실험 및 시험관 내 실험으로 나눌 수 있는데, 이 중 임상 연구는 연구 대상자에 따라 약제에 대한 반응이 다를 수 있고 충분한 data를 모으기가 어렵다. 또한 동물 실험에 의한 연구 결과는 사람에게 직접 적용하기가 어렵고, 연구에 대한 규제가 점차 강화되고 있는 실정이다. 따라서 시험관 내에서의 항진균제 감수성 검사를 하게 되는 경우가 많은데 이를 위하여는 감수성 검사법의 표준화가 필요하다. 이에 따라 미국의 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)에서는 1992년에 M27-P (proposal) document라고 하여 효모양 진균에 대하여 표준화된 감수성 검사법을 제안하였다. 이 방법은 그후 많은 실험을 거쳐서 1997년도에 M27-A (approved) document로 확립이 되었다. 사상균 (mould)을 위한 검사 방법의 표준화는 효모양 진균에 비하여 더 어려운데 예를 들면 사상균은 대체적으로 성장 속도가 느리고, 균사로 서로 연결되어 있으며 복잡한 구조물 (hyphae, conidia, sporangiospore, sexual spores 등)을 가지고 있어서 정량화가 힘들고, 어떤 진균은 35℃에서 이형성 (dimorphism)을 보이거나 성장이 억제될 수 있기 때문이

다. NCCLS에서는 1998년 사상균에 대하여도 M38-P (proposal) document를 발표하였으나 여기에는 피부사상균이 포함되어 있지 않았으며 항진균제도 amphotericin B (AmB)와 itraconazole (ICZ) 만을 대상으로 하였다^{1,2}.

Norris 등은 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사법을 표준화하기 위한 시도의 첫 단계로서 피부사상균이 성장하기에 가장 좋은 조건에 대하여 연구하였다³. 이들의 연구 결과는 M38-P에서 제시한 배양 조건^{1,2}과 거의 비슷하였는데 피부사상균이 다른 사상균에 비하여 느리게 성장하는 점을 고려하여 배양 기간을 4일간으로 약간 길게 하였고, 피부과에서 흔히 사용하는 terbinafine (TBF), ICZ, fluconazole (FCZ) 및 griseofulvin (GSF)을 포함한 것이 차이점이다. 최근에는 5종의 피부사상균에 대하여 Norris 등의 방법으로 실험한 연구⁴, 대표적 피부사상균인 *T. rubrum*의 항진균제 감수성을 M38-P 방법으로 실험한 연구⁵, 효모양 진균 및 각종 사상균의 TBF에 대한 감수성을 M27-A 및 M38-P 방법을 사용하여 실험한 연구⁶가 발표되었다. 이로서 피부사상균의 항진균제에 대한 시험관 내 감수성 검사법도 현재 거의 확립되어 있다고 할 수 있다. 따라서 향후 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사를 실시할 때 이러한 조건을 되도록 맞추어 연구하여야 국제적으로 그 결과가 인정될 수 있을 것이다. Table 1에 M27-A, M38-P 및 Norris 등이 제시한 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사 방법의 표준화된 조건을 요약하였다.

2. 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 연구의 다양한 시도

시험관 내 항진균제 감수성 검사의 또 하나의 문제점은 시험 결과가 임상적인 효능과 일치하지 않는 경우가 있다는 점이다. 이는 어떤 약제에 의한 치료 효과는 대상 진균에 대한 항진균력 뿐만 아니라 항진균제의 생체 내 흡수도, 혈액 내 단백질과의 결합, 병변 부위로의 유입 정도, 병변 부위에서의 활

Table 1. Experimental conditions of antifungal susceptibility testing

	M27-A ¹	M38-P ^{1,2}	Norris et al ³
Format	Macrodilution	Macrodilution	Microdilution
	Microdilution	Microdilution	
Test media	RPMI1640	RPMI1640	RPMI1640
Inoculation	spores	microconidia	microconidia
Inoculum concentration, final	0.5~2.5×10 ³ CFU/ml	0.4×10 ⁴ ~5×10 ⁴ CFU/ml (10 ⁴ cells/ml)	10 ³ cells/ml
Temperature	25°C	35°C	35°C
Duration	48 hours	up to 74 hours	4 days
Testing drugs	AmB, FCZ	AmB	TBF, ICZ
	Flucytosine	ICZ	FCZ, GSF
Testing organisms	<i>Candida</i> spp.	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>T. rubrum</i>
	<i>C. neoformans</i>	<i>Fusarium</i> spp.	<i>T. mentagrophytes</i>
		<i>R. arrhizus</i>	<i>T. tonsurans</i>
		<i>P. boydii</i>	

(AmB: amphotericin B, ICZ: itraconazole, FCZ: fluconazole, GSF: griseofulvin)

성도 및 잔류 정도와 같은 소위 bioavailability에 따라 치료 효과가 변화할 수 있기 때문이다⁷⁻⁹. 이와 같은 문제를 해결하기 위해서는 피부사상균이 인체에 감염되는 것과 비슷한 조건을 제공하는 skin equivalent model을 개발하는 것이 필요하다. 이러한 연구로는 cyanoacrylate를 이용하여 stripping한 각질을 이용한 실험⁷, 자원자의 발바닥 각질을 dermatome으로 채취하여 이용한 실험⁸ 및 조갑의 절편을 이용한 실험^{10,11}의 예를 들 수 있다. 특히 각질형성세포를 3차원적으로 배양한 skin equivalent model에 TBF을 여러 가지 농도로 배양액에 첨가한 후 피부사상균을 접종하여 본 Rashid 등의 연구는 생체에서의 조건과 매우 유사한 실험 model이라고 할 수 있다⁹. 그러나 이 연구에서 사용한 접종 진균의 량, 배양 온도와 배양 기간 등은 현재 확립되어 있는 피부사상균에 대한 시험관 내 감수성 검사 조건과 차이가 있으며 항진균제도 TBF만 포함하고 있다. 또한 이 연구에서는 진균을 분절포자 (arthroconidia)의 형태로 접종하였는데 분절포자가 자연 환경 내에서 오래 생존할 수 있고 새로운 감염을 일으키는 주요한 인자이지만, 이를 준비하는 것은 매우 번거로운 일이므로 M38-P에서 제시한 바와 같이 소분생자를 사용하는 것이 더 유용하다고 생각된다. 따라서 본 연구자는 삼차원적으로 배양된 인공 피부 모델 위에 대표적인 피부사상균인 *T. mentagrophytes*의 microconidia를 감염시킨 후 최근에 표준화 되어 있는 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사의 실험 조건을 최대한 적용하여 보았다¹². 연구 결과 TBF 0.1 µg/ml, ICZ solution 0.01 µg/ml, ICZ powder 0.1 µg/ml, FCZ 10 µg/ml를 각각 첨가한 인공 피부에서 항진균 효과가 관찰되어 기존의 시험관 내 항진균제 감수성 연구와 잘 일치되었다. 이와 같이 본 연구자가 확립한 3차원적 각질형성세포 배양법을 이용한 항진균제의 감수성 검사 모델은 향후 새로운 항진균제의 개발 등에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

3. 일본의진균학회 표준화위원회 활동보고서

일본의진균학회 표준화위원회에서는 1998년부터 2000년까지 3년간 다음과 같은 사업을 시행하여 2002년 4월 일본의진균학회지에 보고하였다¹³. 표준화위원회의 이러한 활동은 기초 연구 및 임상 연구, 검사실 검사 및 임상치료에 도움이 되는 정보를 제공하려는 목적으로 시도되고 있다.

1) 항진균제 감수성 시험법의 표준화를 위한 여러 시설간 시험 결과 비교

일본의진균학회에서는 1992년부터 1994년까지 표준화위원회에서 시행한 연구 결과를 기초로 하여 1995년 『표준화위원회 제안법』이라고 하는 항진균제 감수성 검사법을 발표하였다. 이는 마이크로 액체희석법으로서 이 방법을 사용한 kit (효모양진균 FP 榮研)가 이미 상용화되어 있다. 그러나 이러한 kit의 동일 시설 내의 재현성이나 다른 시설간의 일치도에 대하여 아직 평가가 없었으므로 이에 대하여 알아보았다. 또한 표준 균주에 대하여 NCCLS M27-A에 의한 MIC 결과와 이 kit에 의한 결과를 비교하여 이 두가지 검사법의 호환성에 대하여도 알아보았다. 연구 결과 24시간 배양 시보다 48시간 배양 시 NCCLS M27-A에 의한 실험 결과와 더욱 일치되었으므로 추후 배양 시간을 48시간으로 변경시킬 것을 제안하였다.

2) 외용항진균제의 임상 평가법

족부백선, 체부백선 및 완선을 대상으로 외용 항진균제의 치료 효과에 대한 임상시험을 실시한 국내, 국외의 연구논문을 취합하여 그 평가법을 비교하여 보았다. 그 결과 일본 국내의 임상평가법에서 개선하여야 할 점이 다음과 같이 지적되었다.

(1) 약제 도포 종료시 뿐만 아니라 2주간의 follow up 기간 이후에 다시 치료 효과를 판정하는 것이

필요하였다.

(2) 진균검사로서는 직접도말검사 뿐 아니라 진균배양검사나 neutral red와 같은 검사를 더 도입하는 것이 필요하다.

(3) 임상평가에서 각 증상별로 score를 매겨서 그 합을 구하여 보는 서구의 방법은 문제점이 있으므로 그대로 도입하는 것은 지양하여야 한다.

3) 심재성 진균증에 대한 vaccine 개발의 현황과 전망

최근 발표된 기초적인 연구 논문을 review하여 정리하여 보고함.

참 고 문 헌

1. Espine-Ingroff A, Barchiesi F, Hazen KC, Martinez-Suarez JV, Scalise G. Standardization of antifungal susceptibility testing and clinical relevance. *Med Mycol* 1998; 36: 68-78
2. Espine-Ingroff A, Warnock DW, Vazquez JA, Arthington-Skaggs BA. *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Med Mycol* 2000; 38(suppl 1): 293-304
3. Norris HA, Elewski BE, Ghannoum MA. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: S9-13
4. Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasan I, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: Establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 341-344
5. Fernandez-Torres B, Vazquez-Veiga H, Llovo X, Pereiro Jr. M, Guarro J. *In vitro* susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. *Chemotherapy* 2000; 46: 390-394
6. Jessup CJ, Ryder NS, Ghannoum MA. An evaluation of the *in vitro* activity of terbinafine. *Med Mycol* 2000; 38: 155-159
7. Arrese JE, Schrooten P, De Donker P, De Smett H, Cauwenbergh G, Pierard-Franchimont C, Pierard GE. Fungal cultures on cyanoacrylate skin surface strippings as a dose-finding method for topical antifungals. A placebo-controlled study with 0.25% and 0.50% itraconazole cream. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 127-130
8. Pierard GE, Arrese JE, De Donker P. Antifungal activity of itraconazole and terbinafine in human stratum corneum: A comparative study. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 429-435
9. Rashid A, Edward M, Richardson MD. Activity of terbinafine on *Trichophyton mentagrophytes* in human living equivalent model. *J Med Vet Mycol* 1995; 33: 229-233
10. Rashid A, Scott E, Richardson MD. Inhibitory effect of terbinafine on the invasion of nails by *Trichophyton mentagrophytes*. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 718-723
11. Richardson MD. Effect of Lamisil[®] and azole antifungals in experimental nail infection. *Dermatology* 1997; 194(suppl 1): 27-31
12. 김정애, 이종희, 이동윤, 문상은, 조광현. 3차원적 각질형성세포 배양법을 이용한 항진균제의 감수성 검사. *대한피부과학회지* 2002; 40: 341-347
13. Shinoda T, Makimura K, Oguri T, Mikami Y, Kume H, Matsumoto T, Mochizuki T, Ikeda R, Mori T,

항진균제 감수성 검사의 임상적 이용 (Clinical Applications of Antifungal Susceptibility Testing)

전남대학교 의과대학 진단검사의학교실

신 종 희 (Jong Hee Shin)

현재까지 항진균제 감수성 검사는 세균의 감수성 검사처럼 잘 개발되거나 이용되고 있지는 않다. 그러나, 증가하는 칸디다 감염의 적절한 치료제 선택을 위해서는 항진균제 감수성 검사의 제한점, 축적된 정보, 그리고 임상적 응용에 대한 최신지견을 아는 것이 필요하다.

1. 임상적 결과와의 관계

칸디다에 대한 azole 항진균제 감수성 검사는 임상적 결과를 예견할 수 있다. NCCLS 소위원회에서는 칸디다의 항진균제 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, 이하 MIC)와 임상적 결과와의 관계를 분석하여 fluconazole과 itraconazole에 대한 MIC breakpoint를 제시하였다 (Table 1). 이는 NCCLS macrodilution과 microdilution법을 기준으로 한 것이며 fluconazole에 대한 결과 해석은 점막 및 심부성 칸디다 감염에 적용되며, fluconazole에 자연 내성을 갖는다고 알려진 *C. krusei*에는 적용되지 않는다. 또 itraconazole에 대한 해석 MIC breakpoint는 점막 칸디다 감염에만 적용된다.

그러나, amphotericin B 감수성 검사는 MIC의 측정방법의 개선과 MIC와 임상적 치료결과와의 관계에 대해 추후 더 많은 연구가 필요하다. 현재 알려진 모든 항진균제 감수성 검사법은 칸디다의 amphotericin B 내성을 검출하는데 문제가 있다고 생각되고 있다. 한편, 크립토크스증은 재발성 혹은 재감

Table 1. Interpretive guidelines for in vitro susceptibility testing of yeast isolates using National Committee for Clinical Laboratory Standards approved methods

Antifungal agent	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Interpretation	Clinical outcome (% success)
Fluconazole	≤ 8.0	Susceptible	97
	16~32	Susceptible-dose dependent	82
	≥ 64	Resistant	60
Itraconazole	≤ 0.12	Susceptible	90
	0.25~0.5	Susceptible-dose dependent	63
	≥ 1.0	Resistant	53
Flucytosine	≤ 4.0	Susceptible	Not available
	8~16	Intermediate	Not available
	≥ 32	Resistant	Not available

염의 균주에 대한 fluconazole 감수성 검사는 유용할 수 있으나, 해석 기준은 아직 없으며, 사상형 진균 감염에 대해서도 균주의 감수성 검사는 권장되지 않으며 해석 기준도 아직 없다.

2. 항진균제 검사를 시행하는데 있어 문제점

가장 중요한 문제점은 fluconazole 등 azole계의 MIC 판정에 있어 재현성이 부족하다는 점이다. 대표적 이유로는 trailing 효과를 들 수 있는데, 이는 fluconazole 등 azole계 약제의 fungistatic activity로 인해 시험관내 약제 농도가 계속 증가해도 균의 증식이 부분적으로 계속 관찰되는 현상이다. 이 효과를 보이는 균주는 대개 24시간 배양 후 감수성을 보이나 48시간 후엔 MIC가 64 µg/mL 이상으로 증가되므로, NCCLS의 권장대로 48시간 후 MIC를 판정하게 되면 azole 내성으로 잘못 판정될 수 있다. 연구 결과 trailing 효과는 균의 내성을 의미하는 것이 아니며, 생체에서도 감수성이었다. Trailing 효과를 보이는 칸디다 균에 대한 해결방법은 다음 몇 가지가 알려져 있다. 첫째, microdilution법 (spectrophotometric method 포함)을 시행한 후 fluconazole MIC를 판정할 때 대조에 비해 성장이 50% 억제된 최소 농도로 판정한다. 둘째, fluconazole (8 및 16 µg/mL)이 포함된 CHROMagar *Candida* 등을 이용한 한천희석법이나 NCCLS macrodilution법으로 확인 검사를 시행한다. 셋째, *C. albicans*의 azole 감수성 검사를 시행할 경우 RPMI-2% glucose 배지 및 더 높은 농도 (10⁴ CFU/mL)의 균액을 사용한다. 그 외 최근에는 ergosterol 합성 정량 측정법 등도 시도되고 있다.

3. 항진균제 감수성 정보의 임상적 이용

지난 10년간 혈액에서 분리된 칸디다 균주에 대한 각국의 보고들을 종합할 때, azole에 대한 획득 내성의 증가는 없었고, 칸디다는 균종간에 azole에 대한 내재성 내성이 차이가 있음이 보고되었다. 이 결과들을 종합하면 fluconazole에 자연 내성이 있다고 알려진 *C. glabrata*와 *C. krusei* 균주 중 내성 균주는 각각 7% 및 36%인 반면에, *C. albicans*, *C. tropicalis* 및 *C. parapsilosis*는 fluconazole에 대해 내성인 균주가 1% 이내이다. 또한 *C. albicans*의 fluconazole에 대한 획득 내성은 주로 fluconazole 치료를 장기간 받은 구인두 칸디다증 HIV 환자에서만 관찰되고, 침습성 칸디다증에서는 매우 드물다. 따라서 칸디다 균종의 동정은 항진균제에 대한 내성을 알아내는 지표가 될 수 있다 (Table 2). 또 보통 *Trichosporon*, *Aspergillus terreus*, *Fuarium* 및 *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium proliferans* 등도 amphotericin B에 내성이 있다고 알려져 이 균의 동정이 치료방침을 결정하는데 이용될 수 있다. 덧붙여, 항진균제 감수성

Table 2. General patterns of susceptibility of *Candida* species

<i>Candida</i> species	Fluconazole	Itraconazole	Flucytosine	Amphotericin B
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S
<i>C. glabrata</i>	SDD to R	SDD to R	S	S-I
<i>C. krusei</i>	R	SDD to R	I-R	S-I
<i>C. lusitaniae</i>	S	S	S	S to R

S, susceptible; SDD, susceptible-dose dependent; I, intermediate; R, resistant

결과를 임상적으로 이용함에 있어서 먼저 고려해야 할 것은 진균감염 환자에서 항균제 치료의 임상적 효과를 예견하는 지표로서 생체의 감수성 결과보다는 숙주측 요인이 더 중요하다는 점이다.

4. 항진균제 감수성 검사의 현재

현재 임상적 항진균제 감수성 검사는 권장되지 않는다. 그 대신 감염 병소 (심부)에서 분리된 칸디다 균주를 species level까지 동정하고, 사상형 진균의 genus level까지 동정하여 이를 토대로 항진균제를 선택하는 것이 권장된다. 구인두 칸디다증 (후천성 면역결핍증)의 경우 azole에 대해 반응이 없는 환자에게 fluconazole이나 itraconazole 감수성 검사가 유용하기도 하지만 임상적 항진균제 감수성 검사는 권장되지 않는다. 침습성 칸디다증에서 분리된 칸디다 (특히 *C. albicans*가 아닌 균) 균에 대해서도 검사 요구가 있는 경우에만 선택적으로 시행하도록 권장되고 있다. 그러나, 역학적 조사의 일환으로 주기적으로 선택된 일부 칸디다 균주에 대한 감수성 검사하거나, 한 기관내 antibiogram 설정하기 위해 amphotericin B, fluconazole, itraconazole 및 5-FC 등에 대해 항진균제 감수성 검사가 권장된다. 항진균제 감수성 검사는 방법의 개선, 감수성 결과와의 관계에 대한 보다 깊은 연구를 통해 가까운 미래에는 진균감염의 적절한 치료를 위하여 세균의 항균제 감수성 검사처럼 임상적 검사로서 검사실에서 이용될 수 있으리라 생각된다.

● 연자 소개 ●

성 명 : 신 종 희

1983. 2	전남대학교 의과대학 졸업
1989. 2	전남대 대학원 의학박사
1983. 3 ~ 1987. 2	전남대병원 인턴 및 전남대병원 임상병리과 전공의
1987. 3 ~ 1992. 8	광주 보훈병원 임상병리과 과장
1992. 8 ~ 1998. 9	전남대학교 의과대학 전임강사 및 조교수
1994. 12 ~ 1995. 12	미국 에모리 대학병원 및 Centers for Diseases Control (CDC) 연구교수
1998. 10 ~ 현재	전남대학교 의과대학 부교수
2002. 3 ~ 현재	전남대학교병원 진단검사의학과 과장