

피부사상균의 항진균제 감수성 검사

영남대학교 의과대학 피부과학교실, 병리학교실¹

문석기 · 신동훈 · 최종수 · 김기홍 · 김극준¹

= Abstract =

Antifungal Susceptibility Testing of Dermatophytes

Seok Ki Moon, Dong Hoon Shin, Jong Soo Choi, Ki Hong Kim and Keuk Jun Kim¹

Department of Dermatology, Pathology¹, College of Medicine,
Yeungnam University, Daegu, Korea

Background: A standardized reference method for dermatophytes in vitro susceptibility testing is lacking. However, with increasing variety of drugs available to treat dermatophytosis, the need for a reference method for dermatophytes testing has become apparent.

Objective: To evaluate a method of quantifying dermatophytes, the standards for broth microdilution method and evaluation of the availability of disk diffusion method in antifungal susceptibility testing for dermatophytes.

Methods: 14 *Candida* species (sp.), 30 *Trichophyton(T.) mentagrophytes*, 9 *T. raubitschekii* and 11 *T. rubrum* were tested for fluconazole susceptibility by the broth microdilution method and disc diffusion method. *Candida* sp. was tested according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) M27-A and M44-A. Broth microdilution method for *T. mentagrophytes*, *T. raubitschekii* and *T. rubrum* was operated according to NCCLS M38-A. Disk diffusion method for *T. mentagrophytes*, *T. raubitschekii* and *T. rubrum* was tested refer to NCCLS M44-A.

Result: The disk diffusion method showed 50% correlation rate with the broth microdilution method for antifungal susceptibility testing for *Candida* species. The MIC reading point and incubation time of the broth microdilution method for *T. mentagrophytes*, *T. raubitschekii* and *T. rubrum* are Spec-50 and from 7, 6 and 9 days. Relation between the broth microdilution method and disk diffusion method for dermatophytes is poor.

Conclusions: The good method for quantifying dermatophytes is using vortexing only or liquid nitrogen and homogenizer. Standards of MIC reading point and incubation time of microdilution method for dermatophytes are Spec-50 and from 6 to 9 days. It appears that the disk diffusion method is not recommended method for the antifungal susceptibility testing of dermatophytes.

[Kor J Med Mycol 2008; 13(2): 61-74]

Key Words: Antifungal susceptibility test, Dermatophytes, Disk diffusion method, Microdilution method

[†]별책 요청 저자: 최종수, 705-717 대구광역시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 피부과학교실
전화: (053) 620-3160, Fax: (053) 622-2216, e-mail: jschoi@med.yu.ac.kr

*본 논문의 요지는 2007년 4월 18일 제 59차 대한피부과학회 춘계학술대회에서 발표하였음.

서 론

면역기능저하는 기회감염 및 병원감염을 유발하며, 특히 진균감염이 증가하고 있는 추세이다. 진균감염 환자의 증가에 따른 항진균제 사용의 증가는 항진균제에 대한 내성균 출현 문제를 야기하게 되었으며, 적절한 항진균제의 선택을 위해서 항진균제에 대한 감수성 검사의 필요성이 제기되었다. 우리나라에서 노인 인구가 증가하고, 조갑진균증이 증가하고 있다. 조갑진균증의 경우 적절한 항진균제 치료에 저항하는 경우가 있어, 이러한 경우에 피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사가 필요하다.

항진균제에 대한 감수성 검사는 검사실간의 결과가 일치하지 않고 재현성이 낮은 것이 가장 큰 문제점이었다. 이의 해결을 위해서 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서는 1982년부터 항진균제 감수성 검사를 위한 소위원회를 구성하여 표준화된 방법을 제시하였다. *Candida species* (sp.)에 대한 검사법으로 'Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts' 라는 제목의 NCCLS M27-A2¹, 'Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing' 라는 제목의 NCCLS M44-A²를 제시하였다. 사상형 진균에 대한 검사법으로는 'Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi' 라는 제목의 NCCLS M38-A³를 제시하였다. 그러나 이 방법은 *Candida* sp.와 일부 사상형 진균인 *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus arrhizus*, *Pseudoallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*)와 *Sporothrix schenckii*와 다른 기회감염 진균에 한정되며, 피부과 영역에서 중요한 피부사상균에 대해서는 표준화가 되어 있지 않고, 이들과 성장 속도와 균 요소들이 다르므로 이상의 검사법을 그대로 적용할 수 있는지에 대한 검토가 필요하다⁴. 피부사상균에 대한 항진균제 검사법의 표준화가 어려운 이유 중에서 가장 큰 문제는 균을 정량

화하는데 어려움이 있는 것이다.

액체배지미량회석법은 실험 과정이 복잡하며, 장비와 노동력이 많은 드는 단점이 있는 반면, 디스크 확산법은 실험 과정이 간단하며, 특별한 장비가 필요하지 않고, 판독이 용이한 장점이 있다⁵. 그러나 사상형 진균에 대한 디스크 확산법은 표준화되어 있지 않고, 피부사상균에 대한 보고는 거의 없는 실정이다.

이에 저자는 먼저 피부사상균을 대상으로 항진균제 검사법을 시행할 때 균을 정량화하는 새로운 방법을 제시하고자 하였다. 두 번째로 NCCLS에서 제시한 항진균제 감수성 검사법 중 액체배지미량회석법을 피부사상균에도 적용할 수 있는지 알아보고, 판독 기준을 마련하고자 하였다. 마지막으로 피부사상균의 항진균제 감수성 검사법으로 디스크 확산법이 유용한지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1) 대상 균주

대상 균주는 *Candida* sp., *Trichophyton(T.) mentagrophytes*, *T. rubrum*과 *T. raubitschekii*를 사용하였다. *Candida* sp.는 전남대학교의과대학 진단검사의학교실 (신중희 교수)에서 분양받은 임상 분리주 10주와 American type culture collection (ATCC) 표준 균주 4주를 사용하였다. *Candida* sp.는 *C. albicans* 4주, *C. tropicalis* 2주, *C. glabrata* 4주, *C. parapsilosis* 3주, *C. krusei* 1주였다. *T. mentagrophytes* 30주, *T. rubrum* 11주, *T. raubitschekii* 9주는 대구광역시 소재 가톨릭피부과의원에서 분양받은 임상 분리주를 사용하였다. 정도 관리 균주로는 NCCLS에서 제시한 *C. parapsilosis* ATCC 22019와 *C. krusei* ATCC 6258을 사용하였다.

2) 항진균제

항진균제는 플루코나졸 분말 (Diflucan, Pfizer Korea, Korea)을 이용하였다. 항진균제 디스크는 25 µg 플루코나졸 디스크 (Difco, Oxoid, UK)와 6

mm 종이 디스크 (Whatman, England)를 이용하여 자체 제작한 25 µg, 50 µg 플루코나졸 디스크를 사용하였다.

3) 배 지

(1) 액체배지미량희석법을 위한 배지 제작

항진균제 감수성 검사는 액체배지미량희석법인 NCCLS M27-A, M38-P법에 따라 RPMI-MOPS 배지를 이용하여 시행하였다. RPMI-MOPS 배지의 제조는 RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, USA) 분말 16.2 g과 MOPS (3-N-morpholinopropanesulfonic acid) 65.08 g를 증류수 1 L에 녹인 다음 10M NaOH로 pH를 7.0~7.2로 맞추어 사용 전까지 4°C에 보관하였다. 플루코나졸은 RPMI-MOPS 배지를 이용하여 각각 64~0.125 µg/ml가 되도록 배수 희석하여 10개의 농도로 만들어 96 microwell plate (Nunc, Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark)에 1번에서 10번 well까지 각 well당 100 µl씩 분주하였다.

(2) 디스크 확산법을 위한 Mueller-Hinton agar glucose methylene blue (MH-GMB) 배지 제작

Mueller-Hinton broth 21 g, agar 15 g을 증류수 1 L에 녹여 배지를 만들었다. Methylene blue 염료 1 g을 증류수 20 ml에 녹인 것 100 µl와 glucose 20 g을 배지에 첨가하였다. 만들어진 배지를 고압 멸균기로 처리하고 (121°C, 15 LB, 15분), 배양 접시에 부어 평판배지를 만들었다. 만들어진 MH-GMB 배지를 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

(3) 플루코나졸 디스크의 제작

100 mg/50 mL, 50 mg/50 mL의 플루코나졸 희석액을 만들어 6 mm 종이 디스크에 25 µl 접종하여 50 µg, 25 µl 플루코나졸 디스크를 만들고, 건조기에 24시간 이상 건조시켰다. 건조가 끝난 디스크는 사용 전까지 4°C에 보관하였다.

2. 방 법

1) *Candida* sp.를 대상으로 한 항진균제 감수성 검사

(1) 액체배지미량희석법

Candida sp.를 대상으로 한 액체배지미량희석

법은 NCCLS M27-A법에 따라 실험을 시행하였다. 균주는 Sabouraud dextrose agar (SDA) 평판 배지에 35°C, 24시간 배양 후 0.85% 식염수에 균을 풀어 잘 섞은 후 0.5 McFarland 탁도 (spectrophotometer, 530 nm)로 맞추어 균 농도가 약 $1\sim5 \times 10^6$ CFU/ml가 되도록 하였다. 이 균액을 다시 RPMI-MOPS 배지를 이용하여 1:100으로 희석하였고, 플루코나졸이 농도별로 분주된 microwell plate의 1번에서 10번 well까지 각각 100 µl씩을 분주하였다. 11번 well은 양성 성장 대조 well로서 균액 100 µl와 항진균제가 포함되지 않은 RPMI-MOPS 배지 100 µl를 분주하였고, 12번 well은 음성 성장 대조 well로서 항진균제가 포함되지 않은 RPMI-MOPS 배지 200 µl를 분주하였다. 균 접종이 끝난 microplate는 35°C에서 24시간 및 48시간 동안 배양하였다. NCCLS M27-A법에서는 육안 판독을 하도록 하였으나, 정확한 판독을 위해 ELISA microplate reader (Biotek Instrument, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하여 균 성장 여부를 확인하였다. 최소억제농도 (MIC: minimal inhibitory concentration) 판정은 양성 성장 대조 well에 비해 흡광도가 50% 억제된 최소항진균제 농도 (Spec-50)를 기준으로 판정하였다.

(2) 디스크 확산법

Candida sp.를 대상으로 한 디스크 확산법은 NCCLS M44-A법에 따라 시행하였다. Sabouraud dextrose agar (SDA) 평판배지에 35°C, 24시간 배양한 균주를 0.85% 식염수에 풀어 잘 섞은 후 0.5 McFarland 탁도 (spectrophotometer, 530 nm)로 맞추어 균 농도가 약 $1\sim5 \times 10^6$ CFU/ml가 되도록 하였다. 이 균액을 소독된 면봉을 이용하여 MH-GMB 배지에 고르게 도말하고 플루코나졸 디스크를 올렸다. 균을 접종한 배지는 35°C에서 배양하였고, 24시간, 48시간 후에 균의 성장이 억제된 억제대의 크기를 mm 단위로 측정하였다.

2) 피부사상균을 대상으로 한 항진균제 감수성 검사

(1) 액체배지미량희석법

피부사상균을 대상으로 한 항진균제 감수성 검

사는 NCCLS M38-P법을 인용하여 실험을 시행하였다. 균액의 준비는 균주에 따라 방법을 달리 하였다. *T. menatagrophytes*, *T. raubitschekii*의 경우, 7일간 25°C에서 배양한 균 집락을 1 ml의 멸균 증류수가 담긴 멸균 튜브에 옮겨 혼합하고, 혼합물에서 무거운 과편이 가라앉도록 3~5분간 방치하였다. 혼합물의 상층액을 새로운 멸균 튜브로 옮겨 혼합하여 섞은 후 준비하였다. *T. rubrum*의 경우에는 균질화된 균액을 얻기 위하여 동결과쇄과정을 추가하였다. 균액의 상층액을 microtube (2 ml, Sarstedt, Aktlengesellschaft & Co., Germany)에 옮겨 glass bead (2 mm, Sigmund Linder, France)를 넣고 액체 질소로 균액을 얼린 후, 얼린 균액을 homogenizer (Precellys® 24 homogenizer, Bertin technologies, France, 5000 rpm, 20 sec, ×3)를 이용하여 균액을 균질하게 하였다. 이렇게 준비한 균액을 분광광도계 (spectrophotometer)를 이용하여 optical density (OD)가 0.09~0.11 (80~82% transmittance)이 되도록 하였다. 이 균액을 다시 RPMI 배지를 이용하여 1:50으로 희석하고, 1번에서 10번 well까지 각각 100 µl (최종 균 농도, 0.4~5.0×10⁴ CFU/ml) 씩을 분주하였다. 11번 well은 양성 성장 대조 well, 12번 well은 음성 성장 대조 well로 사용하였다. 균 접종이 끝난 microplate는 25°C에서 배양하여 접종 후 1일부터 13일까지 ELISA microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 균 성장 여부를 확인하였다.

(2) 디스크 확산법

NCCLS M44-A법을 인용하여 실험을 시행하였다. 액체배지미량희석법에서 사용한 균액을 hemocytometer를 이용하여 소분생자 또는 짧은 균사의 수를 세어 균액의 농도를 측정하였다. *T. mentagrophytes*는 소분생자 수가 5×10²~2.25×10⁵/plate, *T. raubitschekii*는 6×10⁴~3×10⁵/plate가 되도록 접종하였고, *T. rubrum*은 짧은 균사의 수가 8.4×10⁴~1.7×10⁶/plate가 되도록 접종하였다. 균을 접종한 배지를 소독된 유리막대로 문질러 균이 균일하게 접종되도록 하였다. 접종이 끝난 배지 위에 기존의 25 µg 플루코나졸 디스크와

자체 제작한 25 µg, 50 µg 플루코나졸 디스크를 올려두고 25°C에서 배양하였다. 배지에 균 집락이 나타나기 시작한 3일부터 7일까지 관찰하여, 균의 성장이 나타나지 않은 억제대의 크기를 mm 단위로 측정하였다.

3. 통계적 분석

본 조사의 통계적 분석은 SPSS 12.0 kor version을 사용하여 Pearson 상관계수 및 회귀분석을 시행하였고, *p* value가 0.05 미만인 경우를 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

결 과

정도 관리 균주로서 액체배지미량희석법에서는 *C. parapsilosis* ATCC 22019 (플루코나졸 최소억제농도, 2.0~8.0 µg/ml)와 *C. krusei* ATCC 6258 (플루코나졸 최소억제농도, 16~64 µg/ml)을 사용하였으며, 디스크 확산법에서는 *C. parapsilosis* ATCC 22019 (25 µg 플루코나졸 디스크 억제대, 22~33 mm)를 사용하였으며, 매 검사마다 모두 적정범위에 속하였다.

1. *Candida* sp.에 대한 항진균제 감수성 실험 결과

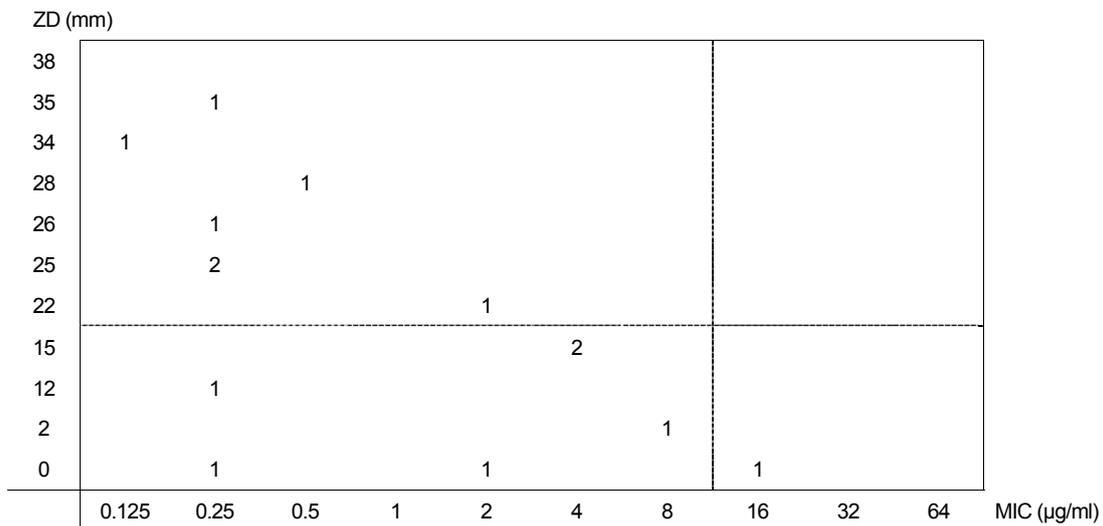
1) 액체배지미량희석법

정도 관리 균주를 포함하여 총 14주를 대상으로 실험하였다. 액체배지미량희석법에서 24시간 최소억제농도는 0.125~16 µg/ml, 48시간 최소억제농도는 0.125~64 µg/ml로 나타났다. NCCLS에서 제시한 감수성 판단 기준 (8 µg/ml 이하는 감수성, 16~32 µg/ml는 용량의존성 감수성, 64 µg/ml 이상은 내성)에 의하면¹ 24시간 결과에서는 13주는 감수성, 1주는 용량의존성 감수성으로 판독하였고, 48시간 결과에서는 12주는 감수성, 1주는 용량의존성 감수성, 1주는 내성으로 판독하였다. 1주에서는 24시간 경과 후에는 감수성 균주로 판독하였으나, 48시간 경과 후에는 내성 균주로 판독하였다.

2) 디스크 확산법 시한 표준화된 방법으로 균의 성장이 나타나지 않는 억제대의 지름을 mm 단위로 표시하였다.

Table 1. Comparison of MICs and inhibition zone diameter of *Candida* species between broth microdilution and disk diffusion method

Strain	Species	Microdilution Method		Disk Diffusion Method Inhibition Zone Diameter (mm)
		24 hr MIC (µg/ml)	48 hr MIC (µg/ml)	
CA 185	<i>C. albicans</i>	0.25	2	25
CA 211	<i>C. albicans</i>	0.125	0.125	34
CA 108	<i>C. albicans</i>	0.25	0.25	35
ATCC 90028	<i>C. albicans</i>	0.5	1	28
CT 28	<i>C. tropicalis</i>	0.25	64	0
CT 68	<i>C. tropicalis</i>	0.25	1	12
CG 181	<i>C. glabrata</i>	4	0.125	15
CG 182	<i>C. glabrata</i>	2	4	0
CG 180	<i>C. glabrata</i>	4	8	15
ATCC 90030	<i>C. glabrata</i>	8	8	2
CP 130	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	0.25	26
CP 226	<i>C. parapsilosis</i>	0.25	0.25	25
ATCC 22019	<i>C. parapsilosis</i>	2	2	22
ATCC 6258	<i>C. krusei</i>	16	16	0



*Numbers within figure are the numbers of strains that correlate with each value. Dotted lines are standard of susceptibility. Upper and left side of dotted lines is the area of susceptibility

* The regression statistic is $y=21.5-1.6x$, $r=0.58$

Fig. 1. Relationship between MIC of broth microdilution method (24 hr, Spec-50) and inhibition zone diameter of disk diffusion method (25 µg fluconazole disk) for *Candida* species

Table 2. MIC of the *T. mentagrophytes* on broth microdilution method

Strains	Spec-80* (µg/ml)					Spec-50* (µg/ml)				
	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8	Day 9
C1	16	2	2	2	4	0.125	0.125	0.5	0.5	1
C2	8	8	8	8	16	2	4	4	4	4
C3	8	16	8	8	8	2	4	4	4	4
C4	8	16	16	32	32	2	4	4	16	16
C5	16	16	32	32	32	8	16	8	8	8
C6	16	16	16	16	16	4	8	8	16	16
C7	64	32	8	8	8	8	8	2	2	2
C8	4	4	4	4	8	0.125	0.5	2	4	4
C9	16	32	8	8	8	16	8	8	8	8
C10	32	32	8	8	8	8	8	8	8	8
C11	64	16	64	16	16	1	1	1	16	16
C12	64	64	16	16	16	16	8	8	8	16
C13	64	64	8	8	32	32	8	4	4	8
C14	32	32	2	4	4	0.125	0.25	0.25	0.25	1
C15	64	1	2	2	4	0.125	0.125	0.125	0.25	0.25
G1	1	1	1	2	4	1	1	1	1	1
G2	16	16	8	16	16	1	1	4	4	8
G3	8	8	32	32	32	0.5	0.5	8	8	8
G4	16	16	16	16	32	8	16	16	16	16
G5	16	16	16	32	32	4	8	16	16	16
G6	8	8	16	32	32	8	8	8	8	8
G7	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
G8	0.5	0.5	0.5	1	1	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
G9	0.5	1	1	1	1	0.5	0.5	0.5	1	1
G10	2	2	2	2	2	1	2	0.5	0.5	0.5
G11	16	8	4	4	8	0.125	0.125	1	1	4
G12	2	8	8	16	16	2	2	8	8	8
G13	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64
G14	1	0.5	1	4	4	0.5	0.5	0.5	2	4
G15	2	4	4	4	4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Susceptible ^a	13	14	19	17	16	25	26	26	23	22
Resistant ^b	7	3	3	2	2	2	2	2	2	2

* Spec-80, 50: MIC was determined at the 80% or 50% decreased point of spectrophotometric value of the positive control well

a: Number of susceptible strains (susceptible ≤ 8 µg/ml: a standard of *Candida* sp. for fluconazole, from NCCLS M27-A)

b: Number of resistant strains (resistant ≥ 64 µg/ml: a standard of *Candida* sp. for fluconazole, from NCCLS M27-A)

판독은 배양 24시간 후에 실시하였으며, 균의 성장이 충분하지 않은 경우는 48시간에 판독하였다. 각 균주별 디스크 확산법 결과는 0~35 mm로 나타났다.

각 균주는 억제대의 크기에 따라 감수성, 용량의존성 감수성, 내성으로 판독하였다. 판독 기준은 NCCLS에서 제시한 기준에 따라 19 mm 이상은 감수성, 15~18 mm는 용량의존성 감수성, 14 mm 이하는 내성으로 판독하였다. 이 기준에 의하면 7주는 감수성, 2주는 용량의존성 감수성, 5주는 내성으로 판독하였다 (Table 1).

3) 액체배지미량희석법과 디스크 확산법의 비교

액체배지미량희석법의 24시간 결과와 디스크 확산법 사이의 상관관계는 7주에서 일치하는 결과가 나왔으며, 결과의 일치율은 50%로 나타났다. 이 결과를 그래프로 표현하여 두 방법 사이의 관계를 확인하였다. 액체배지미량희석법에서 감수성이 있는 것으로 판독된 12주에서 디스크 확산법의 판독 기준으로 분류하였을 때, 7주는 감수성, 2주는 용량의존성 감수성, 3주는 내성으로 판독되었다. 액체배지미량희석법에서 용량의존성 감수성 균주로 판독된 2주는 디스크 확산법에서 내성으로 판독되었다 (Fig. 1).

2. *T. mentagrophytes*에 대한 항진균제 감수성 실험 결과

1) 액체배지미량희석법

30주의 *T. mentagrophytes*를 사용하였으며, ELISA microplate reader로 양성 성장 well의 균 성장이 확인된 3일부터 13일까지 각 well의 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 양성 성장 well에 비해 80% 감소한 지점 (Spec-80)과 50% 감소한 지점 (Spec-50)을 최소억제농도로 결정하였다. Spec-80보다 Spec-50에서 일정한 결과를 보였으며, Spec-50의 7~8일 사이에 최소억제농도 변동이 가장 적었다. 7일째에 비해 13일째에 최소억제농도가 4배 이상 증가한 균주는 30주 중에서 12주였다. 각 균주별 최소억제농도를 *Candida* sp.의 판독 기준을 적용하여 감수성 여부를 판단하였으며,

Table 3-1. Inhibition zone diameter of disk diffusion method for *T. mentagrophytes* (commercial 25 µg fluconazole disk)

Strains	Day 3 ^a			Day 4		
	*5×10 ²	5×10 ³	5×10 ⁴	5×10 ²	5×10 ³	5×10 ⁴
G1	0	0	0	0	0	0
G2	-	-	0	-	-	0
G3	-	-	0	-	-	0
G4	0	0	0	0	0	0
G5	0	0	0	0	0	0
G6	-	-	0	-	-	0
G7	0	0	0	0	0	0
G8	30 ^{**}	30	40	30	30	40
G9	40	40	40	40	40	40
G10	-	-	20	-	-	18
G11	-	-	0	-	-	0
G12	0	0	0	0	0	0
G14	-	-	0	-	-	0
G15	-	-	0	-	-	0

a: incubation time

* inoculation density: inoculation count/plate

(-): not tested

** unit: mm

7일째에 Spec-50을 기준으로 하였을 때 감수성 균주 26주, 내성 균주 2주로 판독되었으며, Spec-80을 기준으로 하였을 때 감수성 균주 19주, 내성 균주 3주로 판독되었다. 일부 균주에서는 시간이 지날수록 최소억제농도가 증가하는 현상이 나타났다 (Table 2).

2) 디스크 확산법

기존의 25 µg 플루코나졸 디스크 확산법을 시행하였을 때 14주 중 G8, G9, G10의 3주에서만 억제대가 형성되었으며, 나머지 11주는 억제대가 형성되지 않았다. 억제대는 3일째부터 육안적 판독이 가능하였으며, 그 크기는 3~5일 동안 판독하였을 때 변화가 없었다. 또한 각 접종 균수에 따른 억제대 크기의 차이는 억제대가 형성된 균주가 적어 비교하기 어렵지만, 억제대가 형성된 균주에서는 크기에 큰 차이가 없었다 (Table 3-1).

Table 3-2. Inhibition zone diameter of disk diffusion method for *T. mentagrophytes*

Strains	Day 3 ^a			Day 4			MIC ^b (µg/ml)
	C25 ^c	S25 ^d	S50 ^e	C25	S25	S50	
G1	0	0	0	0	0	0	1
G2	0	0	0	0	0	0	4
G3	0	0	0	0	0	0	8
G4	0	0	0	0	0	0	16
G5	0	0	0	0	0	0	16
G6	0	0	0	0	0	0	8
G7	0	0	0	0	0	0	64
G8	30*	30	40	30	30	40	0.125
G9	20	20	25	20	20	25	0.5
G10	20	20	25	20	20	25	0.5
G11	0	0	0	0	0	0	1
G12	0	0	0	0	0	0	8
G13	0	0	0	0	0	0	64
G14	0	0	0	0	0	0	0.5
G15	0	0	0	0	0	0	0.5

a: incubation time
 b: MIC of microdilution method, Spec-50, Day 7
 c: commercial 25 µg fluconazole disk
 d: self-made 25 µg fluconazole disk
 e: self-made 50 µg fluconazole disk
 * unit: mm

억제대의 크기를 *Candida* sp.의 판독 기준을 적용하여 감수성 여부를 판단하였으며, 억제대가 형성된 3주는 모두 감수성 균주에 포함되었다.

자체 제작한 25 µg, 50 µg 플루코나졸 디스크를 이용한 실험에서는 동일하게 G8, G9, G10 균주에서만 억제대가 형성되었으며, 25 µg 플루코나졸 디스크에서 억제대가 형성되지 않았던 균주 중에서 50 µg 플루코나졸 디스크에서 억제대가 형성된 균주는 없었다. 기존의 25 µg 디스크와 자체 제작한 25 µg 디스크 사이에는 억제대 크기의 차이는 없었다. 50 µg 디스크에서는 25 µg 디스크보다 약간 큰 억제대가 형성되었다 (Table 3-2).

3) 액체배지미량희석법과 디스크 확산법의 비교
 액체배지미량희석법의 Spec-50, 7일째의 결과

Table 4. MIC of the *T. raubitschekii* (Spec-50)

Strains	Day 4	Day 5	Day 6	Day 7	Day 8
TRa 205	0.125*	0.125	0.125	0.125	0.125
TRa 747	0.125	0.25	0.5	0.5	0.5
TRa IHAM	CR	CR	64	64	64
TRa 2042	CR	16	16	16	16
TRa 413	32	64	64	64	64
TRa 552	64	16	16	16	16
TRa 2041	0.25	1	1	1	1
TRa 926	CR	CR	CR	CR	CR
TRa 172	0.25	0.25	0.125	0.125	0.125
Susceptible	4	4	4	4	4
Resistant	1	1	2	2	2

CR: Could not read
 * unit: µg/ml

와 25 µg 플루코나졸 디스크를 사용한 디스크 확산법에서의 3일째 억제대 크기를 비교하였으며, 액체배지미량희석법에서 0.125~0.5 µg/ml에 해당하는 3개의 균주에서만 디스크 확산법에서 억제대가 형성되었다 (Table 3-2).

3. *T. raubitschekii*에 대한 항진균제 감수성 실험 결과

1) 액체배지미량희석법

9주의 *T. raubitschekii*를 사용하였으며 ELISA microplate reader로 양성 성장 well의 균 성장이 확인된 3일부터 12일까지 각 well의 흡광도를 측정하였다. 앞서 *T. mentagrophytes*의 실험 결과에 근거하여, *T. raubitschekii*의 최소억제농도 판정 기준도 Spec-50을 기준으로 하여 판독하였다. 양성 대조군의 성장이 뚜렷한 6일째부터 판독이 가능하였으며, 6일째부터는 최소억제농도가 일정하게 판독되었다. 1주에서는 판독 기간 동안 양성 대조 well의 균 성장이 충분하지 않아 최소억제농도를 판독할 수 없었다. 각 균주별 최소억제농도를 *Candida* sp.의 판독 기준을 적용하여 감수성 여부를 판단하였으며, 7일째에 Spec-50을 기준으로 하였을 때 감수성 균주 4주, 내성 균주 2주로

Table 5. Inhibition zone diameter of disk diffusion method for *T. raubitschekii*

Strains	Day 4			Day 5			MIC ^a (µg/ml)
	C25	S25	S50	C25	S25	S50	
TRa 205	0	10*	10	0	10	10	0.125
TRa 747	0	0	10	0	0	10	0.5
TRa IHAM	0	0	0	0	0	0	64
TRa 2042	0	18	20	0	18	20	16
TRa 413	0	0	0	0	0	0	64
TRa 552	8	9	16	8	9	16	16
TRa 2041	10	10	11	10	10	11	1
TRa 926	0	0	0	0	0	0	CR
TRa 172	0	0	0	0	0	0	0.125

a: MIC of microdilution method, Spec-50, Day 6, * unit: mm

판독되었다 (Table 4).

2) 디스크 확산법

균의 성장이 충분히 나타난 4일째부터 판독이 가능하였으며, 판독일자가 경과하여도 억제대의 크기 변화는 거의 나타나지 않았다. 억제대가 형성된 균주는 9주 중에서 5주였으며, 4주는 25 µg, 50 µg 디스크 모두에서 억제대가 형성되었으며, 50 µg 플루코나졸 디스크에 형성된 억제대의 크기가 25 µg 플루코나졸 디스크보다 크게 형성되었다. 1주는 50 µg 디스크 주위에서만 억제대가 형성되었다. 억제대의 크기는 8~20 mm 크기를 보였다. 억제대의 크기를 *Candida* sp.의 판독 기준을 적용하여 감수성 여부를 판단하면, 25 µg 플루코나졸 디스크에 의한 결과는 9주 중에서 1주는 용량의존성 감수성 균주, 8주는 내성 균주로, 50 µg 디스크를 기준으로 판독한 경우에 1주는 감수성 균주, 1주는 용량의존성 감수성 균주, 7주는 내성 균주로 판독되었다 (Table 5).

3) 액체배지미량희석법과 디스크 확산법의 비교

액체배지미량희석법의 Spec-50, 6일째의 결과와 25 µg 플루코나졸 디스크를 사용한 디스크 확산법에서의 4일째 억제대 크기를 비교하였을 때, 액체배지미량희석법에서 감수성 균주로 판독된 4주는 디스크 확산법에서는 모두 내성 균주로 판독되었다. 액체배지미량희석법에서 용량의존성

감수성 균주로 판독된 2주는 디스크 확산법에서 1주는 용량의존성 감수성 균주, 1주는 내성 균주로 판독되었으며, 액체배지미량희석법에서 내성 균주로 판독된 2주는 디스크 확산법에서 모두 내성 균주로 판독되었다. 50 µg 플루코나졸 디스크를 사용한 결과와 비교하였을 때 액체배지미량희석법에서 용량의존성 감수성 균주로 판독된 1주가 디스크 확산법에서 감수성 균주로 판독된 것 이외에는 25 µg 플루코나졸 디스크를 사용한 결과와 동일하였다 (Table 5).

4. *T. rubrum*에 대한 항진균제 감수성 실험 결과

1) 액체배지미량희석법

11주의 *T. rubrum*을 사용하였으며 ELISA microplate reader로 양성 성장 well의 균 성장이 확인된 3일부터 12일까지 각 well의 흡광도를 측정하였다. *T. raubitschekii*의 최소억제농도 판정 기준과 동일하게 Spec-50을 기준으로 하여 판독하였다. 양성 대조균의 성장이 뚜렷한 6일째부터 판독이 가능하였으며, 9일째부터는 최소억제농도의 변동 없이 일정하게 판독되었다. TR 913, TR 3481의 2주에서는 양성 대조균의 균 성장이 충분하지 않아 최소억제농도를 판독할 수 없었다. 각 균주별 최소억제농도를 *Candida* sp.의 판독 기준을 적용하여 감수성 여부를 판단하였으며, 8일째에 Spec-

Table 6. MIC of the *T. rubrum* (Spec-50)

Strains	Day 7	Day 8	Day 9	Day 11	Day 12
TR 923	16*	16	16	16	16
TR 899	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
TR 633	2	2	2	2	2
TR 913	CR	CR	CR	CR	CR
TR 960	1	1	1	1	1
TR 596	4	4	8	8	8
TR 932	2	2	2	2	2
TR 971	0.125	0.5	0.5	0.5	0.5
TR 3481	CR	CR	CR	CR	CR
TR 921	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
TR 735	64	64	64	64	64
Susceptible	7	7	7	7	7
Resistant	1	1	1	1	1

CR: Could not read
* unit: µg/ml

50을 기준으로 하였을 때 감수성 균주 7주, 내성 균주 1주, 용량의존성 감수성 균주 1주로 판독되었다 (Table 6).

2) 디스크 확산법

평균배지당 짧은 균사의 수가 $8.4 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^6$ 개가 되도록 접종한 후 억제대의 크기를 측정하였다. 균의 성장이 충분히 나타난 4일째부터 판독이 가능하였으며, 11주 중에서 2주에서 억제대가 형성되었다. 억제대의 크기는 25 µg 플루코나졸 디스크에서 16~23 mm, 50 µg 플루코나졸 디스크에서 20~29 mm로 나타났다. 기존의 25 µg 플루코나졸 디스크와 자체 제작한 25 µg 플루코나졸 디스크 사이에는 크기 차이가 없었으며, 50 µg 플루코나졸 디스크에서 약간 더 큰 억제대가 형성되었다. 판독 일자에 따른 억제대의 크기 변화는 관찰되지 않았다 (Table 7).

액체배지미량희석법의 Spec-50, 9일째의 결과와 플루코나졸 디스크를 사용한 디스크 확산법에서의 4일째 억제대 크기를 비교하였을 때, 액체배지미량희석법에서 감수성 균주로 판독된 7주 중 1주에서 억제대가 형성되었고, 액체배지미

Table 7. Inhibition zone diameter of disk diffusion method for *T. rubrum*

Strains	Day 4			Day 5			MIC ^a (µg/ml)
	C25	S25	S50	C25	S25	S50	
TR 923	0	0	0	0	0	0	16
TR 899	0	0	0	0	0	0	0.125
TR 633	0	0	0	0	0	0	2
TR 913	16*	16	20	16	16	20	CR
TR 960	0	0	0	0	0	0	1
TR 596	23	23	29	23	23	29	8
TR 932	contamination			contamination			64
TR 971	0	0	0	0	0	0	0.5
TR 3481	0	0	0	0	0	0	CR
TR 921	0	0	0	0	0	0	0.25
TR 735	0	0	0	0	0	0	64

a: MIC of microdilution method, Spec-50, Day 9
* unit: mm

량희석법에서 양성 대조균의 불충분한 성장으로 최소억제농도를 판정하지 못한 1주에서 억제대가 형성되었다. 액체배지미량희석법에서 용량의존성 감수성 균주 및 내성 균주로 판독된 균주들은 디스크 확산법에서 모두 내성 균주로 판독되었다 (Table 6, 7).

고 찰

예비 실험의 성격으로 *Candida* sp.에 대한 액체배지미량희석법과 디스크 확산법을 시행하였으며, 이 두 가지 방법은 NCCLS에서 제시한 표준화된 방법을 사용하였다^{1,2}. 판독에 있어서는 액체배지미량희석법의 경우 NCCLS에서 제시한 육안적 판독을 시행하지 않고, ELISA microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 균 성장 여부를 확인하였다. 분광광도계를 이용하는 방법을 사용한 이유는 *Candida* sp.의 플루코나졸 감수성 검사는 일부 *Candida* sp.가 RPMI 배지에서 잘 자라지 않거나 끌림효과 (trailing effect)를 보이는 등으로 인해 최소억제농도 결과에 있어 재

현성이 문제가 되고 있으며⁶, 또한 최소억제농도를 배양 후 육안관찰에 의해 양성 성장 대조 well에 비해 균 성장이 현저히 감소된 지점으로 판정하도록 하고 있어¹, 주관적 오류의 위험이 있다⁷. 그리고 이 등과 신의 보고에 의하면 분광광도계를 이용한 판독법이 NCCLS의 표준화된 방법과 일치하는 결과를 보였으며, 흡광도가 양성 성장 대조 well에 비해 80% 억제된 Spec-80 지점보다 50% 억제된 Spec-50 지점을 기준으로 최소억제농도를 결정하는 것을 추천하였다^{4,6}. 이 실험에서는 분광광도계를 이용하여 판독을 시행하고 흡광도가 성장 대조 well에 비해 50% 감소된 Spec-50을 기준으로 최소억제농도를 결정하였다.

균주 1주에서만 24시간에는 감수성 균주 (최소억제농도=0.25 µg/ml)로 판독되었으나, 48시간에는 내성 균주 (최소억제농도=64 µg/ml)로 판독되었다 (Table 1). 이러한 결과는 *Candida* sp.에 대한 플루코나졸의 끌림효과 (trailing effect) 때문이다⁶. 끌림효과란 플루코나졸 등의 azole계 약제의 fungistatic effect로 인해 시험관내 약제의 농도가 계속 증가해도 균의 증식이 부분적으로 계속 관찰되는 현상이다. 이 효과를 보이는 균주는 대개 24시간 배양 후 감수성을 보이거나 48시간 후엔 최소억제농도가 64 µg/ml 이상으로 증가되므로, 48시간 후 최소억제농도를 판정하게 되면 azole 내성으로 잘못 판정될 수 있다. 연구 결과 끌림 효과는 균의 내성을 의미하는 것이 아니며, 생체에서도 감수성이 있다⁸.

액체배지미량희석법과 디스크 확산법 사이에 Pearson 상관계수는 -0.575 ($p < 0.05$)로 나타나 두 방법 사이에 상관관계가 있음을 확인하였다 (Fig. 1). 하지만 동일한 결과를 보인 균주는 7개로 50%의 일치율을 보였으며, 이는 기준에 보고된 일치율인 76.9~96.9%⁹에 비교하여 매우 낮게 측정되었다. 일치율이 낮게 측정된 이유는 배지의 습도가 충분하지 않아 디스크에서 약제의 확산이 불충분하였거나, 실험에 사용한 균주의 수가 적었던 것을 원인으로 추정한다.

사상형 진균에 대한 액체배지미량희석법을 시행하는 데 있어 가장 중요한 점은 접종균의 정량화에 있으며, 이 점에 대해서 NCCLS M38-A3에서 분광광도계를 이용한 방법을 제시하였다. 피부사상균을 대상으로 한 이 실험에서도 NCCLS에서 제시한 방법을 기본으로 하고, 일부 방법은 변형하여 실험을 시행하였다.

피부사상균 중에서 *T. mentagrophytes*, *T. raubitschekii*, *T. rubrum*을 대상으로 한 이유는, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*이 피부사상균증의 흔한 원인이며, *T. mentagrophytes*와 *T. raubitschekii*는 소분생자가 많이 나타나는 균종이며, *T. rubrum*은 상대적으로 주로 균사로만 형성되는 균종이기 때문이다.

피부사상균을 대상으로 액체배지미량희석법을 시행하는 경우, 균액을 준비하는데 있어 균사가 다수 포함되면 정확한 OD 값이 산출되지 않는 문제가 있다. 그러므로 소분생자가 많이 나타나는 *T. mentagrophytes*, *T. raubitschekii*의 경우에는 혼합을 충분히 시행하고 상층액만을 실험에 사용하여 균사는 배제하고 소분생자가 주로 포함되도록 균액을 준비하였다. *T. rubrum*은 소분생자 없이 주로 균사로만 이루어진 균종이므로, *T. mentagrophytes*, *T. raubitschekii*보다 정량화가 어려웠다. 이 문제를 해결하기 위해 이전에는 ground-glass tissue glinder를 사용하거나 균사덩어리를 주발에 가는 방법 등을 사용하였다^{10, 11}. 이 실험에서는 동결파쇄과정을 거쳐 짧은 균사로 만들어 정량화하였다. 동결파쇄과정 이후 접종 균수의 약 10%만 생존하였고, 이는 균사 중 대부분은 비어 있거나, 동결파쇄과정에서 손상되었을 것으로 추정하였다.

최소억제농도 판독은 *Candida* sp.와 같이 분광광도계를 이용하여 판독하였다. 판독의 기준이 제시되지 않아 *T. mentagrophytes*를 대상으로 한 실험에서 Spec-50, Spec-80 두 기준으로 판독을 시행하였다. 3~13일간 판독을 시행한 결과 최소억제농도의 변동을 보이는 균주의 수가 Spec-50을 기준으로 하였을 때 적게 나타나서 *Candida*

sp.와 같이 피부사상균의 액체배지미량희석법의 경우 Spec-50을 판독의 기준으로 설정하였다 (Table 2).

판독을 시행하는 시기에 대해 NCCLS에서는 *Rhizopus* sp.는 21~26시간, *P. boydii*는 70~74시간, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Sporothrix schenckii* 등의 다른 사상형 진균은 46~50시간에 판독하는 것을 추천하였다³. 이러한 판정 기준은 균의 성장 속도와 연관된다. 하지만 피부사상균에 대한 언급은 없어서 배양 후 3일부터 13일까지 최소 억제농도 판독을 계속하여, 적정 판독일을 배양 *T. mentagrophytes*의 경우 7일, *T. raubitschekii*의 경우 6일 그리고 *T. rubrum*의 경우 9일로 결정하였다. 이상의 적정 판독일은 피부사상균의 종류에 따라 성장 속도가 빠를수록 빨리 결정되었다. Norris 등과 Jessup 등은 액체배지미량희석법으로 피부사상균의 항진균제 감수성 검사를 시행하면서 균의 성장이 80%억제된 지점을 4일째에 판독하였다^{12,13}. 그러나 이 실험의 결과로 판단할 때 피부사상균을 대상으로 액체배지미량희석법으로 플루코나졸의 항진균제 감수성 검사를 시행하는 경우 균액을 흡광도가 0.09~0.11이 되도록 하여 25°C에서 배양한 후, 6~9일째 Spec-50을 기준으로 최소억제농도를 판정하는 것이 타당할 것으로 판단된다. *T. mentagrophytes*의 1주에서는 시간이 경과하면서 지속적으로 최소억제농도가 증가하는 끌림효과가 관찰되었으나, 다른 2가지 균종에서는 끌림효과가 나타나지 않았다. 이 실험에서는 최소억제농도에 따른 감수성 및 내성 판독 기준으로 *Candida* sp.의 기준을 인용하였으나, 후에 임상 결과와 실험실 결과를 종합하여 새로운 기준을 만들어야 할 것이다. 액체배지미량희석법에서 *T. raubitschekii* 1주와 *T. rubrum* 2주에서 양성 대조 well의 균 성장이 충분하지 않아 최소억제농도를 결정할 수 없었다. 이러한 문제가 발생한 이유로 소분생자가 포함된 균액이 균질하지 않아 양성 성장 대조 well에 소분생자가 충분히 들어가지 않았거나, 활성이 떨어지는 균이 접종되어 발생한 것으로 추정하였다

(Table 4, 6).

피부사상균을 대상으로 디스크 확산법을 시행할 때 가장 문제가 되었던 것이 균의 접종 방법이었다. 처음에 시행한 실험은 NCCLS M44-A을 인용하여 면봉으로 평판배지에 도말하는 방법으로 대부분의 균이 면봉에 묻어 배지에는 적은 수의 균만 접종되었다. 이 문제를 해결하지 위해서 hemocytometer를 이용하여 소분생자의 수를 직접 센 후에 평판배지에 접종하고, 소독된 유리막대로 배지 위에 고르게 퍼 바르는 방법을 사용하였다. 피부사상균을 대상으로 시행한 디스크 확산법에서 일부 균주에서만 억제대가 형성됨을 확인할 수 있었다. 억제대의 크기는 배양일, 접종 균의 농도와 디스크의 항진균제 농도에 따른 차이가 거의 없었다. 액체배지미량희석법과 디스크 확산법을 비교 분석한 *Aspergillus* sp.를 대상으로 한 Serrano의 실험과 *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Scedosporium* sp., *Fusarium* sp.를 대상으로 한 Lopez-Oviedo의 실험에서 두 방법 사이에 상관관계가 있다고 기술하였다^{5,14}. 하지만 피부사상균을 대상으로 한 이 실험에서는 액체배지미량희석법과 디스크 확산법 사이에 상관관계가 없음을 확인할 수 있었다 (Table 3-2, 5, 7). 디스크 확산법의 결과가 액체배지미량희석법의 결과와 일치하지 않은 것은 디스크에서 약제의 확산이 제대로 이루어지지 않았거나, 디스크의 약제 농도가 낮은 것과 피부사상균이 배지 위에서 3차원적 구조로 성장하는 것 등을 원인으로 추정하였다. 그러므로 디스크 확산법을 피부사상균의 항진균제 감수성 검사로 활용하기에는 문제가 있는 것으로 보인다.

이 실험은 3가지 균종을 이용하였으나, 각 균종당 균수가 많지 않았고, 플루코나졸만을 대상으로 시행한 실험이라는 제한점이 있었다. 하지만 피부사상균의 항진균제 감수성 검사에 대한 몇 가지 기준을 제시할 수 있었다. 향후 보다 많은 균주와 항진균제를 대상으로 한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다.

요 약

피부사상균에 대한 항진균제 감수성 검사법은 아직 명확하게 정립되지 않았다. 저자는 *Trichophyton(T.) mentagrophytes*, *T. raubitschekii*와 *T. rubrum*을 대상으로 항진균제 감수성 검사로 액체배지미량회석법과 디스크 확산법을 시행하여 유용성을 검토하였다. 액체배지미량회석법은 NCCLS M38-A에서 제시한 방법을 활용하여 항진균제 감수성 검사를 시행하였다. 그동안 피부사상균의 항진균제 감수성 검사에서 가장 큰 문제였던 균의 정량화에서 이 실험은 소분생자만을 분리하거나, 균사를 냉동파쇄하는 간편한 방법을 제시하였다. 판독 방법은 분광광도계를 이용한 판독에서 균의 성장이 50% 억제된 지점을 기준으로 배양 6~9일째에 판독하는 것을 기준으로 제시하였다. 일부 균주에서 끌림효과를 확인할 수 있었으며, 감수성 판단기준은 새로운 기준의 마련이 필요하다. 디스크 확산법은 NCCLS M44-A법을 변형하여 적용하였으나, 본 실험 결과에서는 액체배지미량회석법과 상관관계가 부족한 것으로 나타나 피부사상균에 대한 항진균제 검사법으로 활용하기에는 문제가 있는 것으로 판단된다. 디스크 확산법의 유용성을 평가하기 위해서는 추가적으로 보다 많은 균주의 다른 피부사상균과 다른 항진균제를 활용한 실험이 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. National committee for clinical laboratory standard: Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-second edition M27-A2. Wayne, Pa., National committee for clinical laboratory standards, 2002
2. National committee for clinical laboratory standards. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing; approved guideline M44-A. Wayne, Pa., National committee for clinical laboratory standards, 2004
3. National committee for clinical laboratory standards: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved standards M38-A. Wayne, Pa., National committee for clinical laboratory standards, 2002
4. 신종희. 항진균제 감수성 검사의 현재 - 검사법의 진전과 임상적 적용. 대한임상미생물학회지 2002; 5: 69-76
5. Serrano MC, Ramirez M, Morilla D, et al. A comparative study of the disc diffusion method with the broth microdilution and Etest method for voriconazole susceptibility testing of *Aspergillus* spp. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 739-742
6. 이지연, 신종희, 이경원 등. *Candida* 균종의 Fluconazole 감수성 검사를 위한 Spectrophotometric broth microdilution법의 평가. 대한진단검사의학회지 2002; 22: 253-259
7. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Martinez-Suarez JV, Sanchez R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1998-2003
8. 신종희. 항진균제 감수성. Hanyang medical reviews 2006; 26: 79-85
9. 이미경, 김혜련. *Candida* 균종의 fluconazole 감수성 검사 시 glucose와 methylene blue를 첨가한 Mueller-Hinton 배지에서의 디스크 확산법 평가. 대한진단검사의학회지 2005; 25: 247-251
10. 박태훈, 최종수, 김기홍. 배양온도가 피부사상균의 경구용 항진균제 감수성 검사에 미치는 영향. 대한피부과학회지 1995; 33: 240-247
11. Granade TC, Artis WM. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes in microculture with a standardized fragment mycelial inoculum. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17: 725-729
12. 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
13. 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
14. Lopez-Oviedo E, Aller AI, Marin C, et al. Evaluation of disk diffusion method for determining posaconazole susceptibility of filamentous fungi: comparison with CLSI broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1108-1111
-