

대한의진균학회

제9차 심포지움 초록

● 일 시 : 2009년 11월 21일 (토) 오후 2시~6시

● 장 소 : 서울 건국대병원 대강당

❖ 주 제 : 표재성 진균증의 동정 ❖

❖ 성 격 : 교육강연 ❖



주최 : 대한의진균학회
대한피부과학회 피부진균연구회

◆ 대한의진균학회 제9차 심포지움 진행계획표 ◆

시 간	내 용	
02 : 00 – 02 : 10	개회식	
02 : 10 – 03 : 00	Dermatophytes 동정	최종수(영남의대)
03 : 00 – 03 : 30	<i>Malassezia</i> 효모균 동정	이양원(건국의대)
03 : 30 – 04 : 00	흑색진균 동정	서무규(동국의대)
04 : 00 – 04 : 20	Coffee Break	
04 : 20 – 05 : 20	Identification of Medically Important Molds, Dermatophytes, and Yeasts by Oligonucleotide Arrays Tsung Chain Chang, PhD (National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan)	
05 : 20 – 05 : 30	폐회식	

● 대한의진균학회 제9차 심포지움 연제 순서 ●

◆ 교육 강연(1) 02:10-03:00

좌 장 : 김기홍 (영남의대 피부과)
제 목 : Dermatophytes 동정
연 자 : 최종수 (영남의대 피부과)

◆ 교육 강연(2) 03:00-03:30

좌 장 : 안규중 (건국의대 피부과)
제 목 : *Malassezia* 효모균 동정
연 자 : 이양원 (건국의대 피부과)

◆ 교육 강연(3) 03:30-04:00

좌 장 : 유희준 (한양의대 피부과)
제 목 : 흑색진균 동정
연 자 : 서무규 (동국의대 피부과)

◆ 초청 강연 04:20-05:20

좌 장 : 문기찬 (울산의대 피부과)
제 목 : Identification of Medically Important Molds, Dermatophytes, and Yeasts by Oligonucleotide Arrays
연 자 : Tsung Chain Chang (National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan)

Identification of Medically Important Molds, Dermatophytes, and Yeasts by Oligonucleotide Arrays

Tsung Chain Chang (張長泉)

*Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, College of Medicine,
National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan, Republic of China*

Infections caused by fungi have increased in recent years. Accurate and rapid identification of fungal pathogens is important for appropriate treatment with antifungal agents. On the basis of the internal transcribed spacer 1 (ITS 1) and ITS 2 sequences of the rRNA genes, three oligonucleotide arrays were developed to identify 64 species (32 genera) of molds, 17 species of dermatophytes, and 77 species (32 genera) of yeasts of clinical importance. The method consisted of PCR amplification of the ITS regions using a pair of universal primers, followed by hybridization of the digoxigenin-labeled PCR products to panels of species- or group-specific oligonucleotides immobilized on nylon membrane. The sensitivity and specificity of the arrays were higher than 98 and 97%, respectively. The whole procedure can be finished within 24 h starting from isolated colonies; reproductive structures, which are essential for the conventional identification of filamentous fungi are not needed. The arrays also have great potential for direct detection of pathogenic fungi in clinical specimens. In conclusion, the present arrays are powerful tools for identification of fungi and may have the potential to be continually extended by adding further oligonucleotides to the arrays without significantly increasing the cost or complexity.

♦ Publication list of Tsung C. Chang ♦

• Reviewed articles (* corresponding author)

1. Chang HC, Leaw SN, Huang AH, Wu TL, Chang TC.* Rapid identification of yeasts in positive blood cultures by a multiplex PCR method. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 3466-3471
2. Chen CC, Teng LJ, Tsao SK, Chang TC.* Identification of clinically relevant viridans streptococci by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 1515-1521
3. Hsiao CR, Huang L, Bouchara J-P, Barton RH, Li C, Chang TC.* Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43: 3760-3768
4. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC.* Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology* 2006; 44: 693-699
5. Leaw SN, Chang HC, Barton R, Bouchara JP, Chang TC.* Identification of medically important *Candida* and Non-*Candida* yeast species by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 2220-2229
6. Li HC, Bouchara JP, Hsu M. M-L, Barton R, Chang TC.* Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 3160-3166
7. Li HC, Bouchara JP, Hsu M. M-L, Barton R, Su S, Chang TC.* Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *Journal of Medical Microbiology* 2008; 57: 592-620
8. Ko W-C, Lee N-Y, Su SC, Dijkshoorn L, Vaneechoutte M, Wang L-R, Yan J-J, Chang TC.* Oligonucleotide-array based identification of species in the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex isolated from blood cultures and antimicrobial susceptibility testing of the isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 2052-2059
9. Su H-P, Tung S-K, Tseng L-R, Tsai W-C, Chung T-C, Chang TC.* Identification of *Legionella* species by an oligonucleotide array. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 1386-1392
10. Bouchara J-P, Shieh HY, Croquefer S, Barton R, Marchais V, Pihet M, Chang TC.* Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47: 142-152

And 59 other peer-reviewed publications.

• Patents

1. Huang SW, Wu JJ, Chang TC. 1997. An enzyme-capture assay (ECA) for the identification of *Escherichia coli* in clinical samples. US patent 5,612,186.
2. Chang TC, Chen HC. 1997. Method for detecting antimicrobial compounds. US patent 5,591,599; Australia patent 686,139; United Kingdom patent 2,289,946; France patent FR94 06,542.
3. Chang TC, Chen S, Ding HC. 2001. Rapid identification of *Escherichia coli* O157:H7. US patent 6,210,911.
4. Chang TC, Chen S, Ding HC. 2002. Rapid identification of microorganisms. US patent 6,428,976.

5. Chang TC, Huang YH, Chang HC. 2004. *E. coli* agglutination assay. US patent 6,689,572; European patent 1199567 (United Kingdom, France, Germany, and Italy).
6. Chen CH, Chang TC, Ding HC. 2004. Methods for rapid identification of *Bacillus cereus*. US patent 6,699,679; UK patent 2,374,664; France patent 2,820,147.

92M890, 93M917; 中華民國專利第076758號, US patent 5,418,140.

1. 金黃色葡萄球菌快速檢測法: 南興化工製藥股份有限公司(1991-至今) (農委會計畫編號89M783, 中華民國專利第50359號)
2. 用於檢測綠膿桿菌之寡核甘酸探針, 生物晶片擊劍測方法: 三越公司(2007-) (經濟部科專計畫編號G97-B210, 中華民國專利第I 282369號)
3. 系統化環境分子生物技術(microarray biochip): 台灣中油股份有限公司事業煉製部高雄煉油廠(2008-), (經濟部科專計畫編號G97-B210, 中華民國專利第I 252257號)

And 33 other patents.

● CURRICULUM VITAE ●

♦ PERSONAL INFORMATION ♦

Name: Tsung C. Chang (張長泉)
Address: Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology
College of Medicine, National Cheng Kung University
1 University Rd., Tainan 701, Taiwan

Place of Birth: Chiayi, Taiwan
Citizenship: Taiwan, Republic of China

♦ EDUCATION ♦

6/1973 B.S., Department of Plant Pathology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan
6/1977 M.S., Department of Biochemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan
12/1985 Ph.D. Department of Agriculture Chemistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan

♦ PROFESSIONAL EXPERIENCE ♦

8/77 ~ 7/78 Instructor, Department of Medical Technology, Yuanpei University, Hsinchu, Taiwan
9/78 ~ 1/85 Associate Researcher, Department of Food Science, Food Industry Research & Development Institute, Hsinchu, Taiwan
1/85 ~ 1/92 Researcher, Department of Food Science, Food Industry Research & Development Institute, Hsinchu, Taiwan
1/92 ~ 1/96 Senior Researcher, Department of Food Science, Food Industry Research & Development Institute, Hsinchu, Taiwan
8/96 ~ 7/2000 Associate Professor, Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan
8/2000 ~ Professor, Department of Medical Science and Biotechnology
College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan
8/2007 ~ Chairperson, Department of Medical Science and Biotechnology
College of Medicine, National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan
8/2007 ~ Director, Research Center for Medical Technology,
National Cheng Kung University, Tainan, Taiwan

Dermatophytes 동정

영남대학교 의과대학 피부과학교실

최종수

목적

정확한 진단과 치료:

균종에 따라 임상양상이 다르다.

올바른 치료제 선택

감염원, 감염경로, 예방

학문적:

지역 분포

분류학

균종의 변화: 증감, 소멸, 이동

방법

진균 배양

형태관찰 (colony 육안관찰, 현미경 관찰)

생리학적 검사

교배실험 Mating test

분자생물학적인 방법

Taxonomy of fungus

Class	Hyphae	Sexual spore	Asexual spore
<i>Zygomycetes</i>	aseptated	zygospore	sporangium
<i>Ascomycetes</i>	septated	ascospore	conidium
<i>Basidiomycetes</i>	septated	basidiospore	conidium
<i>Deuteromycetes</i>	septated	not found	conidium

Dermatophytes의 분류

Ascomycota - Pezizomycotina - Eurotiomycetes - Eurotiomycetidae - Onygenales - Arthrodermataceae

Anamorph (무성세대)	Teleomorph (유성세대)
Trichophyton	Arthroderma
Microsporum	Arthroderma
Epidermophyton	-

숙주에 따른 분류

Anthropophilic

Zoophilic

Geophilic

형태적 분류 → 분자생물학적 분류 → multifactorial

T. rubrum complex

T. mentagrophytes complex

우리나라에서 확인된 백선균

서순봉 (1976~1995)

<i>T. rubrum</i>	81.7%,	<i>T. mentagrophytes</i>	5.8%,	<i>M. canis</i>	5.7%
<i>E. floccosum</i>	1.0%,	<i>T. verrucosum</i>	0.6%,	<i>M. gypseum</i>	0.2%
<i>M. ferrugineum</i>	0.04%,	<i>T. tonsurans</i>	0.03%,	<i>T. violaceum</i>	

T. tonsurans (1995), *A. benhamiae* (2004), *T. erinacei* (2008)

최근

Very common : *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* (*T. interdigitale*)

Common : *M. canis*, *M. gypseum*

Rare : *T. tonsurans*, *E. floccosum*, *T. verrucosum*

Very rare : *T. violaceum*, *M. ferrugineum*, *T. schoenleinii*

Dermatophytes 배양

1. 배지

일반용도

Sabouraud dextrose agar (SDA), Mycosel agar

Potato dextrose agar (PDA): conidiation 촉진

Cornmeal with Tween 80: conidiation 촉진, *T. rubrum*의 붉은 색

Dermatophyte test medium (DTM): phenol red

특수 용도

Christensen urea agar

Trichophyton agar #1 - #7 (Difco)

Takashio medium (Diluted Sabouraud medium): 교배용

PDACT (Potato Dextrose Agar-Corn meal-Tween 80)

1986년 경북의대 서순봉 교수님이 개발

SDA - 균은 잘 자라나 동정에 필요한 착색이 나타나지 않음

백선균 동정에 적합하다.

T. rubrum -특유의 붉은 색, KOH/증류수 흡수

분색자를 잘 형성

*T. mentagrophytes*의 아형 구분

용모변성 억제

C. albicans 후막포자 촉진

조성

Potato dextrose agar (Oxoid)	20 g
Corn mel agar (Difco)	20 g
Peptone	4 g
Tween 80	6 ml
<u>증류수</u>	1 L

2. 배지 만들 때의 주의 사항

신선한 재료를 사용한다.

너무 오래 끓이지 않는다.

사면 배지 -충분한 양을 넣고, 사면을 넓게 확보 (1:2)

김을 충분히 뺀다: 지나친 물기는 contamination의 원인이 된다.

항생제와 cycloheximide: 배지가 충분히 식은 후 (60°C) 첨가한다.

3. 배지 보관 방법

1주 이내에 사용한다. 3주가 지나면 폐기한다.

마르지 않도록 밀봉하여 4°C에서 보관.

4. 진균배양을 위한 진균검사물 채취 방법

Aseptic technique을 사용한다.

살아 있는 균이 있는 곳을 선택한다: 환상병소의 가장자리, 조갑 및 모발의 근위부

많은 양을 채취

5. 접종 및 배양

Tube를 2개 이상 사용한다. 또는 접종 면을 3등분하여 사용할 수도 있다.

배지 표면에 넓게 펴 바른다.: 배지 속으로 깊게 묻히거나 접촉이 안된 상태를 피한다.

Aseptic - Alcohol lamp 위에서 모든 과정을 시행한다.

Cycloheximide 넣은 것과 없는 2가지 배지를 사용한다.

25°C와 37°C에서 배양한다.

6. False negative (배양이 안되는 경우)

접종한 균이 적을 때

죽은 균, 항진균제 치료 중

접종을 잘못한 경우 배지 접촉 안됨, 뜨거운 칼

나쁜 배지: 오래된 배지, 조성이 잘못, 배지선택 잘못

마개를 꽉 막아 질식

온도가 맞지 않을 때: 고온, 저온

Contamination: 백선균이 자라기 전에 배지 전체를 덮는다.

세균에 오염

7. Contamination을 줄이는 방법

여러 병소에서 동시에 채취하여 배양, 여러 개의 tube에 배양

검사실 환경을 깨끗하게, mite 제거- 나프탈렌

오염된 배지를 사용하지 않는다.

배지를 만들 때 물기를 충분히 말려서 보관

평판배지 보다는 tube를 사용한다.

Cycloheximide, 항생제 등을 첨가한 배지 사용

칼 소독, 병변을 알코올로 소독한 후 가검물을 채취

8. Pathogen과 contaminant의 구분

여러 병소에서 동시에 채취하여 배양

여러 개의 tube에 동시에 배양

시간 간격을 두고 여러 번 배양

반복하여 검출이 되면 pathogen으로 판단한다.

검체를 채취한 부위를 고려한다.

Dermatophyte 동정

1. Colony의 육안적 관찰

성장속도

표면과 배면의 성상

색깔: 표면, 배면

Topography: flat, raised, heaped

Texture: smooth, fluffy, granular, suede, velvety

Pattern of folding: cerebriform, craterform

2. 현미경적 관찰

균집락의 채취: 분생자가 충분히 형성된 곳 (중앙부와 가장자리의 중간),

Slide culture

투명테이프 (cellophane tape), hook

Hyphae

Septation

Pattern: spiral, raquet, chandelier, nodular body

Pigmentation

Vesicles or swollen cells

Conidium (conidia): asexual reproduction (\leftrightarrow spore)

Macroconidia: size, number of septum, shape, wall thickness, surface

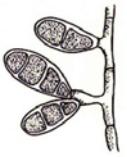
Microconidia: shape, group, 균사에의 부착 양상

3. 생리적 검사

모발천공 검사, Urease test, Growth factor requirement

4. 교배시험 Mating test

Dermatophytes: 3 genus

	Macroconidia	Microconidia	Involved	
<i>Microsporum</i> spp.	numerous spindle-shaped thick walled spiny surface	numerous	skin, hair	
<i>Trichophyton</i> spp.	rare pencil or fusiform thin walled smooth surface	Numerous 균에 따라 특징적	skin, hair nail	
<i>Epidermophyton</i> spp.	numerous boat-shaped thick or thin walled smooth surface	not produced	skin, nail	

T. rubrum

성장속도: slow 14일

Colony 형태

표면: 솜털모양 (fluffy), white to buff

배면: 포도주색 >brown, yellow, no-color

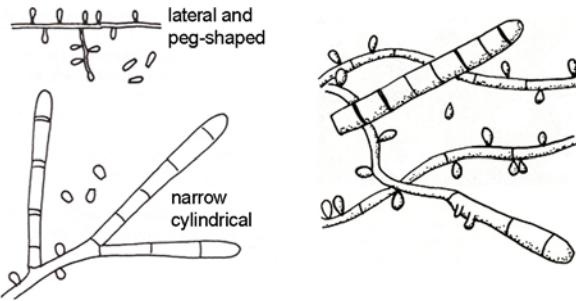
현미경 소견

Microconidia: numerous to rare

tear-shaped, solitary along hyphae

"전기줄에 참새가 앉은 모양"

Macroconidia: rare, pencil-shaped



T. mentagrophytes

성장속도: moderate, 7~10일

종류

var mentagrophytes: zoophilic

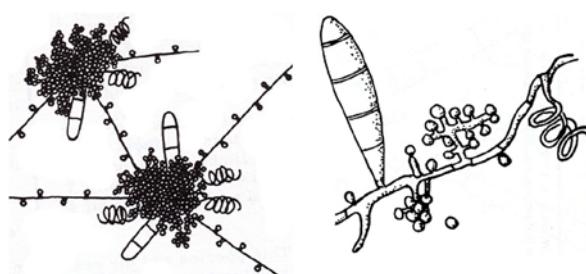
var interdigitale : anthropophilic

Colony 형태: 매우 다양

zoophilic - 과립형 (granular)

anthropophilic - 융모형 (downy),

분말형 (powdery), 복숭아색형 (persicolor)



Powdery form: Radial or concentric fold

배면: brown > colorless, yellow, red

현미경 소견

Microconidia: very round, clustered

Coiled spiral hyphae

"포도송이와 둥굴"

Macroconidia: 가늘고, thin walled

T. rubrum vs *T. mentagrophytes*

PDACT

붉은 포도주색

KOH 또는 중류수를 흡수: *T. rubrum*

현미경 소견

T. mentagrophytes: coiled hyphae, clusted microconidia

Hair perforation test: *T. mentagrophytes*: 양성

Urease test: *T. mentagrophytes*: 양성

Bacterially contaminated *T. rubrum*

T. raubischekii

T. tonsurans

성장속도: moderately slow, 12일

Colony 형태

Sulfureum 형: 황색조

Mahogany-red 형: 처음에는 선홍색 반점

이후 회색 분말, 탁한 붉은 색으로 변한다.

배면: Mahogany-red

현미경 소견

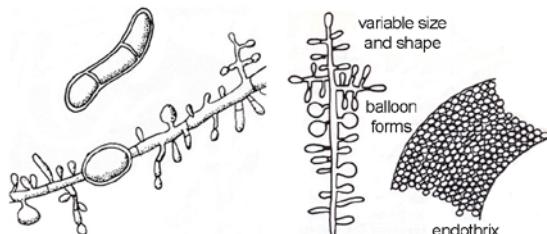
Micordonidia: diagnostic

Variable: tear drop, 곤봉, 성냥알, balloon forms

Conidiophore: perpendicular to hyphae

May spiral coils

Physiologic test: thiamine dependent



T. verrucosum

성장속도: very slow 21~30일, 37도에서 더 잘 자란다

Colony 형태

Small, heaped, button-like > flat

Texture: glabrous > downy

White -> gray or yellow

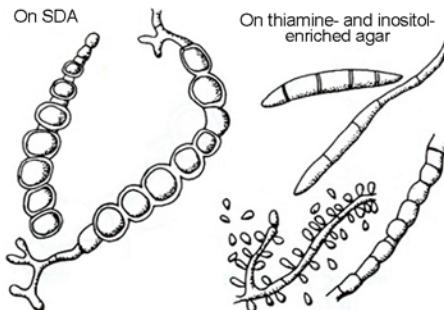
배면: various, 특징없다.

현미경 소견

염주양의 후막포자 (chlamidoconidia in chain)

Macroconidia: 쥐꼬리 모양

Physiologic test: Thiamin, inositol 필요



M. canis

성장속도: moderate, 6~10일 이내

Colony 형태

표면: whitish, fluffy, 방사상 주름

가장자리: 균사가 방사선상으로 퍼져나간다.

배면: deep yellow -> yellow brown

현미경 소견

Macroconidia: 풍부하다. 특징적

Long, spindle shaped, rough, thick walled

손잡이 (knob) 같은 끝, 6개 이상의 세포

Microconidia: a few



M. gypseum

성장속도: moderately rapid, 6일 이내

Colony 형태

표면: flat, spreading, powdery to granular

Buff -> tan to cinnamon brown (등황색)

배면: variable

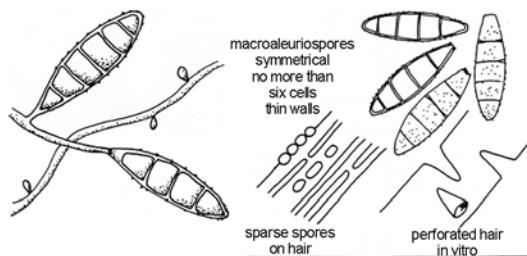
현미경 소견

Macroconidia: 매우 풍부, 특징적

Symmetric, rough, thin walled, 6개 이내의 세포

끝부분: rounded <-> pointed *M. canis*

Microconidia: usually



E. floccosum

성장속도: moderately slow, 15일 이내

Colony 형태

표면: brownish yellow to olive gray or khaki

Lumpy and sparse -> folded, radial groove. velvety

수주 후 fluffy

배면: orange to brownish, 가끔 yellow border

Pleomorphism이 잘 생긴다.

현미경 소견

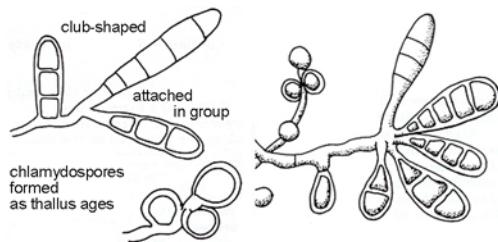
Macroconidia:

배양 초기에 발견된다.

Smooth, thin walled, club shaped, round ends

2-6 세포, single or clusters

Microconidia: no



요 약

1. Colony 색깔

포도주색: *T. rubrum*

황금색: *M. canis*

카키색: *E. floccosum*

신나몬: *M. gypseum*

2. 성장 속도

빠르다

M. gypseum, M. canis

T. mentagrophytes

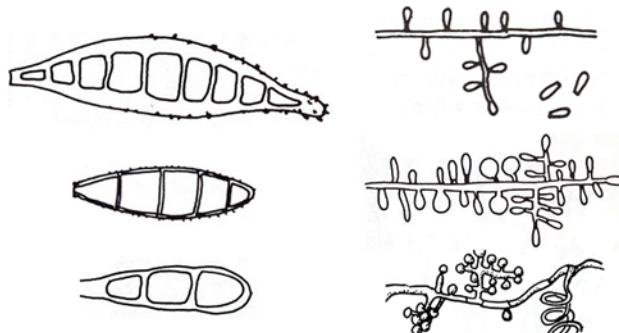
늦다

E. floccosum, T. tonsurans

매우 늦다

T. verrucosum, T. violaceum, M. ferrugineum, T. schoenleinii

T. concentricum, T. yaundei, T. Soudanense



주의사항

극단적인 단순화 ≠ 실제 상황

이상한 균주; 중요한 균주, 전문가에 문의

중요한 균주는 보관

참 고 문 헌

1. 서순봉, 김기홍, 방용준. 의진균학. 대학서림, 서울, 1994

2. 김정애. 피부사상균의 배양, 동정 및 특수 검사. 대한의진균학회 제 1차 workshop 초록집, 1998:

3. 김기홍. 피부사상균의 육안적 소견 및 현미경 소견, 대한의진균학회 제 3차 workshop. 의진균지 2001; 6: 179-185
4. 전재복. 백선균의 동정. 대한의진균학회 제 6차 workshop. 의진균지 2005; 10: 178-185
5. Rebell G, Taplin D. *Dermatophytes. Their recognition and identification.* University of Miami Press, Coral Gables, Florida, 1970
6. Larone DH. *Medically important fungi. A guide to identification.* 3rd ed. Washington: ASM, 1995: 161-181

● 연자 소개 ●

성명: 최종수 (崔宗壽)

생년월일: 1954년 1월 4일

1979년 2월	연세대학교 의과대학 의학과 졸업
1988년 2월	연세대학교 대학원 박사
1979년 2월	의사면허증 취득
1983년 2월	진단검사의학과 전문의 취득
1990년 9월 ~ 1991년 3월	미국 캘리포니아대학 샌프란시스코분교 피부과 연구원
1997년 8월 ~ 1998년 7월	미국 질병관리예방센터 (CDC) 연구원
2008년 9월 ~ 2009년 7월	네덜란드 CBS 연구원
1983년 4월 ~ 현 재	영남대학교 의과대학 피부과학교실 교수

♦ 관심분야 ♦

의진균학

분자생물학

MEMO

Malassezia 효모균의 동정

건국대학교 의학전문대학원 피부과학교실

이 양 원

Malassezia 효모균은 피부의 정상 균총으로 존재하며, 건강한 성인의 75~98%에서 발견된다. 본 효모균은 1889년 소개된 이후 현재까지 전풍 (pityriasis versicolor), 지루피부염 (seborrheic dermatitis), *Malassezia* 모낭염 (*Malassezia folliculitis*) 등의 원인으로서 그 중요성이 알려져 왔으며, 수년전부터 아토피 피부염 (atopic dermatitis)의 악화인자로서의 중요성이 부각되고 있다. 이 외에도 최근에는 융합성 망상 유두종증 (confluent and reticular papillomatosis)과 조갑진균증 (onychomycosis)과의 관련성을 제시하는 보고가 있었으며, 지방산이 함유된 수액제제를 정맥내 카테터로 투여받는 미숙아나 면역능력이 저하된 성인에서 *Malassezia* 효모균에 의한 전신감염증이 보고됨으로써 그 병원성이 점차 대두되고 있다.

Malassezia 효모균이 병원성을 띠게 되는 대표적인 소인으로는 기후적 요인 (고온, 높은 습도)과 생활 습관 (목욕 등)에 따른 외적 인자와 만성 기저질환의 유무, 면역력, 항생제나 부신피질 호르몬제의 오남용 등과 같은 내적 인자가 있다. 이러한 소인들에 의해 *Malassezia* 효모균이 과증식하게 되고, 기회감염으로 피부질환이 발생하는 것으로 보고되고 있으나 아직 그 기전은 명확하게 밝혀지지 않았다. *Malassezia* 효모균이 병원성을 띠게 되면 주로 가슴, 등, 액와, 목 같이 피지선이 많이 분포된 체간 상부나 두피에 다양한 크기의 연한 황토색, 황갈색, 적갈색 인설반이 생기며, 때로는 융합하여 거대반을 만들기도 한다. 일광 노출부위, 특히 안면에서는 저색소침착반으로 나타나는 경우가 흔하여 백반증과 감별이 어려울 때가 많으며 드물게 소양감을 동반한 작은 모낭성 구진, 농포의 형태로 나타나기도 한다. 특히 다른 피부질환과 동반되었을 경우 *Malassezia* 효모균에 의한 피부질환임을 진단하고 감별해내기 어렵다.

일반적인 *Malassezia* 감염증은, 전형적인 임상 증상, 10% KOH/Parker ink 도말검사상 짧은 균사와 등근 아포가 혼재되어 나타나고, Wood등 검사상 황갈색 내지 황금색 형광을 발하거나, 생검 조직의 연속절편에서 확대된 모낭 속에 등근 분아성 효모균과 균사를 관찰함으로써 진단할 수 있다. *Malassezia* 효모균의 경우 피부에 상재하는 균이므로 *Malassezia*에 의한 감염이 의심될 때에는 다른 진단법 보다 직접도말검사 및 배양이 정확하고 유용한 동정방법이 된다. 최근에는 *Malassezia* 효모균에 의한 질병의 진단 검사방법으로 다양한 분자생물학적 기법이 도입됨으로써 기존의 검사방법보다 신속하고 정확하게 동정하고 있으며, 새로운 분석 장비와 소프트웨어가 개발되고 임상적으로 적용하고 있다.

Malassezia 감염증은 병원성 진균으로서 그 중요성이 점차 커지고 있으며, 최근 다른 피부질환과 연관되어 많은 연구가 진행되고 있다. 이에 저자는 *Malassezia* 감염증의 다양한 임상양상을 이해하고 *Malassezia* 효모균을 신속하고 정확하게 동정하는 방법에 대해 이야기하고자 한다.

● 연자 소개 ●

성명: 이양원 (李 陽 遠)

생년월일: 1971년 1월 26일

♦ 학력 ♦

1996년 2월	경희대학교 생명과학부 유전공학과 졸업 (이학사)
2000년 2월	건국대학교 의과대학 의학과 졸업 (의학사)
2003년 2월	건국대학교 대학원 의학석사 학위취득 (피부과학 전공)
2006년 8월	건국대학교 대학원 의학박사 학위취득 (피부과학 전공)

♦ 경력 ♦

2000년 3월 ~ 2001년 2월	건국대학교 병원 수련의
2001년 3월 ~ 2005년 2월	건국대학교 병원 피부과 전공의
2005년 3월 ~ 2006년 2월	건국대학교 병원 피부과 전임의
2006년 3월 ~ 2007년 2월	건국대학교 병원 피부과 임상조교수
2007년 3월 ~ 현재	건국대학교 병원 피부과 조교수

♦ 학회활동 ♦

대한모발학회 정회원
대한아토피피부염학회 평의원
대한의진균학회 간행이사
피부진균학회 재무이사
피부미용-외과학회 재무간사

흑색진균 동정

동국대학교 의과대학 피부과학교실

서 무 규

서 론

흑색진균은 dematiaceous fungi, black fungi 또는 pigmented fungi라고 하며 세포막에 멜라닌 색소를 가지고 있는 것이 특징이다. 그리고 한 가지 흑색진균이 1개 이상의 다른 흑색진균에 의한 감염증을 일으킬 수 있다. 최근 국내에서도 흑색진균에 의한 피부감염증의 보고가 증가되고 있으므로 흑색진균의 동정에도 많은 관심을 기울여야 할 것으로 생각된다.

본 론

1. 흑색진균의 분류학적 위치

* Pathogenic fungi

A) 효모균 (Yeast, yeast-like fungi)

점성 (moist) 균집락을 형성하며 포자는 빌아하여 출아세포 (budding cells)를 가짐
Candida, Cryptococcus, Trichosporon, Rhodotorula,..

B) 사상균 (Molds, moulds, filamentous fungi)

균사 (hyphae)라고 불리우는 분지하는 filaments 가짐

- Aseptate hyphae: Zygomycetes (Mucorales)
넓은 리본모양의 균사를 보이며 격벽 (septum)이 없음
Rhizopus, Mucor, Absidia (mucormycosis)

- Septate hyphae

• Moniliaceous fungi (hyaline molds):

균사에 격벽이 있고 색소가 없어 초자양으로 염색

Aspergillus, Fusarium, Acremonium, Penicillium,..

• Dematiaceous fungi (dark molds):

균사에 격벽이 있고 멜라닌 색소에 의해 진한 갈색으로 염색

Cladosporium, Fonsecaea, Exophiala, Phialophora, Curvularia,..

2. 흑색진균에 의한 감염증

• 흑색 백선 (Tinea nigra)

피부 각질층의 표재성 진균감염으로 주로 손바닥에 흑갈색 반으로 나타나며, 원인균은 *Exophiala(Phaeoannellomyces) werneckii, Stenella araguatiae*이다.

• 손발톱진균증 (조갑진균증, Onychomycosis) - 일부분

흑색진균에 의해 손발톱이 검어지는 것을 진균 흑색조 (fungal melanonychia)라고 하며 원인균으로 *Alternaria(A.) alternata, Curvularia lunata, Exophiala(E.) dermatitidis, Cladosporium(C.) carrionii, Chaetomium perpulchrum, Lasiodiplodia theobromae, Hendersonula toruloidea, T. rubrum* with a diffuse black pigment가 있다.

• 흑색 털결질진균증 (사모증, Black piedra)

털줄기 (hair shaft)을 따라 검고 단단한 결절이 생기며 주로 열대지방에서 두피모발에 생긴다. 원인균은 *Piedraia hortae*이다.

• 각막 사상균증 (Keratomycosis) - 일부분

각막의 진균성 감염증으로 외상에 의해 각막실질내 침투되어 발생하며, 원인균은 *A. alternata, Curvularia lunata, Phialophora(P.) verrucosa, C. oxysporum, Aueobasidium pullulans, Phoma oculo-hominis* 등이 있다.

• 색소분아곰팡이증 (색소분아진균증, Chromoblastomycosis)

흑색진균에 의한 피부 및 피하조직의 만성 육아종성 진균 감염으로 조직에 큰 구형의 두터운 벽을 가지고 분할을 보이는 경화세포 (sclerotic cells)가 특징적이다. 원인균으로 *Fonsecaea(F.) pedrosoi, Cladosporium(Cladophialophora) carrionii*가 가장 흔하고 그 외에 *P. verrucosa, F. compacta, Rhinocladiella(R.) aquaspersa* 등이 있다.

• 흑색곰팡이증 (흑색진균증, Phaeohyphomycosis)

흑색진균에 의한 심재성 진균증으로 피하 및 전신감염을 일으키며 조직내에 갈색균사, 연쇄상의 포자를 보이나 색소분아진균증에서와 같은 경화 세포는 나타나지 않는다. 흑색진균증의 원인균으로는 *E. jeanselmei*가 가장 흔하고 *E. dermatitidis, P. verrucosa, Drechslera sp., Phoma sp., Curvularia lunata, A. alternata, Exserhium rostratum, E. moniliae* 등이 있다.

• 진균종(Eumycotic mycetoma) - 일부분

피부와 피하조직의 만성 육아종성 감염으로 종괴 (tumefaction), 농루 (draining sinus tracts), 과립 (granules) 또는 세립체 (grains)의 3가지 임상적 특징을 나타낸다. 원인균으로 *Madurella(M.) mycetomatis, M. grisea, E. jeanselmei, Leptosphaeria senegalensis, Curvularia lunata* 등이 있다.

3. 흑색진균의 동정

흑색진균을 동정하기 위해서는 다른 진균과 마찬가지로 검체로부터 분리 배양된 균집락이 있어야 하며 1단계는 육안적 관찰로 균집락의 색깔, 형태, 성장 발육속도, texture, 배지의 뒷면 등의 육안적 형태를 기초로 하여 어떤 균일 가능성은 추정한 후에 2단계로 현미경 관찰로 균집락을 슬라이드 배양 (slide culture) 표본을 만들어 Lactophenol-cotton blue로 염색하여 현미경하에서 포자의 종류, 포자의 색깔, 포자형성 방식, 분생자병 (conidiophore) 및 균사의 형태 등의 특징적 현미경 소견을 참고

로 하여 동정을 한다. 때로는 포자의 광학 현미경 관찰에 전자현미경 관찰이 추가되기도 한다. 육안적 및 현미경 관찰로 균종 간별이 힘들 때는 당대사 실험 (sugar assimilation test), 온도 내성검사 (heat tolerance test) 등의 생화학 및 생리학적 검사 (biochemical & physiological test)가 사용되어 왔는데 최근에는 rDNA ITS (internal transcribed spacer) region sequence법 등의 분자생물학적 접근이 보완적으로 시도되고 있다.

또한 흑색진균의 동정에서는 분리 배양된 균집락 뿐만 아니라 병리조직학적 소견이 많은 도움을 줄 수 있다. 왜냐하면 흑색진균은 세포막에 멜라닌 색소를 가지고 있기 때문에 무염색 조직표본 (unstained tissue section)에서도 갈색의 진균요소를 확인할 수 있으며, 특히 색소분아곰팡이종을 일으키는 흑색진균들 (*F. pedrosoi*, *C. carriionii*, *P. verrucosa*, *F. compacta*, *R. aquaspersa* 등)은 조직에 큰 구형의 두터운 벽을 가지고 분할을 보이는 경화세포가 특징적으로 발견되기 때문이다.

1) 제 1단계: 육안적 관찰

① 균집락의 색깔과 형태

흑색진균은 대부분 균집락의 색깔이 흑색이며, 배지이면 (reverse)도 흑색을 보인다.

대부분의 흑색진균은 균집락의 색깔이 dark-olive에서 black으로 변하면서 솜털 (fluffy) 모양의 균집락을 보이나 *E. dermatitidis*는 creamy한 yeast-like colony를 보인다.

② 발육속도 (growth rate)

균집락의 발육속도는 크게 대개 5~7일 이내 full growth되는 신속발육 (fast-growing), 6~13일 이내 발유하는 중등발육 (moderate-growing), 14일 이상 또는 그 이상 지나야 발육하는 지연발육 (slow-growing)으로 나누어지는데 대부분 흑색진균은 중등발육에 속 하나 *Alternaria* 균종은 신속발육 진균이며 *F. compacta*는 지연발육 진균이다.

③ 발육온도

균의 발육온도는 흑색진균 동정에 중요한 기준이 되며, 같은 균속 (genus)내에서도 균종에 따라 달라지며, 같은 균종내에서도 서로 다른 경우가 있다. 예를 들면 *Exophiala* 균속의 균종중 *E. jeanselmei*는 38°C 이상에서 살지 못하여 균집락이 자라지 않는데 비해 *E. dermatitidis*, *E. moniliae* 및 *E. spinifera*는 38°C 이상에서도 잘 자란다.

2) 제 2단계: 현미경 관찰

① 포자의 종류

흑색진균중 *Cladosporium* 균종은 연쇄상 분아포자 (blastospores)를 보인다.

② 포자의 색깔

흑색진균은 모두 갈색 또는 검게 보인다.

③ 포자형성

대부분의 흑색진균의 포자형성은 분생자가 생겨서 연쇄상으로 연결되는 *Cladosporium*형, 분생자병의 끝이나 옆을 따라 포자가 형성되는 *Rhinocladiella*형, phialide라는 플라스크형 분생자병의 끝에 포자가 형성되는 *Phialophora*형 중 하나로 보이는데 *F. pedrosoi*는 3형의 혼합을 보인다.

④ 분생자병의 형태

*E. jeanselmei*는 특징적으로 끝이 점차 가늘어져 뾰족해진 원통형 또는 원추형의 분생자병을 관찰할 수 있다.

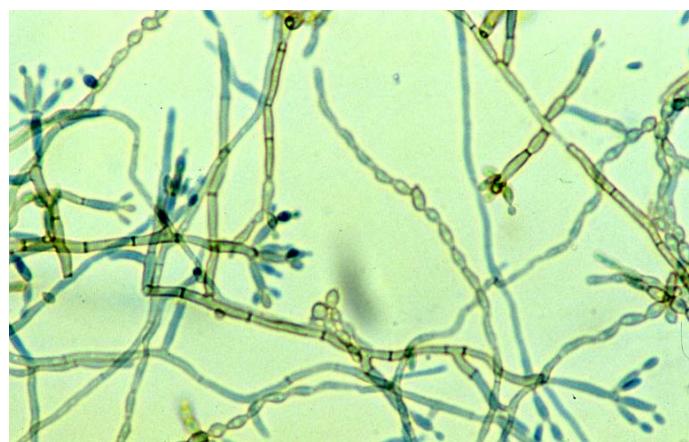


Fig. 1. *Fonsecaea pedrosoi*의 현미경 소견 (Lactophenol-cotton blue 염색, $\times 400$)



Fig. 2. *Exophiala jeanselmei*의 현미경 소견 (Lactophenol-cotton blue 염색, $\times 400$)

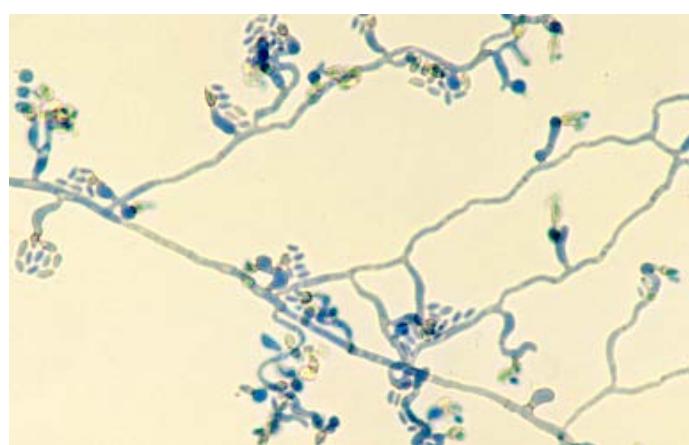


Fig. 3. *Phialophora verrucosa*의 현미경 소견 (Lactophenol-cotton blue 염색, $\times 400$)

3) 제 3단계: 생화학 및 생리학적 검사 (biochemical & physiological test)

① 당대사 실험 (sugar assimilation test)

Exophiala 균속의 균종 중 *E. jeanselmei*는 당대사 실험에서 glucose, D-gluconate, gluconate에 양성반응을 보이나 lactose, melibiose에는 음성반응을 보여, melibiose에는 양성반응을 보이는 *E. dermatitidis*, *E. moniliae* 및 *E. spinifera*와 균종 감별이 가능하다.

② 온도 내성검사 (heat tolerance test)

Exophiala 균속의 균종중 *E. jeanselmei*는 최대발육온도 (maximum growth temperature)가 37°C로 38°C 이상에서 살지 못하여 균집락이 자라지 않는데 비해, *E. dermatitidis*는 42°C, *E. moniliae* 및 *E. spinifera*는 40°C가 각각 최대발육온도로 38°C 이상에서도 잘 자라므로 균종 감별이 가능하다.

4) 제 4단계: 분자생물학적 분석 (molecular analysis)

배양된 균집락을 bead beater나 액화질소로 흑색진균 진균요소의 세포벽을 파괴하여 DNA를 분리하여 아래와 같은 분자생물학적 기법으로 균종의 동정이나 균종내 다양한 아형 (subtype)을 구분할 수 있다.

- RAPD (Random amplified polymorphic DNA)법
- mtDNA (mitochondria DNA) RFLP (restriction fragment length polymorphism)법
- PCR (polymerase chain reaction)-RFLP법
- chitin synthase sequence법
- DNA ITS region sequence법
- β -tubulin (*TUB1*) & actin (*ACT1*) regions sequence법

결 론

흑색진균에 의한 감염증은 피부의 표재성 진균감염보다는 대부분 피하조직이나 전신감염을 보이는 심재성 진균감염으로 나타나므로 임상적으로 농양이나 사마귀양 판의 피부병변을 보이고 조직학적으로 만성 육아종성 염증소견을 보이면 반드시 진균배지에 조직배양 (tissue culture)을 하여 원인균을 동정하여 흑색진균을 확인하여야 한다.

참 고 문 헌

1. Suh MK, Lee YH. Infections caused by dematiaceous fungi. Kor J Med Mycol 2005; 10: 77-82
2. Suh MK. Phaeohyphomycosis in Korea. Jpn J Med Mycol 2005; 46: 67-70
3. Suh MK, Kim YJ, Kwon SW, Kim JC. Ribosomal gene analysis of dematiaceous fungi using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Korean J Dermatol 2003; 41: 1478-1486
4. Suh MK, Suh JC, Kim JC, Lee HC. Genetic diversity of dematiaceous fungi using random amplified polymorphic DNA. Kor J Med Mycol 2003; 8: 7-15
5. Kim SO. Molds identification I. Kor J Med Mycol 2003; 8: 97-102
6. Ko WT, Suh MK, Ha GY. Antifungal susceptibility testing of dematiaceous fungi using Etest. Kor J Med Mycol 2009; 14(in press)

7. Suh MK, Suh JC, Seo SK, et al. A case of subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Exophiala jeanselmei*. Korean J Dermatol 1999; 37: 395-399
8. Suh MK, Sung YO, Yoon KS, et al. A case of chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi*. Korean J Dermatol 1996; 34: 832-836

● 연자 소개 ●

성명: 서무규 (徐武揆)

생년월일: 1958년 2월 3일

♦ 학력 ♦

의학사: 경북대학교 의과대학 의학과 졸업 (1982년)

의학박사: 경북대학교 대학원 피부과학전공 (1993년)

♦ 경력 ♦

1983년 3월 ~ 1986년 2월 경북대학교 병원 피부과전공의 수료

1991년 5월 ~ 현재

동국대학교 의과대학 피부과학교실 교수 및 동국대학교 경주병원 피부과장
(동국대학교 의과대학 피부과학교실 주임교수 역임, 1997~2007)

♦ 학회 ♦

대한피부과학회 정회원, 이사 및 학회지 심사위원

대한의진균학회 정회원, 평의원 및 총무이사

일본의진균학회 정회원 (JSMM)

세계인수의진균학회 정회원 (ISHAM)

MEMO

MEMO