

조갑진균증의 진단에 있어 KOH 검사, 진균 배양 검사, 병리 조직 검사 및 중합효소 연쇄반응의 비교

영남대학교 의과대학 피부과학교실, 병리학교실*

신영민 · 신동훈 · 최종수 · 김기홍 · 김극준*

= Abstract =

A Comparative Study of KOH Preparation, Fungal Culture, Histopathologic Examination and Polymerase Chain Reaction for Diagnosis in Onychomycosis

Young Min Shin, Dong Hoon Shin, Jong Soo Choi, Ki Hong Kim and Geuk Jun Kim*

Department of Dermatology, Department of Pathology*,
College of Medicine, Yeungnam University, Daegu, Korea

Background: Onychomycosis is one of the most common nail disorders, and it is necessary of mycologic confirmation to treat correctly. It has been reported that histopathologic evaluation and polymerase chain reaction (PCR) of the nail plate by nail clipping might be a useful supportive method for identification of causative fungi showing higher detection rates.

Objective: This study was designed to compare diagnostic efficacy of KOH preparation, fungal culture, histopathologic examination and PCR in onychomycosis.

Methods: Using 60 nail samples from 60 patients with clinically suspected onychomycosis, KOH preparation and fungal culture with nail and subungual tissue was performed. And histopathologic examination with PAS staining and PCR with DNA extracted from paraffin block was performed.

Results: The results are summarized as follows:

1. The positive rates of conventional KOH preparation, fungal culture, histopathologic examination and PCR were 87.5%, 8.9%, 87.5% and 83.9%.

2. In histopathologic examination, fungi were distinguished as 3 groups based on Kim and Cho's classification (1997): dermatophytes, *Candida* sp. and non-dermatophytic mold (NDM). Fifteen of 49 samples are dermatophytes, 1 is *Candida* sp., and 7 are NDM, 8 are dermatophytes and *Candida* sp. mixed infections, 18 are dermatophytes and NDM mixed infections.

3. In PCR, 1 of 47 samples is *Trichophyton rubrum*, 4 are *Candida* sp. and 39 samples are NDM.

Conclusion: Histopathologic examination in onychomycosis is considered to be an useful supportive method in diagnosis and identification of causative fungi in onychomycosis.

[Kor J Med Mycol 2007; 12(2): 59-69]

Key Words: Onychomycosis, Histopathologic examination, Polymerase chain reaction

†별책 요청 저자: 김기홍, 705-717 대구광역시 남구 대명동 317-1, 영남대학교 의과대학 부속병원 피부과
전화: (053) 620-3160, Fax: (053) 622-2216, e-mail: khkim@med.yu.ac.kr

서 론

조갑진균증은 비교적 임상에서 흔히 볼 수 있는 질환으로 조갑의 진균 감염에 의해 조갑의 변색, 비후, 박리 등이 나타나고 만성적인 경과를 보인다. 조갑진균증은 장기간의 치료가 요구되며, 치료제를 선택하기 위해서는 원인균 동정을 포함한 정확한 진단이 필요하다^{1,2}.

현재 흔히 사용하는 조갑진균증의 진단 검사 방법으로는 KOH 검사와 진균 배양 검사가 있으며, KOH 검사로 비교적 신속하게 진단할 수 있고 원인 균주를 정확히 동정하려면 진균 배양 검사가 필수적이다. 그러나 조갑진균증의 진단 양성율은 KOH 검사는 40~50%, 진균 배양 검사는 20~50% 정도로 낮다^{1,2}. 이러한 낮은 감수성을 보완하기 위하여 Suarez 등³은 임상적으로 조갑진균증이 강력히 의심되나 KOH 검사와 진균 배양의 결과가 계속 음성으로 나오는 경우 병변 조갑을 채취 후 병리 조직 검사를 시행하여 조갑판에서 진균의 존재와 함께 침범한 정도와 배열을 알 수 있고 진균의 형태를 관찰함으로써 원인균의 균종간 구별이 가능하다고 하였다. 또한 최근 진균의 존재 유무 및 동정을 위해 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)이 사용되고 있는데, 2~3일 내에 소량의 DNA만으로도 진균의 존재 유무를 알아낼 수 있고, 균종에 특이한 primer를 제작하면 손쉽게 정확한 균 동정이 가능하다는 장점이 있다. 이에 저자들은 조갑진균증이 의심되는 환자들에서 KOH 검사, 병리 조직 검사, 진균 배양 검사, PCR 검사를 시행하여 결과를 비교분석 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

2005년 4월부터 2006년 4월까지 영남대학교 의과대학 부속병원 피부과 외래를 내원한 환자 중 조갑의 변색, 비후, 박리 등의 소견이 관찰되

어 임상적으로 조갑진균증이 의심되는 60명의 환자를 대상으로 하였다 (Table 1).

2. 연구방법

1) KOH 검사

조갑진균증이 의심되는 부위를 알코올로 잘 닦아 말린 후 15번 외과용 칼을 사용하여 조갑과 조갑하 조직을 긁어 유리 슬라이드 중앙에 놓고 10~20% KOH 용액을 한 방울 떨어뜨리고 덮개 유리를 덮고 각질이 충분히 녹아 얇게 퍼지도록 하여 광학 현미경하에서 균사를 관찰하였다.

2) 진균 배양 검사

동일한 방법으로 조갑과 조갑하 조직을 긁어 cycloheximide가 첨가된 potato corn meal-Tween 80 agar 사면 배지에 접종하고 25°C에서 2~3주 동안 배양 후 판독하였다.

3) 병리 조직 검사

모든 대상 환자의 조갑진균증이 의심되는 부위의 조갑판을 침범부위의 근위부까지 nail clipper로 깎아 10% 포르말린 용액에 고정한 후 파라핀에 포매하고 14% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-2Na 용액 (pH 7.4) (Duksan pure chemical Co. Ltd, Korea)에 7일간 처리하여 연화시킨 후 5 µm 두께의 파라핀 조직 절편을 만들어 periodic acid Schiff (PAS) 염색을 시행하였다.

염색된 조직 표본을 광학 현미경하에서 검경하여 김과 조⁴가 시행한 분류 방법을 바탕으로 3가지 균으로 구분하였다. 분절(septation)이 있고 굵기가 균일하고 분지(branching)가 있는 균사가 관찰되는 경우를 피부사상균 균 (Fig. 1), 균일한 크기와 모양의 포자와 함께 위성 균사(pseudohyphae)가 관찰되는 경우를 칸디다 균 (Fig. 2), 비교적 굵은 균사가 불규칙한 형태를 이루며 분절이 있거나 그 주위에 불규칙하며 다양한 크기와 모양의 포자가 관찰되는 경우를 non-dermatophytic mold (이하 NDM) 균 (Fig. 3, 4)으로 하였다 (Table 2).

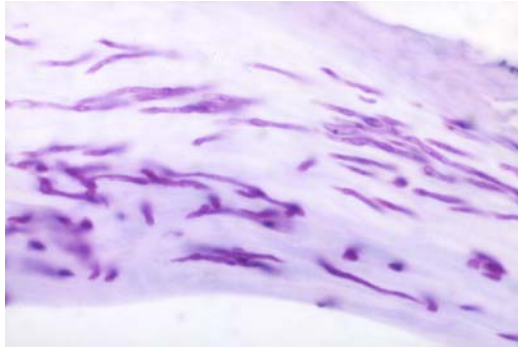


Fig. 1. Dermatophyte: septated, thin and long hyphae (PAS stain, $\times 400$)

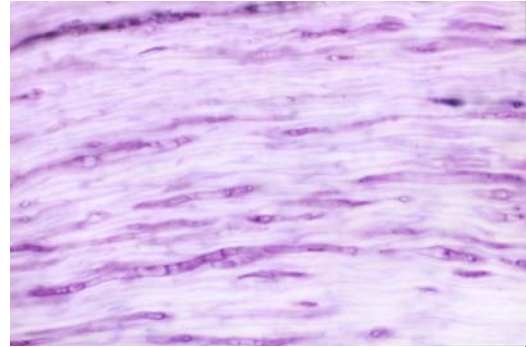


Fig. 3. Mold: septated and thick hyphae with variable width (PAS stain, $\times 400$)

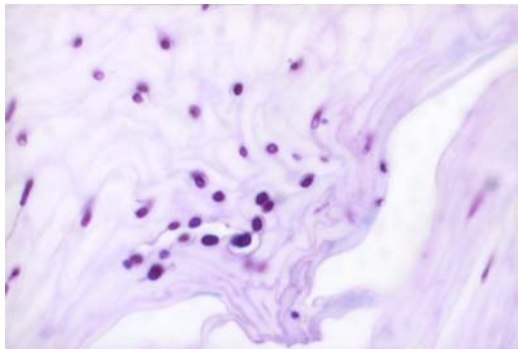


Fig. 2. *Candida*: regular sized and shaped spores (PAS stain, $\times 400$)

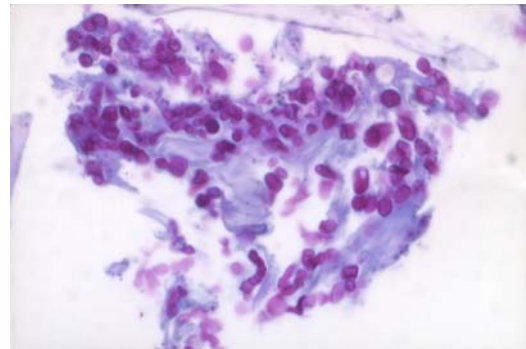


Fig. 4. Mold: irregular sized and shaped spores (PAS stain, $\times 400$)

4) PCR 검사

(1) DNA 분리

병리 조직 검사에 사용한 포르말린 고정 파라핀 포매 (embedded) 조직을 5 μm 두께로 자른 5~10개의 조직 절편을 준비하여 xylene (JUNSEI, Japan) 1.5 ml를 넣고 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 가열하는 작업을 2~3차례 반복하여 파라핀을 녹인 후 무수알코올에 2차례 세척하고 완전히 건조시킨 후 TE buffer (pH 8.0, 10 mM Tris, 1 mM EDTA) (Sigma, USA) 400 μl 와 proteinase K (DAKO, U.S.A.) 40 μl 혼합액에 넣고 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 보관하여 세포막을 분리시킨다. DNA 분리를 위해 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v) (Sigma, USA) 혼합액과 chloroform (JUNSEI, Japan)으로 각각 처리한 후 3 M sodium acetate (Sigma, USA) 0.1배 용적과 무수알코올 2배 용적을 가하였으며,

이 용액을 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 이상 방치하여 DNA를 침전시킨 후 분리 건조하여 증류수로 용해시켰다.

(2) 범진균 primer를 이용한 PCR 및 염기서열 분석

① Primer

분리한 DNA를 사용하여 nested PCR하여 ribosomal DNA의 ITS2 부위를 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 1차 PCR용 primer는 White 등⁵의 범진균 primer ITS3와 ITS4이었고, 2차 PCR용 primer는 자체 제작한 primer 58S62 (5'-ATCGA-ATCTTTGAACGCACA-3')와 primer 28S361 (5'-CCTACCTGATCCGAGGTCAA-3')이었다.

② PCR 증폭

반응 혼합물 20 μl 에 10 \times PCR buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1

Table 1. Characteristics and diagnostic tests of the 60 patients with suspicious onychomycosis

Patient No.	Sex	Age	Site	KOH	Fungal Culture	Histopathologic Findings	PCR
1	M	51	toe nail	+	<i>T. rubrum</i>	dermatophyte	<i>Aureobasidium pullulans</i>
2	F	68	toe nail	+	<i>T. rubrum</i>	dermatophyte	<i>Phaeosphaeria oryzae</i>
3	M	47	toe nail	+	<i>T. rubrum</i>	dermatophyte	-
4	M	66	toe nail	+	-	dermatophyte	<i>Alternaria alternata</i>
5	F	39	toe nail	+	-	dermatophyte	<i>Cladosporium</i> sp.
6	M	20	toe nail	+	-	dermatophyte	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
7	F	73	toe nail	+	-	dermatophyte	<i>Phaeococcomyces chersonesos</i>
8	M	57	toe nail	+	-	dermatophyte	<i>Seiridium ceratosporum</i>
9	F	69	toe nail	+	-	dermatophyte	<i>Septoria sambucina</i>
10	F	65	finger nail	+	-	dermatophyte	uncultured <i>ascomycete</i> isolate
11	M	27	toe nail	+	-	dermatophyte	unknown
12	M	60	toe nail	+	-	dermatophyte	unknown
13	M	64	toe nail	+	-	dermatophyte	-
14	M	55	toe nail	+	-	dermatophyte	-
15	F	18	toe nail	-	-	dermatophyte	<i>Cladosporium uredinicola</i>
16	M	71	toe nail	+	-	<i>candida</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
17	M	69	toe nail	+	-	NDM*	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
18	F	53	toe nail	+	-	NDM*	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
19	F	65	toe nail	+	-	NDM*	<i>Fusarium culmorum</i>
20	M	25	toe nail	+	-	NDM*	unknown
21	M	33	toe nail	+	-	NDM*	-
22	M	74	toe nail	+	-	NDM*	-
23	M	68	finger nail	-	-	NDM*	<i>Alternaria</i> sp.
24	F	53	toe nail	+	<i>T. rubrum</i>	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>T. rubrum</i>
25	M	67	toe nail	+	-	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
26	M	29	toe nail	+	-	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
27	F	60	toe nail	+	-	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
28	M	67	toe nail	+	-	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>Alternaria</i> sp.
29	M	74	toe nail	+	-	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
30	M	79	toe nail	+	-	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
31	M	19	toe nail	+	-	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>Cladosporium uredinicola</i>
32	M	54	toe nail	+	<i>T. rubrum</i>	dermatophyte & NDM*	<i>Volutella ciliata</i>
33	F	75	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Aspergillus niger</i>
34	M	49	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Aureobasidium pullulans</i>
35	M	71	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Aureobasidium pullulans</i>

Table 1. Characteristics and diagnostic tests of the 60 patients with suspicious onychomycosis

Patient No.	Sex	Age	Site	KOH	Fungal Culture	Histopathologic Findings	PCR
36	M	64	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Aureobasidium pullulans</i>
37	M	26	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
38	F	51	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
39	F	40	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Cladosporium uredinicola</i>
40	F	45	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	<i>Cladosporium uredinicola</i>
41	M	89	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	-
42	M	58	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	-
43	M	31	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	-
44	M	54	toe nail	+	-	dermatophyte & NDM*	-
45	M	45	toe nail	-	-	dermatophyte & NDM*	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
46	F	67	toe nail	-	-	dermatophyte & NDM*	<i>Penicillium spinulosum</i>
47	M	50	finger nail	-	-	dermatophyte & NDM*	Uncultured <i>Hypocreales</i>
48	M	66	toe nail	-	-	dermatophyte & NDM*	-
49	F	40	toe nail	-	-	dermatophyte & NDM*	-
50	M	55	toe nail	+	-	-	<i>Aureobasidium pullulans</i>
51	M	70	toe nail	+	-	-	<i>Aureobasidium pullulans</i>
52	F	25	toe nail	+	-	-	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
53	F	58	finger nail	+	-	-	<i>Muscodor albus</i> strain
54	F	48	toe nail	+	-	-	<i>Phaeosphaeria avenaria</i>
55	F	64	toe nail	+	-	-	-
56	M	62	toe nail	+	-	-	-
57	M	39	toe nail	-	-	-	<i>Aureobasidium pullulans</i>
58	M	59	toe nail	-	-	-	<i>Aureobasidium pullulans</i>
59	F	34	toe nail	-	-	-	Uncultured <i>ascomycete</i> isolate
60	F	77	toe nail	-	-	-	Uncultured <i>ascomycete</i> isolate

*non-dermatophytic mold

mM EDTA) 2 µl, 2.5 mM dNTP 1.6 µl, primer 1, primer 2 각각 0.4 µl, Takara 5 Unit Taq polymerase 0.1 µl, 진균 DNA 용액 1 µl, 증류수 14.5 µl를 기본 농도로 PCR을 시행하였다. 사용한 thermal cycler는 PTC-100 (MJ research Inc., USA)이었다.

반응 조건은 처음에 denaturation (95°C, 5분) 후 denaturation (95°C, 30초), annealing (63°C, 30초), extension (72°C, 1분) 과정을 30회 반복하고, 마지막에 extension (72°C, 10분)을 시행하였다. PCR로

증폭한 DNA를 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel에서 100 volt로 20~30분간 전기영동 (Mupid-2 Mini Gel Migration Trough, Cosmo Bio Co., LTD) 후 자외선 투과조명기로 관찰하였다. 이들 중 형광을 띠는 증폭이 확인된 DNA를 purification kit (Bioneer, Korea)로 정제한 후 마크로젠 회사에 의뢰하여 염기서열을 얻었고 Genbank에서 검색하였다.

Table 2. Histopathologic findings of the 60 examined nails

Histopathologic Findings	Fungi		
	Dermatophytes	<i>Candida</i> sp.	NDM*
Hyphae			
Septated, thin, long	40		
Septated, thick, irregular			12
Non-septated, variable sized			7
Beaded	10		
Pseudohyphae		3	
Spores			
Regular sized & shaped		7	
Irregular sized & shaped			10

*non-dermatophytic mold

(3) *Trichophyton(T.) rubrum* 특이 PCR

① Primer

*T. rubrum*의 rDNA NTS의 TRS-1과 TRS-2를 증폭하기 위해 Jackson 등⁶의 primer를 사용하였다. TRS-1을 증폭하기 위하여 primer TrNTSF-2 (5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3')와 TrNTSR-4 (5'-TGCCACTTCGATTAGGAGGC-3')를, TRS-2를 증폭하기 위하여 primer TRNTSR-1 (5'-CTCAGT-CGAACCGTGAGGC-3')과 TRNTSC-1 (5'-CGAG-ACCACGTGATACATGCG-3')을 사용하였다.

② PCR 증폭

반응 혼합물의 농도는 위 실험과 동일하였고 반응 조건은 처음에 denaturation (95℃, 5분) 후 denaturation (94℃, 30초), annealing (58℃, 30초), extension (72℃, 3분) 과정을 30회 반복하고, 마지막에 extension (72℃, 10분)을 시행하였다.

결 과

1. 양성을 비교

병변 조각에서 시행한 KOH 검사, 진균 배양 검사, 병리 조직 검사 중 1가지 이상에서 양성을 보이면 조각진균증으로 정의하였고, 60예 중 56예를 조각진균증으로 진단하였다. KOH 검사, 진균 배양 검사, 병리 조직 검사, 중합효소 연쇄반

응의 양성율은 각각 87.5%, 8.9%, 87.5%, 83.9%였다 (Table 1).

2. KOH 검사 및 진균 배양 검사 소견

KOH 검사의 경우 총 56예의 병변 조각 중 49예 (87.5%)에서 양성을 보였고, 진균 배양 검사의 경우 5예 (8.9%)에서 배양되었으며, 배양된 균은 모두 *T. rubrum*이었다.

3. 병리 조직 검사 소견

PAS 염색 조각 표본을 관찰한 결과 총 56예의 조직 표본 중 49예 (87.5%)의 표본에서 진균이 관찰되었다. 이중 피부사상균 균은 15예, 칸디다 균은 1예, NDM 균은 7예였으며, 피부사상균 군과 칸디다 군 중복 감염은 8예, 피부사상균 군과 NDM 균 중복 감염은 18예였다 (Table 2). 피부사상균이 포함된 경우가 41예로 병리 조직 검사상 진균이 관찰된 49예 중 83.7%를 차지하였다 (Table 3).

4. 중합효소 연쇄반응 소견

조각에서 추출한 총 60예의 DNA로 시행한 범진균 PCR 검사상 47예 (78.3%)에서 증폭반응을 보였다. 이 중 피부사상균은 *T. rubrum* 1예만이 동정되었고, 칸디다는 4예가 동정되었으며, 39예

는 NDM에 속하는 균으로 동정되었다. 3예는 PCR 검사상 증폭반응은 보였으나 Genbank에서 염기서열이 일치하는 진균을 찾을 수 없었다 (Table 4). 또한 진균 배양 검사상 *T. rubrum*이 배양된 5예 중 3예에서도 NDM로 판독되었다 (Table 5).

TRS1과 TRS2를 증폭하는 *T. rubrum* 특이 PCR 검사는 모든 검체에서 음성을 보였다.

고 찰

조갑진균증은 표재성 진균 질환으로 최근 노인 인구의 증가, 면역 억제제나 부신 피질 호르몬제의 장기 사용 등으로 그 빈도가 증가하고 있다. 또한 조갑진균증은 조갑의 변색, 비후, 박리 등을 초래하여 건선, 편평태선, 습진 및 외상 등에 의한 조갑 병변과 임상적으로 감별이 필요하며,

Table 3. Results of histopathologic evaluation of 60 examined nails

Histopathologic Findings	Number (%)
Dermatophytes	15 (25.0)
<i>Candida</i> sp.	1 (1.7)
NDM*	7 (11.7)
Mixed infection	
Dermatophytes & <i>Candida</i> sp.	8 (13.3)
Dermatophytes & NDM*	18 (30.0)
Negative	11 (18.3)
Total	60 (100.0)

*non-dermatophytic mold

조갑진균증의 치료제를 선택하기 위해서는 원인 균을 확인하는 것이 필요하다⁷.

흔히 사용되는 조갑진균증의 진단 방법으로 KOH 검사와 진균 배양 검사가 있으나 이들 검사 방법은 양성율이 낮고, 특히 진균 배양 검사

Table 4. Results of polymerase chain reaction of 60 examined nails

PCR	Number (%)
<i>T. rubrum</i>	1 (1.7)
<i>Candida</i> sp.	4 (6.7)
non-dermatophytic mold	
<i>Cladosporium</i> sp.	13 (21.7)
<i>Aureobasidium</i> sp.	9 (15.0)
<i>Alternaria</i> sp.	3 (5.0)
<i>Ascomycetes</i> sp.	3 (5.0)
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	2 (3.3)
<i>Aspergillus</i> sp.	1 (1.7)
<i>Fusarium</i> sp.	1 (1.7)
<i>Hypocreales</i> sp.	1 (1.7)
<i>Muscodora</i> sp.	1 (1.7)
<i>Penicillium</i> sp.	1 (1.7)
<i>Phaeococcomyces</i>	1 (1.7)
<i>Seiridium</i> sp.	1 (1.7)
<i>Septoria</i> sp.	1 (1.7)
<i>Volutella</i> sp.	1 (1.7)
Unknown	3 (5.0)
Negative	13 (21.7)
Total	60 (100.0)

Table 5. Comparison of KOH, histopathologic and PCR results of 5 cases cultured by *T. rubrum*

Case	KOH	Histopathologic findings	PCR
1	+	dermatophyte & <i>candida</i>	<i>T. rubrum</i>
2	+	dermatophyte	<i>Phaeosphaeria</i>
3	+	dermatophyte	<i>Aurebasidium</i>
4	+	dermatophyte & NDM*	<i>Volutella</i>
5	+	dermatophyte	negative

*non-dermatophytic mold

Table 6. Comparison of KOH, histopathologic results of 60 examined nails

Histopathologic Findings	KOH	
	Positive	Negative
Dermatophyte	14	1
<i>Candida</i>	1	0
NDM*	6	1
Dermatophyte & <i>candida</i>	8	0
Dermatophyte & NDM*	13	5
Negative	7	4

* non-dermatophytic mold

로 원인균을 진단하는데는 오랜 시간이 소요되며, 또한 칸디다나 NDM이 배양되거나 잡균 오염이 있는 경우 원인 균주를 규명하는데 많은 어려움이 있다³⁷. 또한 NDM을 원인균으로 판정하기 위해서는 연속적으로 배양되고 배양할 때 여러 개의 집락이 배양되어야 하므로 과정이 복잡하다. 본 연구에서는 진균 배양 검사의 양성율이 8.9%로 다른 보고에 비해 훨씬 낮았다¹². 이는 대부분의 환자들이 과거 조갑진균증을 치료한 과거력이 있거나 현재 치료 중이었고, 조갑 병변의 채취를 근위부에서 충분히 하지 않았으며, 잡균의 오염을 막기 위해 cycloheximide가 첨가된 배지를 사용하여 mold의 증식이 억제되었기 때문일 것으로 생각된다. 진균 배양 검사의 양성율을 높이기 위한 시도로 Zaias 등⁸은 조갑을 clipping한 후 분쇄기로 분말을 만들어 접종하였고, English와 Atkinson⁹은 흡인장치가 달린 치과용 드릴을 이용하여 높은 성공률을 보고하였다. 또한 진균은 조갑 병변의 근위부에서 가장 왕성하게 증식하고, 말단으로 이동된 균사는 죽어있기 때문에 진균 배양 검사를 위한 조갑의 채취시 근위부를 포함하는 것이 중요하다¹⁰. 따라서 향후 진균 배양 검사의 양성율을 높이기 위해 조갑 병변의 채취 방법 및 부위 선택에 있어 개선이 필요할 것으로 생각된다.

Sagher¹¹가 조갑진균증 진단에서 병리 조직 검사의 중요성을 강조하고 Zaias¹²가 원인 진균에

따른 특징적인 병리 조직 소견을 기술한 이후 병리 조직 검사가 조갑진균증의 진단에 활발하게 이용되고 있다. Suarez 등³은 조갑진균증이 의심되는 환자에서 nail clipping을 통한 조갑의 병리 조직 검사가 원인 균주 동정에 유용하고 진균학적 검사만 시행한 경우보다 더 높은 진단율을 보이므로 KOH 검사와 진균 배양 검사가 음성인 경우에도 조갑의 병리 조직 검사가 필요함을 강조하였다. Pierad 등¹³은 피부사상균, 칸디다 및 NDM의 특징적인 병리 조직 소견을 기술하였고, 국내에서는 김과 조⁴가 병리 조직 검사상 균사의 크기와 격벽 유무 및 포자의 크기와 모양에 따라 피부사상균, 칸디다, NDM의 3가지 임상형으로 구분하였다. 두 연구 모두 조갑진균증의 원인균을 피부사상균, 칸디다, NDM 균으로 나누었고 병리 조직 소견도 일치하였다.

병리 조직 검사는 넓은 면적의 조갑에서 균사나 포자 등의 진균의 존재 유무를 알 수 있으므로 진단율을 높일 수 있다. 또한 균사와 포자가 존재하는 위치, 침범 정도 및 배열 상태를 알 수 있으며, 균사나 포자의 형태를 관찰함으로써 원인 진균 각 균간의 구별이 가능하여 많은 정보를 얻을 수 있다. 또한 진균 배양 검사에서 칸디다나 NDM이 배양된 경우 병원균으로 확진하기 위해 여러 차례 반복하여 배양하여야 하나, 병리 조직 검사는 오염이 적고 중복 감염에 대해 보다 정확한 정보를 얻을 수 있다¹⁴⁻¹⁶.

본 연구는 김과 조⁴의 분류 방법을 바탕으로 시행하였고 총 60예의 조직 표본 중 49예 (81.7%)의 표본에서 진균이 관찰되었다. 이중 피부사상균 균은 15예 (30.6%), 칸디다 균은 1예 (2.0%), NDM 균은 7예 (14.3%)였으며, 피부사상균 균과 칸디다 균 중복 감염은 8예 (16.3%), 피부사상균 균과 NDM 균 중복 감염은 18예 (36.7%)로 총 41예 (83.7%)에서 피부사상균이 관찰되었다. 이는 피부사상균 균이 80.7%, 칸디다 균이 8.1%, NDM 균이 6.2%, 중복 감염이 1.9%로 단일 피부사상균 균이 대다수를 차지한 김과 조⁴의 연구 결과에 비해 단일 피부사상균 균이 차지하

는 비율은 낮았고, 중복 감염과 NDM 균은 높았다. 이는 판독의 기준이나 검체 채취 방법이 달랐기 때문으로 추정한다.

피부사상균 균은 KOH 검사가 음성인 11예 중 7예에서 병리 조직 검사상 균사 및 포자가 관찰되었고, 병리 조직 검사상 음성인 11예 중 7예에서 KOH 검사상 균사가 관찰되었다 (Table 6). 이는 KOH 검사는 원위부의 조갑과 조갑하 조직을 채취하였고, 병리 조직 검사는 좀더 근위부의 조갑까지 포함하지만 조갑하 조직은 적게 포함하였기 때문으로 생각되며, 두 검사를 상호 보완하면 양성율을 높일 수 있을 것이다. 또한 진균 배양 검사에서 *T. rubrum*으로 동정된 5예의 병리 조직 검사 결과 3예에서는 피부사상균, 1예에서는 피부사상균과 칸디다 중복 감염, 1예는 피부사상균과 NDM 중복 감염으로 모든 예에서 피부사상균에 합당한 소견이 관찰되어 병리 조직 검사가 특이성이 높음을 알 수 있었다 (Table 4).

조갑진균증의 병변에서 직접 DNA를 분리하여 PCR하는 방법은 빠른 시간 내에 진균 감염 여부와 원인균의 동정이 가능하다. 그러나 오염의 위험성이 높고, 상재균과 병원균의 구분, 중복 감염 여부는 알 수가 없는 단점이 있다.

지금까지 보고된 문헌들을 비교해 보면 PCR 검사를 통해 동정된 균 중 *T. rubrum*이 약 70~90%로 대부분을 차지하였고, NDM의 경우 약 2~7%를 차지하였으며, 종류는 다양하지 않았다¹⁷⁻²⁶. 이에 반해 본 연구의 범진균 primer를 이용한 nested PCR 검사에서 60예 중 *T. rubrum*이 1예, 칸디다가 4예 동정되었으며, 39예는 NDM에 속하는 균으로 동정되었다. 또한 NDM의 판독된 균의 종류는 14종으로 매우 다양하였다. 또한 *T. rubrum* 특이 PCR 검사는 모두 반응을 보이지 않았다.

대부분의 연구에서 DNA의 분리는 nail clipper로 조갑판을 잘라 lysis buffer를 첨가하는 방법을 사용하였고¹⁷⁻¹⁹, 채와 백^{27,28}은 조갑 연화 시간을 단축하고, DNA의 소실을 최소화 하기 위해 조갑판을 치과용 전기 분쇄기로 갈아 분말은 만든

후 lysis buffer를 첨가하는 방법을 사용하였다. 본 연구에서는 본 교실에서 보고한 것과 동일한 방법으로 조갑진균증의 파라핀 포매 조직에서 DNA를 분리하였다. 그러나 일반 병리 조직 표본과는 달리 양성율이 매우 낮았다²⁹. 이는 조갑의 경우 양말과 신발에 의해 따뜻하고 습윤한 상태가 조성되어 여러 가지 균들이 증식하기 좋고, 검체 수집 전 소독을 하여도 조갑하 조직까지 소독액이 미치지 못하므로 진균뿐만 아니라 여러 가지 세균이 혼재해 있을 가능성이 높기 때문일 것으로 생각된다. 따라서 조갑진균증에서 파라핀 포매 조직에서 DNA를 분리하여 PCR을 시행하는 것은 좋은 결과를 얻을 수 없을 것으로 생각되며, 추후 조갑진균증에서 PCR의 효율성을 높이기 위해서는 양질의 DNA를 확보하고, 오염을 줄일 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

병리 조직 검사는 KOH 검사에 비해 시간이 오래 걸리고 조직 절편의 위치에 따라 균사 및 포자가 관찰되지 않을 수 있는 단점이 있지만 조갑진균증의 원인이 되는 피부사상균, 칸디다 및 NDM의 감염에 따라 특징적인 병리 조직 소견을 보임으로 원인 진균 동정에 큰 도움을 줄 수 있을 뿐만 아니라 진균 배양만으로 진단하기 어려운 중복 감염의 진단에 간편하고 효과적인 방법이 될 수 있을 것이다. 따라서 KOH 검사나 진균 배양 검사가 음성인 경우 양성율을 높일 수 있는 보완적인 검사 방법의 하나로 생각된다.

결 론

저자들은 조갑진균증의 진단율을 높이고 원인균을 동정할 수 있는 효과적인 검사법을 찾기 위해 조갑진균증이 의심되는 60명의 환자를 대상으로 조갑과 조갑하 조직을 채취하여 KOH 검사와 진균 배양 검사를 시행하였다. 또한 조갑판을 침범부위의 근위부까지 nail clipper로 잘라서 파라핀 포매, 연화시킨 후 파라핀 절편을 만들어 PAS 염색하여 병리 조직 검사를 시행하였고, 파라핀 절편에서 DNA를 추출하여 중합효소 연쇄

반응을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 병변 조갑에서 시행한 KOH 검사, 진균 배양 검사, 병리 조직 검사 중 1가지 이상에서 양성을 보이면 조갑진균증으로 정의하였고, 60예 중 56예를 조갑진균증으로 진단하였다.

2. KOH 검사, 병리 조직 검사에서 양성을 보인 경우는 각각 49예 (87.5%), PCR 검사는 47예 (83.9%)로 비슷한 수준을 보인데 반해 진균 배양 검사는 5예 (8.9%)로 다른 검사에 비해 양성율이 낮았고 배양된 진균은 모두 *T. rubrum*이었다.

3. 병리 조직 검사상 형태학적으로 분절이 있는 균사의 굵기가 균일하고 분지를 이루며 주위에 소수의 포자만이 보이거나 포자가 관찰되지 않는 피부사상균 균이 15예, 분아 포자와 포도송이 모양의 균집된 균일한 포자 및 가성균사가 관찰되는 칸디다 균이 1예, 두께가 두껍고 다양하며 불규칙한 균사와 불규칙하고 다양한 크기와 모양의 균집된 포자가 관찰되는 NDM 균이 7예에서 관찰되었으며, 피부사상균 균과 칸디다 균 중복 감염은 8예, 피부사상균 균과 NDM 균 중복 감염은 18예에서 관찰되었다.

4. PCR 검사상 47예에서 양성을 보였으나 피부사상균은 *T. rubrum* 1예, 칸디다는 4예, NDM는 39예가 동정되었고 3예는 증폭반응은 보였으나 Genbank에서 염기서열이 일치하는 균을 찾을 수 없었다.

이상의 결과로 병변 조갑판의 병리 조직 검사는 조갑진균증의 진단에 큰 도움을 줄 뿐만 아니라 진균 배양 검사만으로 진단하기 어려운 중복 감염의 진단에 효과적인 방법으로 생각된다. 또한 배양 검사가 음성인 경우에도 조갑진균증의 원인 진균을 추정 진단할 수 있으므로 조갑진균증의 원인 진균을 연구하는데 보조적인 검사 방법의 하나로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 김정원, 노병인, 허원. 피부진균증의 임상적 및 균학적 관찰. 대피지 1973; 11: 139-150

2. 임경진, 김진혁, 신실. 피부진균증의 임상적 및 균학적 조사연구. 대피지 1978; 16: 435-442

3. Suarez SM, Silvers DN, Scher RK, Pearlstein HH, Auerbach R. Histologic evaluation of nail clippings for diagnosing onychomycosis. Arch Dermatol 1991; 127: 1517-1519

4. 김성욱, 조백기. 조갑진균증에서 진균 배양과 병리 조직 소견의 비교 검토. 의진균지 1997; 2: 31-42

5. White TJ, Burns T, Lee S, Tayler J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: A guide to methods and application. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322

6. Jackson CJ, Barton RC, Kelly SL, Evans EG. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. J Clin Microbiol 2000; 38: 4527-4533

7. Daniel CR. The diagnosis of nail fungal infection. Arch Dermatol 1991; 127: 1566-1567

8. Zaias N, Oertel I, Elliott DF. Fungi in toe-nails. J Invest Dermatol 1969; 55: 140-142

9. English MP, Atkinson R. An improved method for the isolation of fungi in onychomycosis. Br J Dermatol 1973; 88: 237-241

10. 김승용, 정병수, 최규철. 조갑진균증의 원인균 및 배양법에 관한 고찰. 대피지 1991; 29: 50-55

11. Sagher F. Histologic examinations of fungus infections of the nails. J Invest Dermatol 1948; 11: 337-354

12. Zaias N. Onychomycosis. Arch Dermatol 1972; 105: 263-274

13. Pierard GE, Arrese JE, Doncker PD, Pierard FC. Present and potential diagnostic techniques in onychomycosis. J Am Acad Dermatol 1996; 34: 273-277

14. 송계용. 진균증의 병리 조직학적 소견. 의진균지 1997; 2: 17-24

15. 조백기. 표재성 진균증의 진단 및 감별진단. 의진균지 2001; 6: 49-56

16. 조상현, 조백기. 조갑 백선에서 병리 조직 검사의 임상적 의의. 가톨릭대학 의학부 논문집 1990; 43: 993-1001
17. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, et al. Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. J Clin Microbiol 2006; 44: 1419-1427
18. Monod M, Bontems O, Zaugg C, et al. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. J Med Microbiol 2006; 55: 1211-1216
19. Walberg M, Mork C, Sandven P, et al. 18S rDNA polymerase chain reaction and sequencing in onychomycosis diagnostics. Acta Derm Venereol 2006; 86: 223-226
20. Arca E, Saracli MA, Akar A, et al. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis. Eur J Dermatol 2004; 14: 52-55
21. Bock M, Maiwald M, Kappe R. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. Mycoses 1994; 37: 79-84
22. Makimura K, Murayama SY, Yamaguchi H. Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol 1994; 40: 358-364
23. Menotti J, Machouart M, Benderdouche M, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis of dermatophyte and *Scytalidium* spp. onychomycosis. Br J Dermatol 2004; 151: 518-519
24. Ninet B, Jan I, Bontems O, et al. Molecular identification of *Fusarium* species in onychomycoses. Dermatology 2005; 210: 21-25
25. Yoshimura R, Ito Y, Morishita N, Ninomiya J, Takiuchi I. Comparative study between culture and PCR-RFLP analysis on identification of the causative agent of tinea unguium. Jpn J Med Mycol 2006; 47: 11-14
26. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies. Methods 2001; 25: 409-418
27. 채희재, 백승철, 조백기. 중합효소 연쇄반응과 제한효소분석을 이용한 조갑진균증 원인 진균의 진단. 의진균지 1999; 4: 6-14
28. 권오찬, 백승철, 조백기. 조갑진균증 진단에서 중합효소 연쇄반응 방법의 의의. 진균 배양 및 KONCPA 검사와의 비교. 대피지 1999; 37: 1457-1465
29. 신영민, 박소현, 신동훈 등. 폐암 말기 환자에서 발생한 *Phialemonium dimorphosporum*과 *Myrothecium* species에 의한 심재성 피부진균증 1예. 의진균지 2005; 10: 166-172