

Candida albicans 추정 동정을 위한 발아관 형성 조건

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

박 금 보 래 · 이 미 경

= Abstract =

Appropriate Condition of Germ Tube Formation as Presumptive Identification Test for *Candida albicans*

Borae G. Park and Mi-Kyung Lee

Department of Laboratory Medicine Chung Ang University

Background: *Candida albicans* is the most prevalent species found in human yeast infections. The germ tube test is still frequently used for its rapid presumptive identification. Recently *Candida dubliniensis* as well as *C. albicans* has been reported to form germ tubes.

Objective: The purpose of this study was to evaluate the germ tube test at various conditions for rapid presumptive identification of *C. albicans*.

Methods: *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* ATCC 18804, *C. dubliniensis* ATCC MYA 646, and *C. dubliniensis* KCTC 17427 were tested. Human pooled serum (HPS), HBV, HCV infected patient serum, fetal bovine serum (FBS) and rabbit serum (RS) were used for germ tube test. The germ tube formation was evaluated at different keeping condition of various sera, after mixing with 5 different bacterial suspensions and at various incubation conditions.

Results: The germ tube formation of *C. albicans* was more in the RS or FBS than in the HPS. For the various sera fresh sample was always the best expression of germ-tube forming ability. In the HCV infected patient serum and mixing with *Pseudomonas aeruginosa* germ tube formation was suppressed. *C. dubliniensis* did not form germ tube in the HPS, only formed in the FBS or RS.

Conclusion: For rapid presumptive identification of *C. albicans* not *C. dubliniensis* the best selection of serum is the fresh HPS. We recommend the examination with isolated colony free from bacteria after incubation for 2 to 3 hours. [Kor J Med Mycol 2008; 13(1): 20-25]

Key Words: *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, Germ tube test

서 론

Candida spp.에는 200여종 이상이 속해 있으며, 이 중 *Candida albicans*는 사람의 진균 감염에서 가장 흔한 균종으로 알려져 있어 다른 *Candida*

†별책 요청 저자: 이미경, 140-755 서울시 용산구 한강로 3가 65-207, 중앙대학교 용산병원 진단검사의학과
전화: (02) 748-9837, Fax: (02) 797-3471
e-mail: cpworld@cau.ac.kr

spp.와의 신속, 정확한 감별이 필요하다¹. *Candida* spp.의 추정 동정을 위해 CHROMagar, 발아관 검사, *C. albicans* 선별검사 kit 등 여러 검사가 가능하지만, *C. albicans*의 추정 동정에는 발아관 검사가 비용 효과적이고, 2~3시간 내에 이루어지는 신속한 검사로 알려져, 발아관 형성을 보이는 경우 더 이상의 검사를 진행하지 않고 *C. albicans*로 보고하기도 한다¹⁻³. 국내에서도 *C. albicans*의 추정 동정을 위하여 발아관 검사가 가장 많이

사용되고 있으나, 5% 정도의 *C. albicans*는 발아관 검사 음성이며, *C. albicans* 외에도 *Candida* spp. 중 *Candida dubliniensis*가 발아관을 형성하는 것으로 알려져 있다^{1,3}. 이에 여러 조건에서 발아관 형성에 영향을 주는 요인들을 검사하여 *C. albicans*를 위한 발아관 검사시 적절한 검사 조건을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 균주

C. albicans 표준 균주 2가지 ATCC 14053, ATCC 18804와 *C. dubliniensis* 표준 균주 2가지 ATCC MYA 646, KCTC 17427을 Sabouraud's dextrose agar에서 2번 계대 배양하여 기본 실험 균주로 사용하였으며, *C. albicans* 임상검체 10균주의 독립된 집락을 계대 배양해 사용하였다.

2. 혈 청

5가지 종류의 혈청을 사용하였으며, 실험 당일 아침 건강검진 혈청 중 모든 검사 결과가 정상

인 검체를 사람 혼주 혈청 (human pooled serum, HPS)으로, B형 간염 항원이 강양성을 보이거나 B형 간염 바이러스 핵산이 양성인 검체, C형 간염 바이러스 리보핵산이 양성인 검체를 실험 혈청으로 사용하였다. 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 상품화된 FBS (Fetal bovine serum certified, GIBCO, Invitrogen, USA)를 사용하였으며, 토끼 혈청 (rabbit serum, RS)은 직접 토끼로부터 채취한 혈액을 분리하여 사용하였다.

3. 발아관 형성 관찰

사용하고자 하는 혈청 500 μ L에 신선한 균주의 독립된 집락을 소량 접종하여 현탁액을 만든 후 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. CO₂가 포함된 배양기와 CO₂가 없는 배양기에서 각각 배양한 뒤 2, 3, 4, 5시간째에 슬라이드 글라스 위에 균 부유액을 한방울 놓고 커버글라스를 덮어 현미경 400배에서 발아관 형성 여부를 관찰하였다. 발아관 형성 정도는 100개의 효모 세포당 발아관이 형성된 세포의 수를 세어 백분율로 평가하였다. 배양 시간에 따른 차이를 보는 실험 이외에는 2시간째에

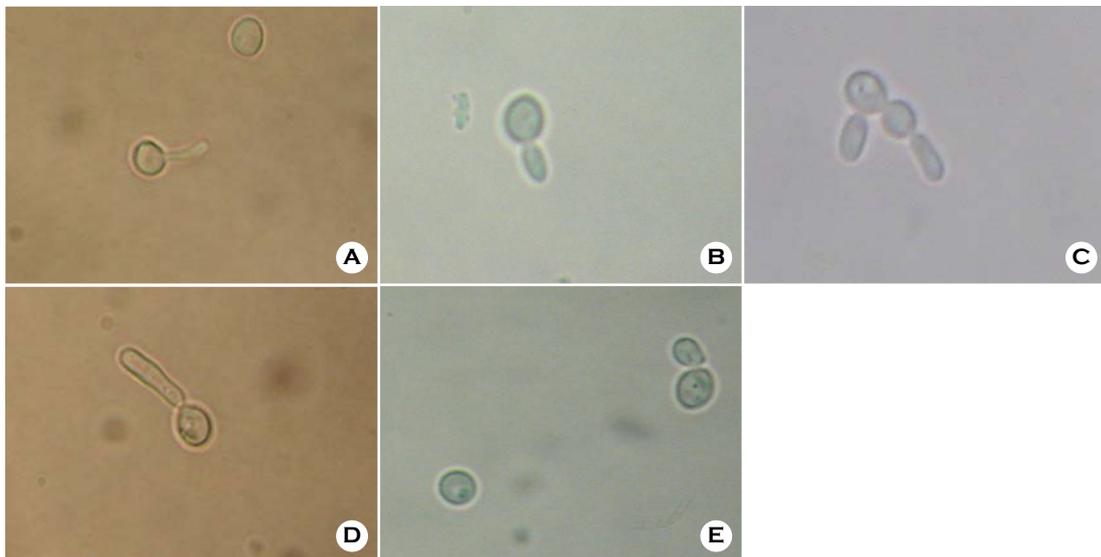


Fig. 1. Features of germ tube formation with 5 different sera. (A and B) *Candida albicans* shows germ tube formation with rabbit serum, (C) *Candida dubliniensis* shows germ tube formation with rabbit serum (D) *Candida dubliniensis* shows germ tube formation with fetal bovine serum (E) *Candida dubliniensis* shows no germ tube formation with human pooled serum (\times 400)

발아관 형성을 관찰하였다.

4. 혈청 보관 상태에 따른 발아관 형성 관찰

HPS, HBV 양성 검체, HCV 양성 검체, RS, FBS 각각을 첫째, 혈청을 얻은 당일 신선한 상태에서, 둘째, 소량 분주하여 3일간 냉동시켰다가 녹인 후, 셋째, 실온에서 1일간 보관한 뒤, 그리고 넷째, 냉장에서 1달 이상 보관한 뒤에 사용하여 발아관 형성에 차이가 있는지 확인하였다. FBS는 제품이 냉동 상태로 공급되므로, 처음 공급받아 냉동에서 녹인 후 시행한 검사를 신선한 상태로 적용시켰다.

5. 세균 혼합에 따른 발아관 형성 관찰

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 25923 각각의 세균으로 $1\sim 5 \times 10^7$ CFU/ml 현탁액을 만들고, *C. albicans*와 *C. dubliniensis* 표준 균주로는 $1\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml과 $1\sim 5 \times 10^7$ CFU/ml의 현탁액을 만들었다. FBS 300

μL에 세균 부유액 100 μL, *Candida* 부유액 100 μL를 혼합하여 총 500 μL를 배양한다. $1\sim 5 \times 10^7$ CFU/ml 세균과 $1\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml *Candida*, $1\sim 5 \times 10^7$ CFU/ml *Candida*를 각각 혼합하여 배양 2 시간째와 3시간째에 발아관 형성을 관찰하였다.

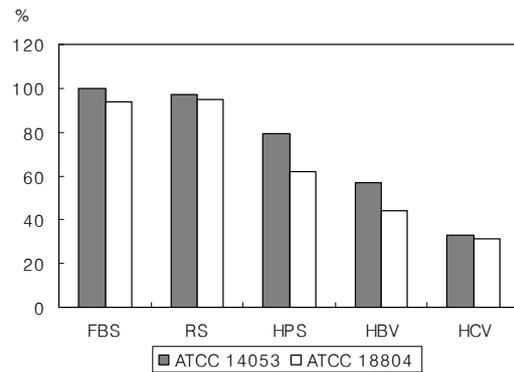


Fig. 2. Percentage germ-tube formation in *Candida albicans* with 5 different sera.

Abbreviations; FBS: Fetal bovine serum, RS: Rabbit serum, HPS: Human pooled serum, HBV: Hepatitis B virus infected human serum, HCV: Hepatitis C virus infected human serum, ATCC 14053: *Candida albicans* number of American type culture collection, ATCC 18804: *Candida albicans* number of American type culture collection

Table 1. Percentage germ-tube formation in *C. albicans* and *C. dubliniensis* with 3 different sera storing at various condition

		<i>C. albicans</i> ATCC 14053	<i>C. albicans</i> ATCC 18804	<i>C. dubliniensis</i> ATCC MYA 646	<i>C. dubliniensis</i> KCTC 17427
Rabbit serum	Fresh	92	95	7	5
	-20°C	55	50	5	5
	-4°C, 1 month	12	14	3	2
	RT	8	7	-	-
Fetal bovine serum	Fresh	97	95	21	5
	-20°C	94	96	28	5
	-4°C, 1 month	25	25	10	3
	RT	13	12	7	2
Human pooled serum	Fresh	60	87	-	-
	-4°C, 1 week	32	34	-	-
	-4°C, 1 month	17	19	-	-
	RT	7	10	-	-

Abbreviations; RT: room temperature, *C. albicans*: *Candida albicans*, *C. dubliniensis*: *Candida dubliniensis*

형성이 억제되었다 (Table 2).

결 과

고 찰

1. 혈청과 보관 상태에 따른 차이

FBS와 RS 사용시에는 *C. albicans*와 *C. dubliniensis* 모두에서 발아관 형성이 관찰되었으나, HPS나 HBV 양성 혈청, HCV 양성 혈청을 사용하면 *C. dubliniensis*에서는 발아관 형성을 관찰할 수 없었다 (Fig. 1). *C. albicans*의 발아관은 HPS 보다 FBS나 RS에서 잘 형성되었다 (Fig. 2). 모든 경우에서 동일하게 신선한 혈청 사용시 가장 많은 발아관 형성을 보여, 냉장 보관된 RS나 FBS 보다는 신선한 HPS에서 더 잘 형성되었고, 실온이나 냉장 상태로 장기간 보관시 모든 경우에서 발아관 형성이 억제되었다 (Table 1). 또한, HCV 양성 혈청에서 발아관 형성이 억제되는 현상을 볼 수 있었다 (Fig. 2).

2. 배양 조건 및 관찰 시간에 따른 차이

시간별로는 4시간 이후에는 발아관이 지나치게 많이 형성되어 균주가 한 덩어리로 뭉쳐지는 현상이 관찰되므로 판독에 어려움을 주었으며, 발아관이 적게 형성된 경우에는 시간이 지날수록 발아관 형성이 증가하기는 하였으나, 2시간 만으로도 발아관이 형성된 *C. albicans*를 구별하기에 충분하였다 (Fig. 3). CO₂ 유, 무의 배양 조건 차이에 따른 발아관 형성에는 차이가 없었다.

3. 세균 혼합에 따른 차이

*P. aeruginosa*와 혼합시 발아관 형성이 억제되었으며, 1~5 × 10⁷ CFU/ml 세균과 1~5 × 10⁶ CFU/ml *Candida*를 혼합하면 *E. faecalis*에서도 발아관

발아관 검사를 위해서는 토끼나 사람의 혈장 혹은 혈청, 우태아 혈청을 사용하는 것이 권장되고 있으나, 사람 혈청을 이용하는 경우 혈청내 *Candida* 항체로 인해 위음성이 있을 가능성이 있다고 하였으며, HIV와 간염이 없다고 확인된 사람 혈청을 사용하고 매 검사시 마다 양성과 음성 대조군으로 확인이 필요하다고 하였다²⁻⁵. *Candida tropicalis*가 형성하는 가성발아관이 위양성으로 판독될 가능성이 있기 때문에 음성 대조군이 필요하다고 하지만, 숙련된 검사실에서 가성발아관을 구별하는 것은 그다지 어렵지 않다. 오히려 *C. dubliniensis*는 *C. albicans*와 동일한 형태의 발아관을 형성하기 때문에 발아관의 모양만으로 두 균주를 구별할 수는 없다.

본 연구 결과에서 *C. albicans*는 토끼 혈청이나 우태아 혈청 사용시 사람 혈청을 사용할 때보다

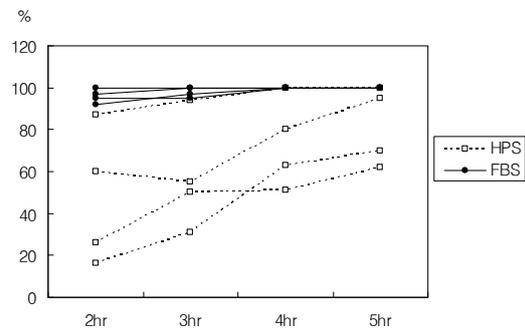


Fig. 3. Percentage germ-tube formation in *C. albicans* with FBS and HPS after incubation for 2 to 5 hours. Abbreviations; HPS: Human pooled serum, FBS: Fetal bovine serum

Table 2. Percentage germ-tube formation in *C. albicans* after exposure to different bacteria. Each bacteria suspension was 1~5 × 10⁶ CFU/ml concentration

	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>
<i>C. albicans</i> 1~5 × 10 ⁶ CFU/ml	25	30	34	10	30
<i>C. albicans</i> 1~5 × 10 ⁷ CFU/ml	36	19	45	17	23

Abbreviations; *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*, *E. coli*: *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*, *C. albicans*: *Candida albicans*

더 많은 발아관을 더 빨리 형성하였다는 것을 알 수 있었지만, 결과의 차이가 관독에 영향을 줄 정도는 아니었다. 그러나, 간염 바이러스가 있는 혈청을 사용할 경우에는 발아관 형성이 억제되었고, HCV 양성 혈청 사용시 이러한 현상이 두드러지게 나타났는데 10개의 임상 균주를 통한 확인 결과 역시 동일하였다. 발아관 형성은 *Candida* 항체 뿐만 아니라, 항암치료 등에 의해 억제될 수 있으므로⁷, 사람 혈청 사용시에는 간염 바이러스 보균자가 아닌 정상인의 혼주 혈청을 사용해야 하겠다.

또한 *C. dubliniensis*는 사람 혈청을 사용하면 발아관을 관찰할 수 없었는데, 일부 사람 혈청 사용시 발아관 형성이 관찰되지 않은 보고가 있기는 하지만 일반적으로 알려져 있는 사실과는 다른 결과였다^{7,8}. *C. dubliniensis* 자체가 표현형이 불안정하고, 2종류의 표준 균주만으로 확인한 결과이기는 하지만, 발아관 검사시 *C. dubliniensis*가 *C. albicans*로 잘못 동정되는 것을 방지하기 위해서는 사람 혈청을 사용하는 것이 좋겠다.

이용되는 혈청은 신선한 상태에서 사용했을 때 발아관 형성이 잘 되었으며, 신선한 HBV 감염 혈청을 사용할 경우 냉장 보관된 정상인의 혼주 혈청보다 발아관 형성이 잘되어 어떤 경우라도 신선한 혈청을 얻는 것이 가장 좋았다. 또한 어떤 종류의 혈청을 사용하더라도 실온이나 냉장으로 장기간 보관하는 것은 피해야 하겠다.

배양 시간은 35°C에서 2시간 혹은 37°C에서 2.5~3시간 배양 후 관찰하는 것을 추천하고 있으며, 2시간 이후 관찰한 결과는 신뢰할 수 없다고 한다^{2,3}. 그러나 2~4시간 이내에 관독을 권장하기도 하며⁵, 실제 검사실에서는 3~4시간 배양한 결과를 가장 흔하게 관독하고 있다. 본 연구 결과에서는 발아관 형성이 약하게 된 경우에는 2시간 보다는 3시간째에 형성이 증가한 것을 알 수 있기는 하지만, 4시간 이후에는 오히려 발아관을 관찰하기 힘들었다. 또한 우태아 혈청이나 토끼 혈청을 이용하면 2시간째의 결과를 관독하는 것이 가장 관찰하기 좋은 상태를 보였고, 사람

혈청을 이용하는 경우에도 발아관 형성 여부를 판단하기에는 2시간째의 결과만으로도 충분하여, 우태아 혈청이나 토끼 혈청 사용시에는 2시간, HPS 사용시에는 3시간 이내에 관찰하는 것이 좋겠다.

세균이 *C. albicans*의 발아관 형성에 미치는 영향에 대해서는 구강내 세균에 대한 연구에서 *E. coli* 등 발아관 형성을 억제하는 일부 세균이 언급된 바 있는데⁹, 본 연구에서는 *P. aeruginosa*와 *E. faecalis*만이 억제 효과를 보였다. 이는 알려진 바와 같이 *P. aeruginosa*의 2차 대사산물 (pyro-nitricin)이 *Candida*를 억제하는 요소로 작용하여 균사형성을 방해하는 것과 관련된 것으로 생각되며¹⁰, *E. faecalis*는 고농도에서는 약간의 억제를 보였고, *E. coli*는 다른 보고와는 달리 억제를 보이지 않았는데, 세균과 *Candida* 농도간의 상관관계에서 나타나는 차이로 생각된다. 기존 보고에서도 10⁷ CFU/mL 이상의 고농도에서 억제되었다고 하였다^{9,10}. 오히려 인체 감염에서는 고농도의 균혈증을 관찰하기 어렵기 때문에 낮은 농도에서도 억제를 일으키는 경우가 더 의미있다고 하겠다. 따라서 *P. aeruginosa*가 *Candida*와 혼합 배양될 때는 결과에 영향을 줄 수 있다는 사실을 주지하고 발아관 검사를 위해서는 반드시 독립된 집락을 채취해 검사를 시행하도록 한다.

결 론

본 실험 결과를 종합할 때 우태아 혈청이나 토끼 혈청을 사용할 때 빠른 발아관 검사 결과를 얻을 수 있기는 하지만, *C. dubliniensis*가 *C. albicans*로 잘못 동정되는 것을 방지하기 위해서는 다음과 같은 방법을 추천한다. 간염 바이러스가 없는 정상인의 신선한 혈청을 얻은 당일 검사에 이용하며, 세균이 포함되지 않도록 독립된 집락을 채취하여, 배양 후 2~3시간 내에 발아관 형성을 관찰하도록 한다.

참 고 문 헌

1. Pincus DH, Orenge S, Chatellier S. Yeast identification -past, present, and future methods. *Med Mycol* 2007; 45: 97-121
2. Winn CW, Allen DS, Janda MW, et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 1216-1226
3. Isenberg DH. Clinical microbiology procedure handbook. 2nd ed. Washington: ASM, 2004: 8.6.1-4
4. Lee SH, Park SH, Park JS, Kim MN, Pai JH. Comparison of Murex *Candida albicans* CA50 with the germ tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. *Korean J Clin Pathol* 2000; 20: 76-80
5. Baron EJ, Cox M, Heyliger M, et al. Abbreviated identification of bacteria and yeast; proposed guideline. NCCLS document M35-P 2000; 20(4): 26
6. Munin E, Giroldo LM, Alves LP, Costa MS. Study of germ tube formation by *Candida albicans* after photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Photochem Photobiol B* 2007; 88: 16-20
7. Cardenes CD, Carrillo AJ, Arias A, et al. Comparison of *Albicans* ID2[®] agar plate with the germ tube for presumptive identification of *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 181-185
8. Gutierrez J, Morales P, Gonzalez A, Quindos G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol* 2002; 42: 207-227
9. Nair RG, Anil S, Samaranayake LP. The effect of oral bacteria on *Candida albicans* germ-tube formation. *APMIS* 2001; 109: 147-154
10. Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol* 2006; 51: 672-680