국내 호흡기 검체에서 *Candida dubliniensis*의 검색

중앙대학교 의과대학 비뇨기과학교실, 소아과학교실[1], 진단검사의학교실[2],
관동대학교 명지병원 피부과[3]

김태형 · 윤신원[1] · 이미경[2] · 노병인[3]

= Abstract =

Screening of *Candida dubliniensis* from Respiratory Samples in Korea

Tae-Hyoung Kim, Sin Weon Yun[1], Mi-Kyung Lee[2] and Byung In Ro[3]

Departments Urology, Pediatrics[1] and Laboratory Medicine[2], Chung-Ang University College of Medicine, Seoul; Department of Dermatology[3], Myongji Hospital, Kwandong University College of Medicine, Koyang, Korea

Background: *Candida dubliniensis* is newly described yeast that is a close phylogenetic relative of *C. albicans* and isolates mainly from the oral cavity. Objective: The aim of the present study was to screen for *C. dubliniensis* using the 'spiking' appearance on a blood agar plate (BAP), germ tube test with human pooled serum (HPS) and fetal bovine serum (FBS) and to investigate the prevalence of *C. dubliniensis* from respiratory samples in Korea.

Methods: A total 434 isolates of *Candida* spp. were examined for the presence of 'spiking' on BAP and the germ tube test with HPS and FBS. Also all isolates were tested using the VITEK 2 ID-YST system.

Results: No *C. dubliniensis* was found in the study population. *C. albicans* was the most frequently isolated species (74.9%).

Conclusions: No *C. dubliniensis* was identified in our study. Further large-scale studies are needed to isolate and to confirm the prevalence of *C. dubliniensis*. **[Kor J Med Mycol 2009; 14(4): 171-176]**

Key Words: *Candida dubliniensis*, Prevalence, Respiratory sample

서 론

사람에서 발생하는 진균감염의 가장 흔한 원인균인 *Candida* spp.는 대부분 면역기능이 저하된 환자에서 발생하는 기회 감염균이며, 구강이나 질에 발생하는 표재감염에서부터 혈류에서 발생하는 전신감염에 이르기까지 다양하게 나타난다. 현재 *Candida* 속에는 약 200여종이 있으며, 사람에서 감염을 일으키는 종은 10여 가지가 있다[1]. 이중 가장 중요하고 흔한 병원균은 *C. albicans*이지만, 그 밖에도 *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* 등도 사람에서 감염을 일으키는 중요한 병원균으로 간주되고 있다. 1995년에 재발성 구강염을 가진 human immunodeficiency virus (HIV) 감염 환자의 구강에서 처음으로 분리되어 새로운 종으로 명명된 *C. dubliniensis*도 다양한 검체에서 분리되면서 새로운 병원균으로 보고되고 있다[2,3].

†별책 요청 저자: 이미경, 140-757 서울시 용산구 한강로 3가 65-207, 중앙대학교 용산병원 진단검사의학과
전화: (02) 748-9837, Fax: (02) 797-3471
e-mail: cpworld@cau.ac.kr

*이 논문은 일부 대한의진균학회 2007년도 학술연구비 지원에 의한 것임.

*C. dubliniensis*는 *C. albicans*와 표현형적 성상이 매우 유사하여 대부분 *C. albicans*로 동정되었으며, *C. albicans*로 동정되어 보관된 균주를 다시 검사하여 확인한 결과 최소한 1.2~2%의 *C. albicans*가 *C. dubliniensis*로 동정되었다는 보고도 있었다[4]. *C. dubliniensis*의 분리 빈도를 확인하기 위한 여러 연구에서 지역, 분리대상 및 연구자에 따라 매우 다양하게 보고되고 있으나[5], 아직까지 국내에서 *C. dubliniensis*의 분리나 빈도에 관한 보고는 없는 실정이다.

*C. dubliniensis*의 발아관 (germ tube) 형성, 비후막홀씨 (chlamydospore) 형성, 37℃에서의 성장 등은 *C. albicans*와 같은 성상이며, 42℃ 또는 45℃, 6.5% NaCl 및 xylose 또는 lactate에서 자라지 않는 점 등은 *C. albicans*와 다른 성상으로 알려져 있다[5,6]. 이러한 *C. albicans*와의 표현형적 특성 차이를 이용한 *C. dubliniensis* 감별이 많이 시도되고 있지만, 계대배양이나 보관 등에 의해 이들 표현형적 성상이 변하기도 하고 일반 검사실에서 일상적으로 사용하지 않는 배지를 사용하는 번거로움이 있다. 자동화 장비를 이용한 동정은 최근에 *C. dubliniensis* 동정을 위한 자료들이 입력되어 대부분 동정이 가능하며, 특히 ATB IB 32C와 VITEK 2ID-YST card가 매우 우수한 동정결과를 보여주고 있다[5,6]. 그러나 구강이나 피부 등 인체의 많은 부위에서 집락 형성을 하고 있는 *Candida* spp.를 모두 자동화 장비를 이용한 동정을 시도하기에는 비경제적이어서 국내에서의 *C. dubliniensis*의 정확한 빈도 확인이 이루어지지 않은 실정이다.

이에 본 연구에서는 국내에서의 *C. dubliniensis* 분리와 빈도를 확인하고자 호흡기 검체에서 분리되는 *Candida* 균주를 대상으로 *C. dubliniensis* 검색과 동정을 시도하였다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

2007년 11월부터 2008년 6월까지 중앙대학교 용산병원을 내원한 환자의 호흡기 검체 (객담, 인후 면봉 및 호흡기 흡인 말단 검체)에서 1개 이상의 집락을 보인 효모양 진균 434균주와 2종류의 표준 균주 (*C. albican*s ATCC 18804, *C. albicans* ATCC 14053, *C. dubliniensis* ATCC MYA-646, *C. dubliniensis* KCTC-17427) 4균주를 대상으로 하였다.

2. 방법

일반 세균배양 검사가 의뢰되어 혈액한천배지에 일차 접종된 검체를 35℃, 5% CO_2 배양기에서 하룻밤 배양한 후 집락 판독 시 관찰되는 효모양 진균의 'spiking' 모양을 확인하였다. 발아관 시험은 집락을 Sabouraud dextrose agar (SDA)에 계대배양하여 사람 혼주 혈청 (human pooled serum, HPS)과 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS) (Fetal bovine serum certified, GIBCO, Invitrogen, USA)을 사용하여 발아관 형성을 확인하였다. 이때 HPS는 당일 제조한 신선한 혈청을 사용하였으며, FBS은 소량씩 분주하여 -70˚C에 냉동 보관하면서 일주일간 검사에 필요한 양을 완전 해동하여 냉장 보관하면서 사용하였다.

정확한 *Candida* 균종 동정을 위하여 VITEK 2 ID-YST system (bioMerieux Inc. Hazelwood, MO, USA)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 균종 동정을 시행하였다.

2균종의 표준 균주 4균주도 동일한 방법으로 검사하였다.

결 과

2007년 11월부터 2008년 6월까지 중앙대학교 용산병원을 내원한 환자의 호흡기 검체 (객담, 인후 면봉 및 호흡기 흡인 말단 검체)에서 분리된 효모양 진균 434균주는 *C. albicans* 325균주, *C. tropicalis* 53균주, *C. glabrata* 39균주, *C. parapsilosis* 11균주, *C. lusitaniae* 4균주, *C. krusei*와 *C. sphaerica*가 각각 1균주로 최종 동정되었으며, *C. dubliniensis*는 분리되지 않았다 (Table 1). 본

연구에 사용된 효모양 진균이 분리된 환자에서 HIV 감염은 없었다.

혈액한천배지에서 'spiking' 모양을 보이면서 HPS와 FBS에서도 발아관 형성이 관찰된 279균주는 모두 *C. albicans*로 최종 동정되었다. 반대로 혈액한천배지에서 'spiking' 모양을 보이지 않으면서 HPS와 FBS에서도 발아관 형성이 관찰되지 않은 110균주는 *C. tropicalis* 52균주, *C. glabrata* 39균주, *C. parapsilosis* 11균주, *C. lusitaniae* 4균주, *C. albicans* 2균주, *C. krusei*와 *C. sphaerica*가 각각 1균주로 동정되었다. 혈액한천배지에서 'spiking' 모양과 HPS에서 발아관 형성이 관찰되지 않으면서 FBS에서만 발아관 형성이 관찰되어 *C. dubliniensis*로 의심되었던(7, 8) 2균주는 *C. albicans*와 *C. tropicalis*로 최종 동정되었다. 또한 혈액한천배지에서 'spiking' 모양을 보이지 않았으나, HPS와 FBS에서 발아관 형성이 관찰되었던 42균주는 모두 *C. albicans*로 최종 동정되었으며, 반대로 HPS와 FBS에서는 발아관 형성이 관찰되지 않았으나 혈액한천배지에서 'spiking' 모양을 보였던 1균주도 *C. albicans*로 최종 동정되었다 (Table 2).

Table 1. Distribution of the *Candida* clinical isolates

Candida Species	No. of Isolates	%
C. albicans	325	74.9
C. tropicalis	53	12.2
C. glabrata	39	9.0
C. parapsilosis	11	2.5
C. lusitaniae	4	0.9
C. krusei	1	0.2
C. sphaerica	1	0.2
Total	434	100

고 찰

재발성 구강염을 가진 HIV 감염 환자의 구강

Table 2. Identification results for 434 *Candida* clinical isolates and 4 type strains

No. of Yeasts	Spike on BAP	Germ Tube		Identification Results (No.)
		HPS	FBS	
279	+	+	+	*C. albicans* (279)
42	−	+	+	*C. albicans* (42)
2	−	−	+	*C. albicans* (1)
				C. tropicalis (1)
1	+	−	−	*C. albicans* (1)
110	−	−	−	*C. tropicalis* (52)
				C. glabrata (39)
				C. parapsilosis (11)
				C. lusitaniae (4)
				C. albicans (2)
				C. krusei (1)
				C. sphaerica (1)
2(TS)	+	+	+	*C. albicans* (2)
2(TS)	−	−	+	*C. dubliniensis* (2)

Abbreviation: BAP, blood agar plate; HPS, human pooled serum; FBS, fetal bovine serum; TS, Type strain

에서 처음으로 분리되어 보고된 *C. dubliniensis*는[2] 지금까지 주로 HIV 감염 환자의 구강 내 칸디다증과 관련하여 보고되었으며, 그 빈도는 1.5%에서 32%에 이르기까지 매우 다양하다[6]. 또한 *C. dubliniensis*의 빈도에 관한 보고는 대부분 발아관 형성에 근거하여 *C. albicans*로 동정되어 보관 중이던 일부 균주를 대상으로 후향적 재동정에 의한 연구가 많았다[5,6,9].

최근에는 *C. dubliniensis*가 HIV 감염이 없는 사람에서 발생하는 침습적 감염의 원인균으로 보고되고 있다[10,11]. 또한 당뇨, 치은염, 의치와 관련된 구내염 및 건강인의 구인두 검체에서 0~4.4%의 빈도로 보고되어 HIV 감염 환자의 분리 빈도에 비하여 매우 낮게 조사되었으며, 특히 건강인에서의 *C. dubliniensis* 분리 빈도는 더욱 낮았다[12~14]. 이렇듯 현재까지 *C. dubliniensis*의 분리 빈도가 매우 다양하게 보고되고 있는 것은 첫째, *C. dubliniensis*의 분리를 시도한 대상군이 각기 다르고, 둘째, 검체 채취 방법의 차이, 셋째, 인종간 또는 민족간 차이, 마지막으로 균종 동정에 사용한 동정 방법의 차이 등의 이유로 생각해 볼 수 있다[5,6,15].

본 연구에서는 전향적으로 국내 호흡기 검체에서 *C. dubliniensis*의 분리 빈도를 조사하기 위하여 HIV에 감염되지 않은 환자의 호흡기 검체에서 1집락 이상을 보인 434균주의 *Candida* 균주를 대상으로 균종 동정을 시행하였으나, *C. dubliniensis*가 1균주도 분리되지 않아 국내 *C. dubliniensis*의 분리 빈도는 최소한 0.23% 이하일 것으로 추정할 수 있었다. 또한 본 연구의 호흡기 검체에서 분리된 *Candida* 균종 분포는 *C. albicans* 74.9% (325/434), *C. tropicalis* 12.2% (53/434), *C. glabrata* 9.0% (39/434), *C. parapsilosis* 2.5% (11/434)의 순서로 많이 분리되어, 국내 *Candida* 균종 분포와 유사하였다[16]. 본 연구에서 *C. sphaerica* (*Kluyveromyces lactis*) 1균주가 VITEK 2 ID-YST system으로 동정되었는데, 이 균종은 치즈나 우유 제품에서 흔히 분리되는 효모균으로 표현형적 특성만으로는 *C. kefyr*과 감별이 어렵다고 알려져 있으며 최근 매우 드물지만 인체감염을 일으킬 수 있는 병원균으로 보고되고 있어[17], 추후 *C. kefyr*과 감별할 수 있는 분자유전학적 동정을 시도할 필요가 있다고 생각되었다.

본 연구에서는 임상 검체에서 *C. dubliniensis* 분리를 위한 간편한 검색 방법으로 혈액한천배지에서의 'spiking' 모양, HPS와 FBS에서 발아관 형성을 시도하였다. 이전 연구에서 *C. albicans*는 혈액한천배지에서 'spiking' 모양을 보이면서 HPS와 FBS에서도 발아관 형성이 관찰된 반면 *C. dubliniensis*는 혈액한천배지에서의 'spiking' 모양과 HPS에서의 발아관 형성을 보이지 않으면서 FBS에서만 발아관 형성이 관찰되었다[7,8]. 그러나 본 연구에 포함된 균주 중 혈액한천배지에서 'spiking' 모양과 HPS에서 발아관 형성이 관찰되지 않으면서 FBS에서만 발아관 형성이 관찰되어 *C. dubliniensis*로 의심되었던 2균주는 *C. albicans*와 *C. tropicalis*로 최종 동정되어, 임상 균주에서 *C. dubliniensis* 분리를 위한 검색 방법의 유용성을 확인할 수는 없었다. 한편 HPS와 FBS에서의 발아관 형성 유무와 상관없이 혈액한천배지에서의 'spiking' 모양을 보인 280균주는 모두 *C. albicans*로 최종 동정되어 *C. albicans*의 추정 동정을 위한 방법으로서의 'spiking' 모양 확인의 특이도는 이전 보고와 동일하게 100%였다[8].

*C. albicans*와 *C. dubliniensis*의 감별 동정은 크게 표현형적 특성과 유전형적 특성을 이용한 방법으로 나누어 볼 수 있다. 표현형적 특성에 의한 감별 동정은 발색배지를 사용하는 방법, 비후막홀씨 생산 확인, 6.5% NaCl을 함유한 배지에서의 성장 확인, 42℃ 또는 45℃에서의 성장 확인, 상품화된 동정 키트 사용, 혈청학적 특성을 이용한 라텍스 응집 시험, 단백질 지문법 (protein fingerprinting) 및 분광법을 이용한 효모균 전체의 지문법 등이 있다[5,6]. 유전형적 특성을 이용한 감별법으로는 임의 시발체 (random primer) 또는 특이 시발체를 이용한 중합효소연쇄반응, 제한절편길이다형성 (restriction fragment length

polymorphism), 유전자 염기순서 분석 등의 방법이 있다[5,6]. 그러나 이상의 방법들은 표현형적 성상이 변하기도 하여 *C. dubliniensis* 검색 시 특이도가 낮거나, 일반 검사실에서 일상적으로 사용하지 않는 배지를 시용하여야 번거로움이 있거나 또는 검색으로 사용하기에는 비용이 많이 드는 문제가 있다. 그러므로 아직까지 일반 병원 미생물 검사실에서 발아관 형성에 근거하여 동정된 *C. albicans*로부터 간편하고 신속하며 경제적인 일상 검사로 *C. dubliniensis*를 감별하기는 어려운 실정이다. 그러므로 추후 더 많은 균주를 대상으로 *Candida* 균종 동정을 시행하여 국내에서의 *C. dubliniensis* 분리를 시도하고, 나아가 본 연구에서 시도된 간편한 검색 방법의 유용성을 확인함으로써 국내에서의 정확한 *C. dubliniensis* 분리 빈도를 확인하는데 사용할 수 있는 검색법의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

1995년에 HIV 감염 환자의 구강에서 처음으로 분리된 *C. dubliniensis*는 많은 나라의 다양한 검체에서 분리되면서 새로운 병원균으로 보고되고 있지만, 아직까지 *C. dubliniensis* 국내 분리나 정확한 분리 빈도에 관한 보고가 없어 국내에서의 *C. dubliniensis* 분리와 빈도를 확인하고자 호흡기 검체에서 분리되는 *Candida* 균주를 대상으로 균종 동정을 시도하였다. 그러나 434균주의 *Candida* 균주에서 *C. dubliniensis*가 1균주도 분리되지 않아 국내 *C. dubliniensis*의 분리 빈도는 최소한 0.23% 이하로 매우 낮을 것으로 추정되었으며, 추가 연구를 통하여 더 많은 균주에서의 *C. dubliniensis* 분리를 시도하고 *C. albicans*와 *C. dubliniensis*를 구별할 수 있는 간편한 검색 방법의 개발이 필요할 것으로 생각되었다.

REFERENCES

1. Odds FC, Gow NAR, Brown JP. Toward a molecular understanding of *Candida albicans* virulence. In: Heitman J, Filler SG, Edwards JE Jr, Mitchell AP. (1st ed) Molecular Principles of Fungal Pathogenesis. Washington, DC, ASM Press. 2006: 305-319
2. Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haybes KA, et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotype and molecular characterization of a novel species associated with oral candidiasis in HIV-infected individuals. Microbiology 1995; 141: 1507-1521
3. Brandt ME, Harrison LH, Pass M, et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. Emerg Infect Dis 2000; 6: 46-9
4. Odd FC, van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in yeast stock collection. J Clin Microbiol 1998; 35: 2869-2873
5. Ells R, Kock LF, Pohl CH. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? Mycoses 2009; In press
6. Sullivan DJ, Moran GP, Coleman DC. *Candida dubliniensis*: Ten years on. FEMS Microbiol Lett 2005; 253: 9-17
7. Park BG, Lee MK. Appopriate condition of Germ tube formation as presumptive identification test for *Candida albicans*. Korean J Med Mycol 2008; 13: 20-25
8. Lee MK, Park BG. Rapid identification of *Candida albicans* by 'Spiking' on blood and chocolate agar plates. Korean J Clin Microbiol 2007; 10: 150-153
9. Odds FC, Van Nuffel L, Dams G. Prevalence of *Candida dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. J Clin Microbiol 1998; 36: 2869-2873
10. Tekeli A, Akan OA, Koyuncu E, Dolapci I, Uysal S. Initial *Candida dubliniensis* isolate in *Candida* spp. positive haemocultures in Turkey between 2001 and 2004. Mycoses 2006; 49: 60-64
11. Tran C, Cometta A, Letovanec I, et al. *Candida dubliniensis* in recurrent polymicrobial tricuspid endocarditis Echocardiography 2007; 24: 756-759
12. Tekeli A, Dolapci I, Emral R, Cesur S. *Candida* carriage and *Candida dubliniensis* in oropharyngeal samples of type-1 diabetes mellitus patients. Mycoses 2004; 47: 315-318

13. Jewtuchowicz VM, Mujica MT, Brusca MI, et al. Phenotypic and genotypic identification of *Candida dubliniensis* from subgingival sites in immuno-competent subjects in Argentina. Oral Microbiol Immunol 2008; 23: 505-509
14. Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. Arch Oral Biol 2009; 54: 127-131
15. McCullough MJ, Jorge JJ, Lejbkowicz F, et al. Genotypic differences of *Candida albicans* and *C. dubliniensis* isolates related to ethnic/racial differences within the same geographic area. Mycopathologia 2004; 158: 39-41
16. Shin JH, Kim HR, Lee JN. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from clinical specimens during the past six years. Korean J Clin Microbiol 2004; 7: 164-170
17. Gomez-Lopez A, Pan D, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Molecular identification and susceptibility profile in vitro of the emerging pathogen *Candida kefyr*. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; In press