

대한의진균학의 제 1 차 Workshop 진행계획표

시 간	내 용
12 : 30 - 13 : 00	등 록
13 : 00 - 13 : 10	개 회 식
13 : 10 - 13 : 30	피부사상균의 소개 연자 : 전 재 복 교수 (경북의대) 좌장 : 김 정 원 교수 (가톨릭의대)
13 : 30 - 14 : 00	진균학적 진단법 I (피부사상균의 배양, 동정 및 특수 검사) 연자 : 김 정 애 교수 (서울의대) 좌장 : 권 경 술 교수 (부산의대)
14 : 00 - 14 : 30	진균학적 진단법 II (피부사상균의 육안 및 현미경 소견) 연자 : 김 기 홍 교수 (영남의대) 좌장 : 조 백 기 교수 (가톨릭의대)
14 : 30 - 14 : 50	Coffee break
14 : 50 - 16 : 10	실습 (시범 20분, 실습 60분) 1조 진균학적 진단법 I 김정애교수, 이현정선생 2조 진균학적 진단법 II 김기홍교수, 방용준선생
16 : 10 - 17 : 30	실습 (시범 20분, 실습 60분) 1조 진균학적 진단법 II 2조 진균학적 진단법 I
14 : 50 - 17 : 30	미확인 균주 동정 서 순봉명예교수(경북의대)
17 : 30 - 17 : 50	Coffee break
17 : 50 - 18 : 50	질의 및 응답 전 재 복 교수, 조 백 기 교수, 김 기 홍 교수, 김 정 애 교수 좌장 : 노 병 인 교수 (중앙의대)
18 : 50 - 19 : 00	폐 회 식
19 : 00 - 20 : 30	간 친 회

Workshop 1

피부사상균의 계통 분류

경북대학교 의과대학 피부과학교실

전 재 복

진균의 분류학적 위치

균류는 종래 하등식물 중 엽상체식물 (葉狀體植物, *Thallophyta*)로 분류되고, 다시 분열균류 (*Schizomycetes*), 변형균류 (점균류) (*Myxomycetes*), 진균류 (*Eumycetes*)의 3문 (門)으로 나뉘었다. 그러나 Whittaker (1969)와 그 후의 Margulis 및 Schwartz (1982)는 생물을 동물과 식물로 이분하는 전통적인 사고방식에서 떠나 우선 원시핵생물 (prokaryote)과 진핵생물 (眞核生物, eukaryote)로 나누고 다시 후자를 세분하여 모든 생물을 5가지의 계 (界, Kingdom)로 분류할 것을 제안하였다 (Table 1).

이때 비로소 균류가 동물계 및 식물계에 대응하는 독립된 계로서 취급되기에 이르렀으며, 그 후 균류의 생물계에 있어서의 위치 정립 및 균류의 분류체계를 확립하기 위해 이설을 채용한 균학자는 Ainsworth이다.

지구상에 균류가 언제부터 서식하게 되었는가는 아무도 모른다. 또 우리에게도 균류가 어떤 선조로부터 언제, 어디에서, 그리고 어떻게 진화되어 왔는가에 대해서도 정확한 지식이 없는 형편이다. 따라서 균류의 분류에는 그 선조와 진화에 대해 각기 상이한 세부사항들이 적용되기 때문에 매우 다양한 체계가 존재할 수밖에 없다. Pier A. Micheli (1929) 이후 많은 연구자들이 균류의 분류를 시도해 왔는데 Tulasne (1861), Gulliermond (1913), Gawmann (1923), Gwynne-Vaughan과 Barnes (1937), Bessey (1950), Smith (1955), Hawker (1966), Stevenson (1970) 등이 대표적인 사람들이다.

현재 가장 보편적인 목적에 적합한 분류 체계는 Dictionary of Fungi (1971)와 The Fungi: An

Table 1. 생물의 분류

Monera 모네라계 - 원시핵생물 (Prokaryotes) - 세균, 방선균, 청녹조류.
Protoctista 원생생물계 - 진핵생물 (Eukaryote) - protozoa와 기타 단세포성 및 유핵성 조류, 편모성 water molds, slime molds 그리고 slime nets와 같은 집락성 생물.
Fungi 균계 - 진핵생물 (Eukaryote) - 편모가 없으며, 포자에서 발생하는 것: 효모균, 사상균 (mold), 녹균 (綠菌), 버섯 등.
Plantae 식물계 - 진핵생물 (Eukaryote) - 배아 (embryo)로부터 발생하는 생물: 녹조, 운조, 선태식물, 도관식물 (導管植物, vascular plants) 등.
Animalia 동물계 - 진핵생물 (Eukaryotes) - blastula (세포로 구성된, 속빈 구형)로부터 발생하는 생물: 강장동물 (腔腸動物), 연체동물, 절족동물, 척색동물 등.

Advanced Treatise (Ainsworth, 1973)에 소개된 Ainsworth (1966)의 것으로 균류의 자연 분류학적인 상호관계를 잘 반영하고 있다. 이 체계에서는 변형체 (plasmodia) 혹은 위변형체 (pseudoplasmodia)를 형성하는 균류는 Myxomycota 문으로 분류되는 반면 이들 구조를 형성하지 않으며 통상적 사상의 균류는 Eumycota 문으로 통합하였다 (Table 2).

균계에 속한 균들은 효모형, 균사형 혹은 그 양자의 형태를 취한다. 그외의 특징으로서는 ① 영양은 유기물을 그대로 혹은 균외 효소로 분해하고 세포벽에서 직접 흡수한다. ② 복수 (複數)의 진핵 (眞核)을 가진다. ③ L- α -adipic acid pathway에 의한 리신 생합성을 행한다. ④ 세포벽은 glucan, β -glucan, mannan, chitin 등으로 구성된다. ⑤ 세포막은 엘고스테롤을 주성분으로 한다. ⑥ 미토콘드리아, 80 S 리보솜, 중심소체를 가진다. ⑦ 생식은 무성 혹은 유성적으로 행해지고, 무성생식은 단상 (單相)의 포자에 의하며, 유성생식은 접합 혹은 융합에 의한다.

진균분류의 대계

생물의 분류시 계통발생 (phylogeny)을 반영하며 종류간의 균연관계에 의거한 자연분류 (natural classification)에 의해서 분류하는 것을 목표로 하고 있는데 진균의 분류학적 위치와 마찬가지로 진균의 분류도 자연분류의 원칙에 따라서 수정이 가해지고 있다.

유성 (완전)세대 [sexual (perfect) state], 무성 (불완전, 분생자)세대 [asexual (imperfect/conidial) state]에 대신하여 Hennerbert와 Weresub가 제창한 teleomorph (유성생식형태), anamorph (무성 또는 체세포 생식형태), 그리고 holomorph (全菌形態)라는 용어가 널리 인정되고 있다.

1) 편모균아문 (Mastigomycotina)

세 개의 강 (綱)으로 구성된다. 편모 (flagellum)를 가지고 헤엄치는 운동성 포자 즉 유주자 (遊走子, Zoospore)를 형성하고, 대체로 생활환의 어느단계에 수중생활이 필요한 모든 진균이 포함된다. 그러나 이 아문은 '자연적' 분류군은 아니며, 보다 더 자연적인 주된 2개의 강을 든다면 호상균강 (壺狀菌綱, Class Chytridiomycetes)과 난균강 (卵菌綱, Class Oomycetes)이 있다. 양자는 여러 양상 가운데서도 포자상의 편모의 수효 및 세포벽의 성분면에서 서로 틀린다. 즉 난균강의 진균은 그 세포벽이 chitin이 아니고 셀룰로즈 또는 셀룰로즈양 중합체인 점이 보통 진균과 상이한 점이다. 또 난균류는 기타 주요진균 부류에 비해 독특한 발생학적 기원을 반영

Table 2. 균계 (菌界)의 분류

균계 (균류) Kingdom Fungi	
I. 변형균문 (변형균류, 점균류) Myxomycota	
II. 진균문(진균류, 진정균류) Eumycota	
1. 편모균아문 (편모균류) Mastigomycotina	
2. 접합균아문 (접합균류) Zygomycotina	
3. 자낭균아문 (자낭균류) Ascomycotina	
4. 담자균아문 (담자균류) Basidiomycotina	
5. 불완전균아문 (불완전균아문) Deuteromycotina	

하는 것으로 생각되는 여러 가지 근본적인 특성을 가지고 있다.

2) 접합균아문 (Zygomycotina)

두개의 강으로 구성된다. 영양체는 주로 균사이고 보통 무격벽성이다. 포자낭 (Sporangium) 속에 형성된 비후성 포자에 의한 무성생식과 균사의 유성분지, 접합지 (zygophore)상에 배우자낭을 형성하고 그것이 접합하여 핵융합을 일으키고 후막 (厚膜) 혹은 휴면기의 접합포자를 만드는 유성생식을 행한다. 털곰팡이 *Mucor spp.* 등과 같이 토양 등 여러 환경에 널리 분포한다. 접합균증 (Zygomycosis)은 주로 숙주의 면역능의 저하에 편승하여 일어나고, 다수는 혈행성으로 많은 장기를 침습한다. 드물게 피부, 조갑에 국한된 감염도 보인다. 원인균은 *Mucor* 목 (mucorales) 중의 5개 과 (科) 즉 *Cunninghamellaceae*, *Mortierellaceae*, *Mucoraceae*, *Saksenaceae*, *Syncephalastraceae*에 포함된다. 열대, 아열대지방에 많은 피하 접합균증 (subcutaneous zygomycosis)의 원인균은 *Basidiobolus haptosporus*와 *Conidiobolus coronatus*의 2종이 알려져 있다.

3) 자낭균아문 (Ascomycotina)

여섯 개 강, 3 만종 가까이에 이르는 최대의 무리를 이룬다. 영양체는 유격벽성 균사 (septate hyphae) 혹은 단세포성이다. 무성생식은 분아 (budding), 분열 (fission), 분생자병 (分生子柄, conidiophore)상에서의 분생자 (conidium)형성 등 다양하다. 유성생식은 분생자와 조낭기 (造囊器, ascogonium), 균사간, 효모세포간의 융합에 의해 시작된다.

양쪽 다 자낭 (子囊, ascus)이 형성되고 자낭과 (子囊果, ascocarp)가 복수의 자낭을 둘러싼다. 개개의 자낭은 감수분열, 다시 유사분열로써 자낭포자 (ascospore)를 형성한다. 6개의 강은 각각 자낭, 자낭과의 구조에 의해 분류되는데 아직도 유동적이다. 자낭균아문의 여러균은 토양, 지상, 수중에 널리 존재한다. *Saccharomyces* 등 공업적으로 중요한 자낭효모, 식물의 잎에 흰가루병을 일으키는 *Microphaera alni* 등 식물병원균, 붉은 빵곰팡이 *Neurospora crassa* 등이 여기에 포함된다. 종래 자낭균아문의 여러균에 의한 인체감염증은 *Piedra hortae*에 의한 흑색사모 (black piedra) 등 한정된 것 밖에 알려져 있지 않았지만, 1960년대 이후 피부사상균 등 불완전균아문으로 분류되어 왔던 균의 유성세대가 연달아 발견되고 자낭균아문으로 분류되는 것이 증가해 왔다. 피부사상균 및 유연균의 경우에 대해서는 후술한다.

4) 담자균아문 (擔子菌亞門, Basidimycotina)

3개의 강으로 이루어진다. 이 중 균담강 (Hymenomycetes), 복균강 (腹菌綱, Gasteromycetes)은 소위 버섯을 형성한다. 영양체는 단상의 유격벽성균사 (일차균사)이다. 균사에는 준형공 격벽 (樽形孔 隔壁, dolipore septum)을 가진 것과 감자연결 (clamp connection)을 형성하는 것도 있다. 고등한 담자균의 대부분은 무성생식을 하지 않는다. 담자균 아강의 일부에는 다양한 포자형이 있다. 유성생식은 일차균사의 융합에 의하여 시작되는데 핵의 융합은 늦고 균사의 내부에 2개의 핵을 가진 이핵성 (dikaryotic)인 이차균사의 상태가 오래 계속된다. 다시 많은 담자기 (擔子器, basidium)를 내포한 복잡한 담자과 (擔子果, basidiocarp)를 형성하고, 최종적으로 그 중에서 개개의 담자기에서 4개의 담자포자 (basidiospore)가 만들어 진다. 담자균아문의 여러균은 거의 육지에 살고 그 다수는 수목에 부생, 기생한다. 여기에는 송이버섯 *Tricholoma matsutake*, 독버섯 *Panaeolus papilionaceus*, 곡물의 검은 곰팡이 병의 원인균 *Puccinia graminis* 등이

있다. 의진균학에서는 버섯중독에 흥미가 집중되고 있으며, 근래 효모균종의 원인균 *Cryptococcus neoformans*가 담자균성 효모인 것이 발견되고 teleomorph로서 *Filobasidiella neoformans*가 알려져 있다.

5) 불완전균아문 (Fungi Imperfecti, Deuteromycotina)

Teleomorph가 알려져 있지 않은 혹은 이것이 없는 진균은 모두 불완전균아문으로 분류된다. 피부사상균과 *Aspergillus*, *Fusarium* 등 teleomorph와 anamorph가 다 같이 알려져 있는 경우는 자낭균 (또는 담자균 등)과 불완전균의 양쪽에 분류학적 위치 매김이 이루어지고 있다. 다만 teleomorph와 anamorph는 반드시 1:1로 대응하지는 않고 복합체 (complex)를 구성하는 것도 있다. 불완전균아문은 그 영양체의 형태에 의하여 *Blastomycetes*, *Hyphomycetes* 및 *Coelomycetes*의 3강으로 분류된다. 이처럼 anamorph에 의한 분류는 계통발생학적 견지에서의 분류와는 입장을 달리하기 때문에 불완전균아문의 분류에는 각각 form을 붙여 form-class, form-genus 등으로 되어있지만 최근에는 anamorph-class, anamorph-genus 등으로 기술된다. 상세한 분류는 분생자를 형성하는 것은 분생자형성법 (conidiogenesis)에 의하고 불완전 효모균강 (*Blastomycetes*)의 균들처럼 형태학적 특징이 적은 것은 생리, 생화학, 혈청학적성상에 의해 행해진다.

불완전균아문의 여러균은 토양, 해수, 담수 등 온갖 환경에 존재한다. Teleomorph가 알려지기 이전에는 의진균학에서 취급되는 진균은 대부분 불완전균으로 생각되고 있었다.

피부사상균 및 유연균에 대한 분류학적 지견

피부사상균은 teleomorph가 알려지기까지는 그 분생자의 형태에 의해 *Epidermophyton*, *Microsporum*, 그리고 *Trichophyton*의 3가지 속으로 분류되어 왔다. 또 이 3속에는 비병원성의 것도 포함되고 피부사상균의 유연균도 있다.

1959년에 *Arthroderma uncinatum*이 토양균 *T. ajelloi*의 teleomorph로 보고된 이래, 주로 동물에 병원성을 나타내는 피부사상균의 teleomorph가 차례로 발견되었다. 처음에는 피부사상균 및 유연균의 teleomorph는 자낭균아문 중에서 나생 (裸生)자낭균과 (*Gymnoascaceae*)로 분류되고 있었는데 Currah의 오니게나 목 (目) (*Onygenales*)의 재편성의 결과 알스로더마과 (科) (*Arthrodermataceae*)로 분류되게 되었다.

피부사상균의 teleomorph - anamorph의 관계는 Table 3에 표시되어 있다.

Microsporum gypsum, *T. mentagrophytes*, *T. terrestre*의 3개의 복합체 (complex)는 유전적으로 다른 teleomorph가 형태학적으로 유사한 복수의 anamorph를 형성한다.

Matsumoto 등은 대분생자가 부정형, 왜곡을 나타내는 *M. distortum*의 여러 생물학적 성상이 *M. canis*에 일치하는 점에 주목하고 *M. canis*의 teleomorph *Arthroderma otae* (*N. otae*)의 " + "주와 *M. distortum* 1주를 교배시켜 자낭포자, 자낭, 자낭과를 형성함을 보고했다. 즉 *M. gypsum*과 같이 하나의 anamorph가 복수의 teleomorph로 구성되어 있는 셈이다. 또 이들은 자낭과벽의 대분생자가 모두 *M. canis*의 대분생자에 일치하는 소견에서 *M. distortum*을 *M. canis*의 변종으로 하고 *M. canis* var. *canis*, *M. canis* var. *distortum*으로 명명 변경했다.

또 종래 *Microsporum*의 teleomorph가 *Nannizia*, *Trichophyton*의 teleomorph가 *Arthroderma*로 되어 왔는데 Weitznarm 등은 이것을 *Arthroderma*로 통일하였다. 그후 田中 (다나카) 등은 미세구

Table 3. 피부사상균의 무성 및 유성세대

무성세대 (Anamorph State)	유성세대 (Teleomorph State)
호인성 피부사상균 (Anthropophilic Dermatophytes)	
<i>Trichophyton</i> <i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes var. interdigitale</i> <i>T. violaceum</i> <i>T. tonsurans</i> <i>T. schoenleinii</i> <i>T. concentricum</i> <i>Microsporum</i> <i>M. ferrugineum</i> <i>M. audouinii</i> <i>Epidermophyton</i> <i>E. floccosum</i>	
호동물성 피부사상균 (Zoophilic Dermatophytes)	
<i>Trichophyton</i> <i>T. mentagrophytes var. mentagrophytes</i> <i>T. verrucosum</i> <i>T. equinum</i> <i>Microsporum</i> <i>M. canis</i> <i>M. nanum</i>	 <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> <i>Arthroderma benhamiae</i> <i>Arthroderma otae</i> <i>Arthroderma obtusa</i>
호토양성 피부사상균 (Geophilic Dermatophytes)	
<i>Trichophyton</i> <i>T. ajelloi</i> <i>T. terrestre</i> <i>T. simii</i> <i>Microsporum</i> <i>M. gypseum</i> <i>M. cookei</i> <i>M. persicolor</i>	 <i>Arthroderma uncinatum</i> <i>Arthroderma quadrifidum</i> <i>Arthroderma lenticulare</i> <i>Arthroderma insingulare</i> <i>Arthroderma simii</i> <i>Arthroderma gypsea</i> <i>Arthroderma incurvata</i> <i>Arthroderma fluva</i> <i>Arthroderma cajetani</i> <i>Arthroderma persicolor</i>

조를 검토한 결과가 *Nannizia* 속을 *Arthroderma* 속으로부터 독립시키는 근거로는 부족하다는 결론을 지었다. 생물학적으로는 이들이 *Arthroderma* 속에 통일하는 것을 방해하는 요소는 없다.

참 고 문 헌

1. 이재동, 정영기, 주우홍. 菌學研究. 개정판. 부산: 세종출판사, 1994
2. Carlile MJ, Watkinson SC. The Fungi. London, New York: Academic Press, 1994
3. Deacon JW. Introduction to Modern Mycology. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications Ltd., 1984
4. 松田哲男, 松本忠彦. 병원성 진균의 분류학. 진균증의 기초와 임상 (일문). Tokyo Tanabe Quarterly 1989; 37: 19-28

Workshop 2

피부사상균의 배양, 동정 및 특수 검사

서울대학교 의과대학 피부과학교실

김 정 애

皮膚絲狀菌이란 사람과 동물의 피부 및 피부부속기 (모발, 조갑)에 표재성 진균 감염증을 일으키는 진균으로서, 그 불완전형은 *Arthrodermataceae* 과(科) 내의 *Trichophyton*, *Microsporum* 및 *Epidermophyton* 속(屬)에 속하며 완전형은 *Arthroderma* 속에 속한다. 또한 피부사상균은 주된 자연적 서식지에 따라 anthropophilic, zoophilic, geophilic의 세가지로 분류되고 있는데 이와는 별도로 피부사상균과 매우 유사하지만 사람과 동물에서의 병원성이 아직 보고되어 있지 않은 'dermatophyte-like geophilic fungi'도 있으므로 때때로 피부사상균과의 감별이 필요하다 (Table 1). 피부사상균의 同定 (identification)은 주로 배양된 colony의 육안적 특징 및 현미경 하에서의 형태적 특징에 의하여 내리고 있으나 때로 여러가지 생리학적 실험이나 완전형과의 교배시험이 필요한 경우가 있고, 드물게는 이러한 여러 가지 방법을 이용하여도 동정이 어려운 경우도 있다. 피부사상균증으로 진단되었거나 의심되고 있는 환자들의 진균배양 검사를 실시할 때에 누구나 생각하게 되는 것은 첫째 피부사상균의 분리, 배양율을 높일 수 있는 방법, 둘째 각종 오염균들로 부터의 오염을 줄일 수 있는 방법, 셋째 피부사상균 이외의 mould 균이나 효모양 진균이 순수 배양되었을 때 이의 의미를 어떻게 하면 좋을 것인가? 하는 문제와 넷째 여러 가지 진균학적 검사가 교과서에 기술되어 있으나 이러한 검사들을 어느 정도까지 또 어떤 우선 순서에 의하여 실시하는 것이 동정에 효과적일까? 하는 점들일 것이다. 연자는 피부사상균의 진균 검사에 있어서 배양율을 높이고 정확한 동정을 내리기 위하여는 진균 검사실에서의 배양과 동정의 과정 이외에 다음과 같은 진균 배양 前, 後의 과정이 모두 중요하다고 생각하며 각 단계의 의미와 주의점은 다음과 같다.

1. 직접 도말검사: 피부사상균증의 정확한 임상적 진단에 도움이 되며 진균이 실제로 존재하고 있는 위치를 선정할 수 있고, 검출된 진균이 병원균으로서의 의미가 있는지의 여부를 판단하는 기준을 제공할 수 있다.
2. 배 양: 진균이 존재할 가능성이 많은 위치에서 무균적 방법으로 검체를 채취하여 정확하게 접종하도록 한다. 배지의 성분에 따라 배양되는 진균의 범위와 배양 소견이 다르므로 검사자의 필요에 따라 이를 확인하여 선택하도록 한다.
3. 육안 동정: 1주일에 2회 정도 육안으로 배양 상태를 검토하여 피부사상균을 오염균으로부터 분리하여 순수 배양시키고 현미경 하에서 관찰하여 동정한다.
4. 특수 검사: 형태적 관찰만으로는 동정이 어려운 경우, 감별을 위하여 꼭 필요한 것으로 생각되는 physiological test들을 선정하여 실시한다. 각 검사의 정확한 실시 방법과 양성 반응의 의미를 파악하여야 한다.
5. 검사 기록 관리: 분리된 진균의 임상적 의미를 정확하게 파악하고 환자로 부터 반복 배양이 필요한 경우에 시기를 놓치지 않고 이를 실시할 수 있도록 하려면 진균 검사실과 피부과

Table 1. A current synopsis of dermatophyte species and ecological classification

Dermatophyte species		
Anthropophilic	Zoophilic	Geophilic
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. stockdaleae</i> *
<i>M. audouinii</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. amazonicum</i> *
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. anamorph of</i> <i>A. cookiellum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. boullardii</i> *
<i>T. gourvilli</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. cookei</i>
<i>T. kanei</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>T. megninii</i>	(two sibling species and variants)	(three sibling species)
<i>T. mentagrophytes</i> (two sibling species and variants)	<i>T. sarsikovii</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. raubitschekii</i>	<i>T. simii</i>	<i>M. praecox</i>
<i>T. rubrum</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. schoenleinii</i>		<i>M. ripariae</i>
<i>T. soudanense</i>		<i>M. vanbreuseghemii</i>
<i>T. tonsurans</i>		<i>T. ajelloi</i> *
<i>T. violaceum</i>		<i>T. flavescens</i> *
<i>T. yaoundei</i>		<i>T. gloriae</i> *
		<i>T. longifusum</i> *
		<i>T. phaseoliforme</i> *
		<i>T. terrestre</i> *
		(three sibling species)
		<i>T. vanbreuseghemii</i>

*Dermatophyte-like fungi; dermatophyte-like geophilic fungi that have not been known to cause infection in man or animal

사이에 긴밀한 정보 교환이 필요하다. 이는 특히 드물게 분리되는 진균이 순수하게 배양된 경우에 특히 중요하다고 하겠다. 또한 환자의 주요 임상 data 및 동정 결과는 'Microsoft access' 등의 자료 관리 프로그램을 이용하여 체계적으로 관리, 보존하도록 한다.

6. 진균의 보존: 동정된 진균은 보존을 하여 기존에 내린 동정의 정확도를 검증할 수 있는 자료로 삼아야 한다. 또한 분리, 동정된 균주들은 임상적 back ground를 알 수 있는 소중한 연구 재료로 이용될 수 있도록 하여야 한다.

I. 직접도말검사 (Direct examination of skin, nails, and hair)

피부과 외래에서 가장 손쉽게 또 가장 흔히 실시하는 검사로서 피부, 모발, 조갑의 표재성 진균 감염증을 신속하게 진단하는데 큰 도움이 될 뿐 아니라 진균배양 검사의 의미를 결정짓는 데도 도움이 된다. 예를 들어 배양 검사로 칸디다가 배양되었다고 하더라도 칸디다는 정상적인 피부와 점막에 부생적으로 있을 수 있기 때문에 직접도말 검사에서 그에 합당한 소견, 즉 균사나 위성균사가 검출된 경우에만 원인균이라고 할 수 있을 것이다.

1. 검체의 채취 방법

성공적인 진균 검사를 위하여는 진균이 나올 가능성이 가장 큰 곳을 선정하는 것이 매우 중요하다. 선택된 부위는 70% 알콜로 소독한 후 마르면 검체를 채취한다. 70% 알콜은 소독과 동시에 환부조직을 부드럽게 하고 재료 채취시 검체의 이탈을 방지한다. 한편 70% 알콜에 의하여 진균도 死滅이 될 수 있다는 의견도 있으므로 이에 대하여는 추후 연구가 필요하다고 하겠다. 環狀의 병변을 특징으로 하는 체부백선이나 완선, 안면백선에서는 정상 피부와의 병변의 경계 바로 안쪽의 (just behind the extending margin) 구진이나 소수포 및 인설 부위를 선택한다. 소수포에서는 수포를 터뜨린 후 수포의 상부 (roof)를 긁어서 재료를 채취한다. 두부백선의 경우는 Wood 등 하에서 두부를 비추어보면 병든 모발이 형광을 발하게 되는데 이를 선택하여 검사를 한다. 경우에 따라서는 두부백선이라도 형광을 나타내지 않는 경우가 있는데 이럴 경우 거즈에 알콜이나 물을 묻혀 젖게한 후 병변 부위를 문지르면 病毛는 쉽게 부스러지므로 이 부위를 검사하면 양성율을 높일 수 있다. 병모는 절단하지 말고 반드시 뽑아서 검사하도록 하며, black dot형의 두부백선인 경우는 피부에서와 마찬가지로 scarpel로 긁어서 검사한다. 조갑진균증의 경우는 임상형에 따라 검체 채취방법이 다르다. 원위부 조갑진균증 (distal subungual onychomycosis)인 경우는 말단부의 조갑을 손톱깎이나 nail nipper로 되도록 많이 제거한 후 nail bed와 nail plate사이의 쉽게 부스러지는 부위를 scraping한다. 근위부 조갑진균증 (proximal subungual onychomycosis)인 경우는 조갑 변색부의 근위부를 피부조직생검 시 사용하는 2~3 mm punch를 이용하여 조갑판을 제거 후 scarpel이나 niddle 등으로 살살 긁어낸다. 표재성 백색 조갑진균증 (white superficial onychomycosis)의 경우는 변색부위를 scarpel로 저며 내듯이하여 가장 바깥 부분은 버리고 되도록 속에서 긁어내어서 채취한다. 이외에도 조갑진균증의 경우는 여러 연구자들에 의한 다양한 검체 채취방법이 고안, 보고되고 있다 (천자기구의 이용, 치과용 drill의 이용, file의 이용 등).

♣ 참고: 우드 등 (Wood's lamp) 검사

우드등은 nickel oxide를 통하여 여과된 365nm의 장파 자외선을 방출하는 등이다. 이를 모발에 조사하면 병모에 있는 진균 생성물질 (pteridine)이 자외선을 흡수하고 가시광선을 방출하므로 형광이 관찰된다. 균종에 따라서 형광 물질을 생산하는 진균과 생산하지 않는 진균이 있는데 암실에서 환부에 비추어 보면 *M. ferrugineum*, *M. canis*, *M. audouinii*, *M. distortum*, *M. gypseum*, *T. schönleinii*, *T. violaceum*에 의하여 감염된 모발에서는 선명한 황녹색의 형광을 관찰할 수 있다. 또한 우드 등은 전풍 환자의 병변에서도 황색의 형광을 발산하므로 많이 이용된다.

2. 직접도말 표본의 제작

피부사상균증을 진단하기 위한 직접도말검사에 흔히 사용하는 시약으로는 10~20% KOH 용액, KOH-DMSO 용액, KOH-Parker ink 용액이 있다.

1) KOH (NaOH) 직접 도말검사

KOH (또는 NaOH)	10-20 g
Water	100 ml

KOH (NaOH)	20 g
Glycerol	20 ml
Water	80 ml

(1) 사용 목적

임상 검체에서 진균 성분을 관찰하기 위하여 각질이나 기타 성분을 제거한다(clearing).

(2) 검사 방법

① 유리 슬라이드 위에 적당량의 피부 검체를 놓고 시약을 1~2방울 떨어뜨린 후 cover glass로 덮는다 (또는 cover glass를 이용하여 흩어진 검체를 중앙에 모아준 후 덮고, cover glass 옆에 시약을 떨어뜨려 모세관 현상에 의하여 스며들게 한다).

② 실온에서 1~2시간 방치하거나 알콜 램프위에서 끓지 않을 정도로 가열한다.

③ 각질을 녹인 후 남아 있는 시약을 종이를 이용하여 제거 후 면봉 끝으로 가볍게 압박하여 균질의 얇은 液狀膜으로 넓힌 후 검경한다.

④ 주의점: 알콜 램프에서 급히 가열하여 끓이면 수분이 증발하고 농축되어 결정이 생겨서 균사와 혼동될 수 있으며 검체도 소실되기 쉽다. 검체가 모발인 경우 압박을 하면 모발이 파괴되어 모발과 균과의 관계를 알기 어렵게 되므로 압박하지 않고 관찰한다.

2) KOH-DMSO(dimethyl sulfoxide) 검사법

KOH (NaOH)	20 g
DMSO	20 ml
Water	up to 100 ml

(1) 사용 목적

KOH 검사 방법과 동일하다. DMSO가 첨가됨으로서 가열을 하지 않아도 clearing이 잘 되므로 편리하다. 대부분의 검체는 10분 이내에, 조갑의 경우 20분 이내에 관찰이 가능하다.

(2) 검사 방법

① KOH 검사 방법과 동일하나 가열과정은 생략이 가능하다.

② 주의점: 장시간 방치하면 균사 성분도 용해되어 버리므로 주의 바란다.

3) Parker ink-KOH 검사법

KOH (NaOH)	10-20 g
Parker ink	15-20 ml
Water	up to 100 ml

(1) 사용 목적

KOH 검사 방법과 동일하나 Parker ink가 첨가됨으로서 균요소가 청색으로 염색이 되어 관찰이 용이하다. KOH 방법으로 관찰이 어려울 수 있는 *Malassezia furfur*, *Candida* 및 모발에서의 피부사상균의 관찰에 도움이 된다.

(2) 검사 방법

① KOH 검사 방법과 동일하다.

② 주의점: Parker ink는 super Quink permanent blue-black ink를 사용한다.

3. 검경 방법과 관찰 소견

직접 도말검사 표본을 검경시에는 조직 슬라이드 검경시보다 condenser lense를 낮추고 광량을 줄여 약간 어둡게 하여 관찰한다. 일단 저배율 (40배)에서 시야를 약간 움직이면서 전 시야를 관찰하여 의심되는 곳이 있으면 배율을 높이고 (100배와 400배) 시야를 밝게 한다. 피부사상균의 균사나 포자는 아주 얇은 녹색을 띠고 있으며 중간에 격벽이 있는 긴 균사의 형태로 관찰되며 간혹 가지가 뻗어있고 각질세포 사이를 가로질러 있다. 두부백선의 병모를 검사하면 ectothrix형에서는 포자가 모발의 표면에 붙어있고 endothrix형 감염에서는 모발내에 포자로 채워져 있다. 모발의 감염 양상은 그 원인균에 따라 차이가 있어 균의 동정에 유용한 정보가 될 수 있으므로 어느 형인지를 관찰하여야 한다. 피부사상균에서 관찰되는 유격벽 균사 (septated hyphae) 및 분절포자 (arthrospore)는 균종에 관계없이 동일하므로 KOH 소견만으로 피부사상균의 균종을 알아내기는 불가능하나 *T. verrucosum*에서는 모발 내에 큰 chlamydospore가 나타나서 구별이 될 수 있다. *Candida* 감염증에서는 백선에서 보이는 균사에 비해 가늘고 중간 중간에 격벽처럼 보이는 곳이 약간 잘룩한 형태를 나타내는 pseudohyphae 및 원형 내지 난원형의 포자와 발아하는 포자 (blastoconidia)를 관찰할 수 있다. 전풍의 병변에서는 짧은 균사와 많은 수의 포자들이 서로 엉켜서 발견되고 그 주위에 따로 떨어져있는 짧은 균사와 원형 내지 난원형의 포자를 관찰할 수 있다.

KOH 직접도말법으로 관찰되는 피부사상균의 균사와 때때로 혼동되기 쉬운 것으로 면섬유는 그 굵기가 비교가 안될 정도로 굵고, 탄력섬유는 일견 균사와 흡사하나 격벽이 없고 분지도 없으므로 구별이 된다. 더욱 혼동되기 쉬운 것은 mosaic fungus인데, 이는 분절포자의 chain과 흡사하여 주의를 요한다. 분절포자는 개개의 분절의 길이와 폭이 대체로 같은 크기이나 mosaic fungus는 크고 작은 소체가 배열되어 있어 그 윤곽도 불규칙적이고 또 이것이 각질형성세포를 둘러 쌓고 있는 듯한 배열을 하고 있으므로 자세하게 관찰하면 구별이 된다. 이것은 수장 및 족저의 각질을 재료로 하였을 경우 관찰되며 피부 자체의 대사산물로 생각되고 있다.

♣ 참고: KONPA 검사법 (가톨릭의대 성바오로병원 피부과 이현정)

(1) 사용 목적 및 장점

임상적으로 조갑진균증이 의심되나 기존의 진단방법에 음성을 보이는 경우 특별한 장비없이 비교적 빠르고 쉽게 진균을 확인할 수 있으며, 또한 결과를 반영구적으로 보존할 수 있는 검사방법이다.

(2) 검사 방법

① 조갑의 절취 및 보관: 병변 조갑을 깨끗이 닦은 후, 손톱깎이로 병변 부위를 가장 근위부까지 잘라낸 다음 검사할 때까지 멸균된 시험관에 보관한다.

② 20% KOH 2~4 ml에 ①의 조갑 표본을 넣고 56℃에서 20~30분간 두어 조갑이 연화되도록 한다.

③ 생리식염수에서 세척한 후 vortex mixer를 이용하여 잘게 부서지도록 만들고 3,000rpm에서 10분간 원심분리한다.

④ 다시 생리 식염수로 세척하고 원심 분리를 반복한다.

⑤ 상청액을 버리고 침전물을 2% 3-aminopropyl-triethoxysilane 용액으로 코팅한 슬라이드에 도말한다.

⑥ 공기중에서 건조시키고 acetone용액에서 5~15분간 고정하여 다시 공기중에서 건조시킨다.

⑦ PAS 반응: 도말한 검체에 periodic acid 용액을 點滴하고 5분 후 물로 10분간 세척하여 건조시킨다. Schiff reagent를 점적하고 15분간 반응시킨 후 물에 10분간 세척한다. 공기 건조 후 mount하여 관찰한다.

(3) KONCPA에서 관찰되는 특징적인 소견들

① 피부사상균: 분절이 있고 두께가 균일한 길고 가는 균사

② 칸디다: 직경 2~5 μm 정도의 비교적 균일한 포자들이 포도송이 모양으로 군집을 이루고 가성균사가 보인다.

③ Mold: 굵고 불규칙한 균사, 군집을 이루거나 산재된 불규칙한 크기와 모양의 포자들이 관찰된다.

④ 염주모양의 균사 (beaded hyphae): 피부사상균, mold에서 관찰되는데 분절포자의 변형 혹은 *Aspergillus*, *Penicillium* 등의 phialoconidia로 생각된다.

⑤ 진균의 소집락

⑥ 엽상체 모양의 균사 (eroding frond): mold, 피부사상균이 기생 상태에서 조갑을 침습하면서 생긴 균사의 변형이다. *T. rubrum*에서는 드물게 나타난다.

II. Culture

1. 배양 방법

진균 배양에서 중요한 점은 원인균이 포함된 검체의 채취, 채취 과정과 접종 과정에서의 오염의 방지, 적절한 배지의 선택, 그리고 온도와 습도를 잘 유지하여 주는데 있다. 검체의 채취 부위 및 채취 방법은 직접도말검사에서의 동일하며 배양 양성율을 높이기 위하여 적어도 2개 이상의 배지를 사용하는 것이 좋다. 또한 진균은 세균보다 장시간 배양하므로 (대개 4주간 배양) 평판배지보다는 건조가 적게 되는 사면배지에 배양하는 것이 좋다.

① 70% 알콜로 병변을 소독한 후 화염 멸균한 뒤 식힌 기구를 이용하여 검체를 채취하여 소독된 유리 slide나 petri dish에 담는다.

② 사면배지인 경우 tube의 입구를 화염 소독한다.

③ 화염 소독된 백금이 (loop나 hook)의 끝을 배지에 꽂아 식힌 다음 사면배지인 경우는 사면 상에 일정한 간격을 두고 3~4곳에 일렬로 접종하고, 평판배지인 경우는 표면에 넓게 퍼서 접종한다. 다시 tube의 입구를 화염 소독한 다음 마개를 막아준다.

④ 대개 25℃에서 배양하나 필요한 경우 37℃에서 배양할 수도 있다. 배지의 건조가 우려될 때는 용기에 물을 담아 부란기의 밑칸에 놓아두고 배지에 진드기의 기생을 막기 위하여는 나프탈렌 즙약을 넣어두면 된다.

2. 배지의 제조 방법

1) 사면배지

준비물: 배지 시약, 비이커 또는 삼각 flask, 유리 tube, 마개 (cotton ball 또는 플라스틱 마개), 시험관 꽃이, finger dispenser (또는 20ml 전동 pipet)

① 만들고자 하는 배지의 종류와 양에 따라 성분 시약을 계량하여 용기에 넣는다 (☞ 주의: 전자렌지로 가열시 넘칠 우려가 있으므로 배지의 총량은 용기 용량의 1/3 정도로 한다).

② 증류수를 넣고 잘 섞어준다.

③ vinyl wrap으로 입구를 느슨하게 막아준 뒤, 전자렌지를 이용하여 끓기 시작할 때까지 가열한다. 도중에 몇번 흔들어 주어 균일하게 배지가 녹도록 한다.

④ 뜨거울 때 dispenser나 전동 pipet를 이용하여 분주하여 준다 (유리관의 size에 따라 5~8 ml 정도 넣어준다).

⑤ 유리관의 마개를 닫고 autoclave 하여준다. 특별한 지시가 없는 경우 121℃, 15분간 실시한다 (☞ 주의: 마개가 screw cap인 경우는 느슨하게 잠근다).

⑥ 배지의 사면이 밀면과 높이의 비가 1:2 정도가 되도록 기울여서 굳힌 다음 비닐 봉지에 넣고, 배지의 종류, 제작일을 표시하여 사용 전까지 냉장실에 보관한다.

2) 평판배지

준비물: 배지, 삼각 flask, 소독된 petri dish, clean bench, aluminium foil

① 만들려고 하는 배지의 종류와 양에 따라 성분 시약을 계량하여 삼각 flask에 넣는다 (☞ 주의: autoclave 시 넘칠 우려가 있으므로 배지의 총량은 삼각 flask 용량의 1/3 정도로 한다).

② 증류수를 넣고 잘 섞어준다.

③ aluminium foil을 두겹으로 하여 입구를 감싸아 잘 막은 뒤 autoclave한다. 특별한 지시가 없는 경우 대개 121℃에서 15분간 멸균한다.

④ 65℃ 정도로 식힌 후 (손으로 만져보아 만질 수는 있으나 뜨거울 정도) 골고루 섞이도록 몇번 흔들어 준다.

⑤ clean bench 내에서 멸균된 petri dish에 20~25 cc정도 부어준다. Giant colony 제작이나 mating test 등 특별히 오랜기간 배양할 예정인 경우는 30 cc 정도 부어준다. air bubble이 생긴 경우는 백금을 alcohol lamp에 달구어 찍어주어 제거한다.

⑥ 20~30분 간 UV lamp를 쬌이며 굳도록 놓아둔다.

⑦ 비닐 봉지에 담고 배지의 종류, 제조일을 표시한 뒤 냉장 보관한다.

3. 주요 배지의 구성 성분과 특징

본 강의에서는 참고문헌 1-4를 주로 참조하였는데 배지의 정확한 조성 성분은 참고 서적마다 다소 다르며 제조 회사에 따라서도 다소 다를 수 있다. 한편 조성 성분은 필요한 양을 각각 넣어줄 수도 있고, pre-mixed powder의 형태로 판매되고 있는 것을 사용할 수도 있다. 또한 사용자는 본인이 사용하고 있는 배지의 제조회사에서 권유하고 제조 방법 (manufacturer's instruction)을 확인한 뒤 사용하여야 한다.

1) Sabouraud glucose agar

(Sabouraud agar, Sabouraud dextrose agar; SDA)

Glucose	40.0 g
Bacto Peptone (Difco)	10.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1 L

Sabouraud dextrose agar	65 g
Distilled water	1 L

(1) 사용 목적

혐기성 효모를 제외한 진균의 배양을 위하여 널리 사용되고 있는 배지이고 진균학 교과서에서 진균의 형태를 기술할 때 표준적으로 쓰이고 있는 배지이지만 실제로는 많은 진균들에 있어서 분생자 형성이 충분하지 못하다. 일차 분리 배지로 사용할 때는 항생제가 첨가되기도 한다. Peptone은 연구자에 따라 다른 것을 사용하기도 하는데 (예; Difco사의 Neopeptone) 진균에 따라 peptone의 종류가 달라지면 colony의 morphology가 변형되기도 하므로 주의가 필요하다.

(2) 만드는 법: '1. 배지의 제조방법' 참조

♣ 참고: Preparation of SDA medium with antibiotics (CCG)

To 1 liter of SDA medium, add:	
Chloramphenicol (10 mg/ml)	10 ml
Cycloheximide (in 2ml acetone)	0.1 g
Gentamicin (10 mg/ml)	5 ml

♣ Chroramphenicol stock solution (25 mg/ml)

Capsules containing 250 mg CM	2 개
Ethyl alcohol	10 ml
Distilled water	10 ml

박테리아의 증식을 억제하기 위하여 첨가한다.

- ① 우선 capsule 2개를 10ml의 pure ethanol에 녹이고 물을 첨가하여 25mg/ml의 용액으로 만든다.
- ② 이 stock solution 4 ml를 SDA 1L에 넣어주면 100 µg/ml이 된다.
- ③ autoclave 가능

♣ Gentamicin

Gram negative bacteria의 증식을 억제하기 위하여 사용한다. 배지 첨가용으로는 소아용 주사제 (농도 10 mg/ml, 1 vial이 2ml)를 사용한다. autoclave 가능

♣ Cycloheximide (Actidione) stock solution

Cycloheximide	0.1 g
Acetone	2 ml

Fungicidal한 약제로서 많은 saprophytic fungi를 억제한다. 그러나 피부사상균과 유사한 keratinophilic fungi 중 많은 진균들은 cycloheximide에 의하여 억제되지 않으므로 주의를 요한다. 억제되는 주요 진균들로는 *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon beigeli*, *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*와 yeast phase의 dimorphic fungi들이 있다.

- ① cycloheximide를 acetone 에 녹인다.
- ② 배지 (1 L)가 뜨거울 때 넣고 흔들어서 섞어준다.
- ③ autoclave 가능

2) Potato Dextrose Agar(PDA)

Potato dextrose premix	39 g
Distilled water	1 L

(1) 사용 목적

각종 진균의 분리, 동정, 계대보존에 이용된다. 특히 분생자 형성이 충분하며 *T. rubrum*의

특징적인 blood-red pigment의 생산이 뚜렷하게 관찰된다.

(2) 만드는 법: '1. 배지의 제조방법' 참조

3) Mycosel/Mycobiotic agar

Mycosel agar (MYC)는 BBL 제품이며 Mycobiotic agar는 Difco의 제품이다. 둘의 조성 성분 및 특징은 동일하다. 현재는 premix로 판매되는 것을 구하기 어려우므로 각각의 성분을 합하여 조제한다.

Glucose	10.0 g
Phytone peptone	10.0 g
Agar	15.5 g
Cycloheximide	0.04 g
Chloramphenicol	0.05 g
Distilled water	1 L

Mycosel (Mycobiotic agar)	36 g
Distilled water	1 L

(1) 사용 목적

대부분의 병원성 진균을 분리하기 위한 selective medium이다. 피부사상균은 이 배지에서 잘 자랄 수 있으나 유사한 표재성 진균증을 일으키는 *Scytallidium dimidiatum*과 *Scytalidium hyalinum*은 억제된다. 기타의 억제되는 진균들은 cycloheximide stock solution의 제조법을 참조하기 바람.

(2) 만드는 법: '1. 배지의 제조방법'과 'SDA with antibiotics의 제조법'을 참조. Autoclave는 118℃에서 15분간 실시한다.

4) Potato Dextrose Agar-Corn Meal-Tween 80 (PDACT)

Potato dextrose agar (Oxoid)	20 g
Cornmeal agar (Difco)	20 g
Peptone	4 g
Tween 80	6 ml
Distilled water	1 L

(1) 사용 목적 및 장점

현재 널리 사용되고 있는 SDA는 많은 진균들에 있어서 분생자 형성이 충분하지 못하며 피부사상균증의 가장 흔한 원인 진균인 *T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*의 특징적인 육안 소견이 잘 관찰되지 않는 경우가 있다. 또한 오랜 기간 계대 배양을 할 때에 융모 변성 (pleomorphic degeneration)이 자주 일어난다. 이러한 문제점을 보완하기 위하여 PDACT 배지가 경북의대 서

순봉 교수님에 의하여 개발되었는데 이 배지의 장점은 다음과 같다.

- ① *T. rubrum*의 특징적인 blood-red pigment의 생산이 뚜렷하다.
- ② colony 위로 10% KOH용액을 點滴시켰을 경우 *T. rubrum*은 KOH 용액을 흡수하지만 *T. mentagrophytes*는 흡수하지 않고 colony 표면위로 KOH 용액이 흘러내린다. 이로서 쉽게 두 균종을 감별할 수 있다.
- ③ *T. mentagrophytes*의 여러 분리형들, 특히 powdery type과 persicolor type의 colony morphology가 SDA에서 보다 특징적으로 관찰된다.
- ④ 장기간 계대 배양시 용모변성이 잘 일어나지 않는다.
- ⑤ *C. albicans*의 후막포자가 관찰되므로 *C. albicans*를 신속히 동정할 수 있다.

(2) 만드는 법: '1. 배지의 제조방법' 참조

5) Dermatophyte Test Medium (DTM 배지)

Phytone peptone (BBL)	10.0 g
Glucose	10.0 g
Agar	20.0 g
Phenol red solution	40.0 ml
Distilled water	1 L
0.8 N HCl	6.0 ml

♣ Phenol red solution

Bacto-Phenol red (Difco)	0.5 g
Sodium hydroxide (0.1 N)	15.0 ml
Distilled water	85.0 ml

♣ Antibiotic solution

Cycloheximide	0.5 g
Acetone	2.0 ml
Gentamicin sulfate	0.1 g
Distilled water	2.0 ml
Chlortetracycle HCl	0.1 g
Distilled water	25.0 ml

(1) 사용 목적

피부사상균을 분리 배양하기 위한 배지이다. 배지의 변색에 의하여 피부사상균인지 아닌지

는 쉽게 구별할 수 있으나 진균 고유의 색깔을 알기는 어려우므로 피부사상균의 종 단계에서의 동정은 방해가 될 수 있다.

(2) 배지 만드는 법:

- ① Phytone peptone, glucose, agar를 1L의 증류수에 넣고 끓을 때까지 가열하여 잘 녹인다.
- ② 40 ml의 phenol red 용액을 저으면서 넣어준다.
- ③ 6 ml의 hydrochloric acid를 저으면서 넣어준다.
- ④ cycloheximide와 GM을 저으면서 넣어준다 (최종 농도는 cycloheximide 500 µg/ml, GM 100 µg/ml).
- ⑤ 118℃에서 10분간 autoclave한다.
- ⑥ 0.1 g의 chlortetracycline HCl을 25 ml의 sterile distilled water에 녹인 뒤 배지를 흔들면서 넣어준다.
- ⑦ 멸균된 tube에 분주한 뒤 사면을 만든다.

(3) 시험 방법

- ① 피부 검체를 접종 후 28℃내지 30℃에서 배양하여 7일과 14일 뒤 관찰한다. ② 양성: 배지의 색깔이 yellow에서 red로 변하면 피부사상균 또는 geophilic keratinophilic fungi가 배양되었음을 의미한다. (+) control로는 *T. mentagrophytes*를, (-) control로는 *C. albicans*를 사용한다.
- ③ 주의점: 배양 2 주일이 지난뒤에 변색이 된 것은 false positive일 수 있으며, 일단 변색이 된 균주도 현미경 하에서 관찰하여 피부사상균임을 확인한다.

6) Christensen urea agar

Urea agar base	29 g
Distilled water	100 ml

Agar	15 g
Distilled water	900 ml

(1) 사용 목적

진균이 분비하는 urease에 의하여 urea가 분해되면 배지의 색깔이 yellow (pH 6.8)에서 red (pH 8.1이상)로 변색이 되는 것을 이용하는 것으로서 주로 atypical *T. mentagrophytes* (양성)와 atypical *T. rubrum* (음성)을 감별하기 위하여 사용한다.

(2) 배지 만드는 법:

- ① 증류수 100 ml에 urea agar base 29 g을 녹인 다음 멸균 여과지를 통과시켜 멸균한다.
- ② 증류수 900 ml에 agar 15g을 넣어 가열하여 녹인다. 121℃에서 15분간 멸균하여 50℃로 식힌다.
- ③ ①과 ②를 첨가하여 잘 혼합하여 멸균된 tube에 분주한 후 사면을 만든다.

(3) 시험 방법

- ① 시험할 진균를 접종 후 25℃에서 배양하여 7일과 14일 뒤 관찰한다.
- ② 양성: 배지의 색깔이 yellow에서 bright pink로 변하면 양성이다. (+) control로 *T. men-*

*tagrophytes*를, (-) control로 *T. rubrum*을 사용한다. 음성인 피부사상균으로는 *T. rubrum*, *T. verrucosum* 및 *T. violaceum* (1주 경과시)이 있다.

③ 주의점: 되도록 isolation medium이 transfer되지 않도록 주의한다. 또한 시험할 진균은 반드시 세균에 의하여 오염되지 않은 순수 배양된 것이어야 한다. 세균에 의하여 오염된 경우 의양성이 나올 수 있다.

7) Trichophyton Agar # 1~ # 7 (Difco)

Trichophyton agar I~VII	5.9 g
Distilled water	100 ml

(1) 사용 목적

피부사상균에 대한 nutritional test를 시행하기 위한 배지이다. 즉 특정한 vitamin이나 growth factor를 요구하는 성질을 이용하여 피부사상균을 동정하는 방법이다. 각 배지의 특징은 다음과 같다.

Trichophyton agar #1; vitamin free casein hydrolysate

Trichophyton agar #2; agar #1 + inositol 50 µg/ml

Trichophyton agar #3; agar #1 + thiamine 0.2 µg/ml & inositol 50 µg/ml

Trichophyton agar #4; agar #1 + thiamine 0.2 µg/ml

Trichophyton agar #5; agar #1 + nicotinic acid 2 µg/ml

Trichophyton agar #6; ammonium nitrate base

Trichophyton agar #7; agar #6 + histidine 30 µg/ml

(2) 배지 만드는 법:

① 증류수 100 ml에 Trichophyton agar 5.9 g을 녹인 다음 tube에 분주한다.

② 121℃에서 12분간 멸균하여 사면을 만든다.

(3) 시험 방법

① 시험할 진균을 1×1mm 정도 사면의 중앙에 접종 후 25℃에서 배양하여 7일과 14일 뒤 관찰한다.

② Trichophyton agar #1에서의 성장양상과 각 배지에서의 성장 양상을 비교한다. *T. tonsurans*와 *T. violaceum*은 thiamine에 대하여, *T. equinum*은 nicotinic acid에 대하여, *T. verrucosum*은 inositol과 thiamine에 대하여, 또한 *T. megninii*는 histidine에 대하여 요구성을 나타낸다.

③ 주의점: isolation medium이 transfer되지 않도록 주의한다.

8) Casamino Acid Agar

Casamino acids (vitamine free)(Difco)	2.5 g
Glucose	40.0 g
Magnesium sulfate	0.1 g
Monopotassium phosphate	1.8 g
Distilled water	1 L
Agar	15.0 g

(1) 사용 목적

Difco사의 Trichophyton agar #1과 동일한 것이다. Difco사의 Trichophyton agar series는 高價이므로 사용량이 많은 agar #1은 직접 만들어서 사용하는 것이 실용적일 수 있다.

(2) 배지 만드는 법:

- ① 증류수에 위의 조성 성분을 녹인 다음 tube에 분주한다.
- ② 121℃에서 15분간 멸균하여 사면을 만든다.

(3) 시험 방법

- ① 시험할 진균를 1×1mm 정도 사면의 중앙에 접종 후 25℃에서 배양하여 7일과 14일 뒤 관찰한다.
- ② *T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. equinum*, *T. verrucosum* 및 *T. megninii*는 특수 성분에 대한 요구성을 나타내므로 성장이 억제됨을 관찰할 수 있다.
- ③ 주의점: isolation medium이 transfer되지 않도록 주의한다.

9) Takashio medium (Diluted Sabouraud's medium)

Glucose	2 g
Neopeptone	1 g
Magnesium sulfate	1 g
Monopotassium phosphate	1 g
Agar	6 g
Distilled water	1 L

(1) 사용 목적

피부사상균의 sporulation을 촉진시키는 배지로서 특히 교배시험 시 사용된다.

(2) 배지 만드는 법: '1. 배지의 제조방법' 참조

III. 피부사상균의 동정: 효율적인 동정을 위한 제안

현재 세계적으로 약 43종의 피부사상균이 알려져 있으나 실제로 인체에서 병원균으로 분리되는 피부사상균은 그다지 많지 않으며 지역에 따라서 흔히 분리되는 진균의 범위도 다르다. 예를 들면 우리나라에서는 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum* 및 *M. ferrugineum*의 10종이 현재까지 보고되어 있다. 따라서 피부사상균을 동정하는데 있어서 처음부터 기존에 알려져 있는 여러 가지 배지를 사용하여 다양한 physiological tests를 모두 실시하여 보는 것은 시간 및 비용의 낭비라고 할 수 있으며, 실제로 간단하게 내릴 수 있는 동정을 더욱 복잡하게 할 수도 있다고 생각된다. 그러나 배양된 진균의 colony morphology와 현미경적 관찰 소견만 가지고 동정을 실시한다면 드물게 분리될 수도 있는 피부사상균들을 놓칠 수 있으며, 때로는 이러한 형태적 관찰 방법만 가지고는 동정이 되지 않는 균주들도 있다. 이러한 점들을 고려하여 볼 때 다음과 같은 순서로 피부사상균의 동정을 실시한다면 간편하면서도 정확한 동정 결과를 얻을 수

있을 것으로 사료되어 이를 제안하는 바이다.

1. 1 단계

1) 피부과 환자의 검체를 항생제 (chloramphenicol)가 포함되어 있는 사면배지 1종류 (SDA, PDA, 또는 Potato Dextrose agar-Corn meal-Tween 80; PDACT 배지)와 항생제 및 항진균제가 포함되어 있는 평판배지 (Mycosel 배지 또는 SDA with CCG)의 두가지 배지에 배양한 것을 1주일에 2회 정도 판독하여 피부사상균, yeast 및 기타 mould를 감별한다.

2) 피부사상균으로 생각되는 것 중 오염되지 않은 것은 그대로 기르면서 관찰하고, yeast 및 기타 mould로 오염된 피부사상균은 PDACT 배지 또는 PDA에 접종하여 순수배양 시킨다.

3) Yeast 및 기타 mould 중에서도 수 일내로 신속하게 순수배양되어 병원균으로서 의미가 있는 것으로 사료가 되는 것은 SDA에 순수배양하여 동정을 하고, 피부과에 연락하여 재배양을 요청한다.

2. 2 단계: Immediate recognition

흔히 분리되는 균주가 특징적인 모습을 나타낼 때는 배양된 colony의 육안 및 현미경 하에서의 관찰 소견 (LPCB mount 또는 slide culture)만 가지고도 확정 동정이 가능하다.

1) *T. rubrum*: 표면이 white, cottony하고 이면에 blood-red pigment가 관찰되며, tear drop 모양의 microconidia가 관찰된다. PDACT 배지에서 자란 경우 10% KOH를 점적할 때 KOH 용액이 colony에 흡수된다.

2) *T. mentagrophytes*; granular 또는 powdery surface를 가지고 특징적인 grape-like microconidia와 macroconidia 및 spiral hyphae가 관찰된다. Cottony type에서도 특징적인 microconidia와 spiral hyphae가 관찰되는 경우는 동정이 가능하다.

3) *M. canis*: 방사상으로 보이는 white, woolly surface를 가지며 뒷면이 yellow 하다. Macroconidia의 표면이 거칠고 spindle 모양이며 벽이 두껍고 끝이 뽕족하다.

4) *M. gypsum*: colony의 표면이 powdery하고 특징적인 tan color를 가진다. thin-walled rough macroconidia를 가진다.

5) *E. floccosum*: yellow-green 내지 olive-green 색깔을 가지는 colony로서 microconidia는 없이 club-shaped macroconidia가 관찰된다.

3. 3단계: Minimal testing protocol

모양의 관찰만으로는 확실하게 동정이 되지 않는 경우 다음의 4가지 검사를 실시하여 본다 (Table 2).

- 1) Vitamine-free Casamino acids agar (Trichophyton agar #1)
- 2) Urease test
- 3) PDA (기타 *T. rubrum*의 색소형성을 촉진시키는 배지)
- 4) Mycosel at 25°C & 37°C

Table 2. Summary of conventional mycolocal tests for common dermatophytes

Species	Urease test at 7 days	Growth at 37℃	Red pigment production on PDA	In vitro Hair perforation
<i>T. rubrum</i>	-	+	+	-
<i>T. mentagrophytes</i>	+	+	-	+
<i>T. equinum</i>	+	+	-	-
<i>T. terrestre</i>	+	dose not grow	-	+
<i>T. raubitschekii</i>	+	+	+	-
<i>T. violaceum</i>	-	+	-	-
<i>T. tonsurans</i>	+	+	-	+/-
<i>M. canis</i>	+	+	-	+
<i>M. gypseum</i>	+	+	-	+
<i>E. floccosum</i>	+	+	-	-
<i>T. verrucosum</i>	-	+	-	-
<i>T. megninii</i>	+/-	+	+	-
<i>M. persicolor</i>	+	poorly grows	-	+

1) Vitamine-free Casamino acid agar에서 잘 자랄 때

A. Urease test 음성 (no change: yellow) 인 경우

A-1. PDA에서 blood-red pigment 양성이면 *T. rubrum*A-2. PDA에서 blood-red pigment 음성이면 atypical *T. rubrum*, *M. audouinii*

B. Urease test 양성 (bright pink) 인 경우

B-1. PDA에서 blood-red pigment 양성이면

T. raubitschekii, *T. megninii*, bacterially contaminated *T. rubrum* (*T. megninii*는 Tri-chophyton #6에서 성장이 안되나 #7에서는 성장)

B-2. PDA에서 blood-red pigment가 관찰되지 않을 때:

B-2-2. 37℃에서 자라면:

T. mentagrophytes, bacterially contaminated *T. rubrum*, *T. schoenleinii*, *M. audouinii*

B-2-3. 37℃에서 자라기는 하나 성장이 억제되어 있으면:

M. persicolor, bacterially contaminated *T. rubrum*B-2-3. 37℃에서 전혀 자라지 않으면: *T. terrestre*

참고: 추가동정이 필요한 경우는 다시 colony and microscopic morphology와 *in vitro* hair perforation test를 이용하여 동정한다.

2) Vitamine-free Casamino acid agar에서 잘 안 자랄 때

Trichophyton agar #1~#7을 이용하여 vitamin requirment test를 실시한다.

- A. *T. violaceum* (thiamine 필요, Trichophyton agar #4)
- B. *T. equinum* (nicotinic acid 필요, Trichophyton agar #5)
- C. *T. tonsurans* (thiamine 필요, Trichophyton agar #4)
- D. *T. verrucosum* (thiamine & inositol 필요, Trichophyton agar #3)

4. 4 단계: Maximal, definitive protocol

배양된 피부사상균을 기존의 진균학적 검사 방법을 모두 동원하여 가장 확실하게 동정하고자 할 때는 다음의 7가지 검사를 동시에 실시하면 된다. 이와 같은 방법은 시간과 비용이 많이 들므로 진균을 동정하여 보관하는 reference lab. 이나 quality control용 test 균주의 동정에 이용할 수 있다.

- 1) Mycosel at 25℃ & 37℃
- 2) All 7 vitamine and amino acid requirement test media
- 3) Hair perforation test
- 4) Polished rice
- 5) Urea agar
- 6) PDA or other *T. rubrum* pigment agar
- 7) Slide culture

♣ *in vitro* hair perforation test

(1) 사용 목적

모발에 진균의 감염에 의하여 'perforating organ'이라고 불리는 깊고 좁은 쐐기 모양의 천공을 유발 시키는 실험으로서 주로 atypical *T. mentagrophytes*와 atypical *T. rubrum*을 감별하기 위하여 사용한다.

(2) 시험 방법

- ① 2세 이하 여자 어린이의 모발을 구하여 세제로 잘 세척한 후 하룻 밤 tap water로 rinse하여 잘 말린다. 필요한 양 만큼 1cm 정도의 길이로 잘라서 멸균한다.
- ② 멸균된 작은 petri dish에 소독된 0.05 % yeast extract 용액을 5ml 넣는다.

Yeast extract	0.125 mg
Distilled water	250 ml

- ③ 소독된 모발을 10개 정도 배양액에 넣어준다.
- ④ 검사할 진균을 1 loop떠서 (되도록 spore를 이용) 배지에 풀어준다.
- ⑤ 25 ℃에서 1주 배양 후 진균에 의하여 감염된 것으로 사료되는 2~3개의 모발을 꺼내어

서 LPCB 염색하여 관찰한다. 배양 2 주째에 다시 관찰한다.

⑥ 주의점: 양성 control로 *T. mentagrophytes*를, 음성 control로 *T. rubrum*을 이용한다. 때로 모발의 erosion을 관찰할 수 있는데 특징적인 perforating organ과 혼동하지 않도록 한다. 플라스틱 petri dish 보다는 유리 기구를 이용하는 것이 정전기를 방지할 수 있어서 좋다. *T. tonsurans*의 경우는 균주에 따라 양성 또는 음성으로 관찰될 수 있으므로 이 실험을 *T. tonsurans*의 동정에 이용할 수 없다.

5. 기타의 방법

1) Mating test

(1) 사용 목적

피부사상균에는 그 완전형이 밝혀진 균종들이 있다. 대표적인 예로 *T. mentagrophytes*의 경우 그 완전형으로 *Arthroderma vanbreuseghemii*, *A. benhamii* 및 *A. simii*가 알려져 있다. 만약 어떤 균주를 그 완전형과 교배를 시켰을 때, 성반응이 유도가 되어 유성포자가 형성되었다면 그 균주의 동정을 확실하게 내릴 수 있을 뿐만 아니라 '+' 형인지 '-' 형인지도 알 수가 있다. 또한 한 지역에 분포하는 어떤 균종의 완전형 및 그 성별 분포를 알 수 있다면 그 균종의 유입 경로 및 진화과정을 추정할 수 있을 것이다. 즉 mating test는 진균의 분류학적, 계통학적 및 역학적 연구에 이용될 수 있는 방법이다.

(2) 시험 방법: *T. mentagrophytes*의 경우

① Takashio의 1/10 Diluted Sabouraud's media를 사면배지 및 평판배지로 필요한 양만큼 제작한다.

② 우선 mating 시키고자 하는 균주와 그 완전형들을 위의 사면 배지에서 1~2주 배양하여 성능력이 왕성한 상태 (포자 형성이 왕성한 상태)로 준비하여 준다.

③ 평판 배지의 뒤에 금을 그어 반으로 나눈 다음 균주명을 표시하여 준다.

④ 시험할 균주와 완전형을 0.5~1cm의 간격을 두고 접종하여 준다.

⑤ 건조되지 않도록 배지를 비닐 wrap으로 싸아주고 25℃에서 4내지 6주간 배양하면서 수시로 두집락 사이에 일어나는 반응을 관찰한다.

⑥ 주의점: 성반응은 ascospore를 포함하고 있는 mature cleistothecia와 ascospore를 관찰할 수 없는 pseudocleistothecia로 나누어 볼 수 있다. mature cleistothecia는 육안으로는 양 균주의 사이에서 좁쌀같이 관찰되며, LPCB 염색을 하여 보면 주변을 peridial hyphae (아령 모양의 울룩볼록한 hyphae)와 커다란 spiral hyphae가 둘러싸고 있고 떠뜨려 보면 6~8개의 구형의 작은 황금색 자낭포자 (ascospore)를 가지고 있는 자낭 (asci)이 관찰된다. 이러한 asci와 ascospore를 관찰할 수 있는 것만을 mating test 양성이라고 할 수 있으나 경험이 없으면 asci 및 ascospore를 관찰하기가 어려울 수 있다. 또한 완전형의 '+' 형과 '-' 형 사이의 반응을 control로 실시한다.

2) Molecular biological approaches

피부사상균의 同定 (identification)은 형태적 특징, 교배시험 및 여러 생리학적 실험에 의하여 이루어지고 있으나 때로 음모 변성을 일으켰거나 비전형적인 특징을 가지는 균주, 또는 교배능력을 소실한 균주의 경우 동정에 어려움을 겪을 수 있다. 따라서 최근에는 피부사상균의 동

정, 분류 (taxonomy), 완전형과의 계통학적 관계 (phylogensis) 및 형별연구 (subtyping)을 포함하는 다양한 연구 분야에 있어서 기존의 진균학적 검사법을 보완하는 하나의 연구방법으로 분자생물학적인 기법이 주목받고 있다.

(1) 균주의 순수 배양

다음의 여러 가지 방법을 이용할 수 있으며, 연구자의 편의에 따라 선택하면 된다. 1회 DNA extraction에 100 µl 정도 (약 200 µg)의 진균이 필요한데, 1.5 ml E tube에 harvest하고 3회 정도 300 µl의 증류수로 washing하여 (가볍게 vortex 후 12,000 rpm, 5분간 원심분리) 상청액은 버리고 DNA추출 전까지 -20℃에서 보관한다. DNA extraction 직전에 1X TE buffer로 한번 더 washing 한다.

① 통상적인 배지 (SDA 등)를 사용하여 평판배양 또는 사면배양한 것으로부터 백금 loop나 적당한 기구를 이용하여 긁어내어 진균을 모은다 (harvest). yeast인 경우는 쉽게 harvest되나 사상균인 경우는 어려울 수 있으며, 배지에 의한 오염이 있을 수 있으므로 여러번 washing을 한다.

② PDB (potato dextrose broth)에 진탕배양

500ml flask에 PDB를 150ml 녹여서 넣어주고 121℃에서 15분간 autoclave 한 다음 균을 접종한 후 진탕 배양한다. 1~2주일 후 충분히 배양이 되면 50 ml의 cone tube에 옮겨서 3,500 rpm, 10 분간 원심분리하여 균주를 harvest 한다. 다시 침전된 균주를 1.5ml E tube에 옮겨 담는다. 순수한 진균을 다량 얻을 수 있으나 실제로 DNA work에는 이렇게 많은 진균이 필요하지 않으므로 scale-down하여 배양하여도 무방하다.

③ 통상의 9 cm 평판배지위에 적당한 크기로 잘라서 소독한 투석막 (peritoneal dialysis film)을 놓고 그 위에 진균을 도말 접종한다. 약 3~5개의 1.5ml E tube에 매우 순수한 진균을 준비할 수 있으므로 좋은 방법으로 사료된다.

④ 9 cm 멸균 petri dish에 SDB (Sabouraud dextrose broth)를 5 ml 주입 후 균을 접종하여 그대로 (즉 진탕하지 않고) 배양한다. 1~2주일 후 ball 모양의 진균 덩어리를 피펫으로 harvest하거나, 배양액을 소독된 cone tube에 옮겨서 원심분리하여 진균을 harvest한다.

(2) 피부사상균으로부터 진균 DNA의 extraction

진균의 DNA를 추출하는 과정은 첫째 진균의 세포벽과 세포막을 파괴한 뒤, 둘째 여러 가지 cell debris와 protein 성분으로부터 진균의 DNA를 정제하는 과정으로 나눌 수 있다. 진균의 벽은 다른 세포들에 비하여 단단하므로 이중 첫번째 과정이 진균에 있어서의 독특한 과정이라고 할 수 있으며, 연구자에 따라 다양한 방법이 제시되고 있다. 본 강의에서 소개할 방법은 신속하면서도 DNA의 손상이 없는 진균 DNA의 추출 방법으로 사료된다. 이 방법은 피부사상균 이외에도 Aspergillus, Penicillium, black fungi (예; Exophiala) 및 접합균류 (예; Mucor, Rhizopus) 등 사람과 관련이 있는 대부분의 사상균에서 적용할 수 있으며, RAPD(random amplified polymorphic DNA) analysis 나 specific primer를 이용한 동정을 위한 PCR을 할 때와 sequencing 등 진균 연구를 위한 대부분의 DNA work에 사용될 수 있는 방법이다.

* 주요 준비물

① Lysis buffer

200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 %w/v SDS, 25mM EDTA, 250mM NaCl (실제로 lysis buffer를

50ml 만드는 경우의 예를 들어보면, 1M Tris HCl buffer 10ml(pH 8.0), 10% SDS 2.5ml, 0.5 M EDTA 2.5ml, 5M NaCl 2.5ml를 섞은 뒤 DW로 50ml를 맞추어 준 뒤 1회만 autoclave 한다.)

② Conical grinder

* 실험 과정

- ① 진균을 TE buffer로 washing한다.
- ② 300 μ l의 lysis buffer를 첨가한다.
- ③ Conical grinder로 충분히 분쇄시킨다.
- ④ 150 μ l의 3 M sodium acetate용액 첨가한다.
- ⑤ 100 $^{\circ}$ C에서 15분간 중탕한다.
- ⑥ -20 $^{\circ}$ C에서 60분간 보관한다.
- ⑦ 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한다.
- ⑧ 상청액을 취하여 PCI(phenol-chloroform-isoamylalcohol 25:24:1)로 단백질을 제거하고 상청액을 취한다.
- ⑨ 100% EtOH (또는 99% propanol)로 DNA를 침전시킨다.
- ⑩ 70% EtOH로 washing 후 상청액은 모두 버리고 건조시킨다.
- ⑪ 50 μ l의 DW에 용해하여 254nm에서의 OD를 측정하여 농도를 잰다.

참 고 문 헌

1. Kwon-Chung KJ, Bennett JE: Medical Mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, 1992
2. Kane J, Summerbell R, Sigler L, et al.: Laboratory Handbook of Dermatophytes. Star Publishing Co., Belmont, 1997
3. 서순봉, 김기홍, 방용준: 의진균학. 대학서림. 서울, 1994
4. 宮治 誠, 西村 和子, 宇野 潤: 病原真菌 2판. 廣川書店. 東京, 1996
5. 中嶋 弘: 皮膚疾患診斷을 위한 直接檢鏡所見. 新藤美術印刷柱式會社. 大阪, 1982
6. 김정애 등: 대한피부과학회 제 7회 진균학 심포지움 초록집. 1992
7. Odds FC: Sabouraud's agar. J Med Vet Mycol 1991; 29: 355-9
8. 서순봉, 김상원: *T. mentagrophytes*의 완전형과 그 감염증. 대한피부과학회지 1984; 22: 610-9
9. 김종철, 최종수, 김기홍, 서순봉: 대구지역에서 분리된 *T. verrucosum*의 진균학적 성상. 대한피부과학회지 1992; 30: 761-8
10. 김기홍, 문병천, 최종수: 대구지역 백선 환자에서 분리된 *Trichophyton* 속의 진균학적 성상 및 아형의 분류. 대한의진균학회지 1997; 2: 129-43

* KONCPA 관계 참고 문헌

1. Liu HN, Lee DD, Wong CK. KONCPA: A new method for diagnosing tinea unguium. Dermatology 1993; 187: 166-8
2. 권윤희, 조백기. 조갑진균증의 진단에 있어 KONCPA 검사의 임상적 의의. 대한피부과학

회지 1996; 34: 527-37

3. 이종서, 이광훈. 조갑진균증의 진단방법에 관한 비교연구. 대한피부과학회지 1995; 33: 467-73.

Workshop 3

피부 사상균의 육안적 소견 및 현미경 소견

영남대학교 의과대학 피부과학교실

김 기 홍

Useful distinguishing features of dermatophytes

- * hair fluorescence
- * hair perforation
- * hair parasitism; endothrix, ectothrix
- * nutritional requirements
- * salt tolerance
- * temperature of growth
- * urea hydrolysis
- * microscopic morphology
- * colony morphology

Important features of fungal colonies

- * growth rate on Sabouraud's dextrose agar at 25 °C ~ 30 °C
- * color; surface, reverse, agar
- * topography; flat, raised, heaped
- * texture; smooth, fluffy, granular, suede, velvety
- * pattern of colony folding; cerebriform, crateriform
- * miscellaneous features; diffusible pig.,

Slow growing dermatophytes

T. violaceum, *T. verrucosum*, *T. schoenleinii*, *T. concentricum*, *T. yaoundei*, *T. soudanense*

Microscopic features of fungi hyphae:

asexual reproductive structures

- * septation
- * patterns; raquet, spiral, favic, chandelier, nodular body

- * pigmentation
- * vesicles or swollen cells

Dermatophytes identifiable by hyphae

M. audouinii; pectinate hyphae, *M. ferrugineum*; bamboo hyphae, *T. schoenleinii*; racquet hyphae, *T. violaceum*; tangled hyphae

Conidium (conidia):

reproductive propagule produced in the absence of nuclear recombination, thus representing anamorphic or asexual reproduction

- * macroconidia: the larger of two types of conidia produced in the same manner by the same fungus
- * microconidia: the smaller of two types of conidia produced in the same manner by the same fungus

우리나라에서 분리되었던 피부사상균

Epidermophyton floccosum, *Microsporum (M.) canis*, *M. ferrugineum* (synonymy. *M. japonicum*, *T. ferrugineum*), *M. gypseum*, *Trichophyton (T.) mentagrophytes* (synonymy. *T. gypseum*), *T. rubrum* (synonymy. *T. coccineum*), *T. schoenleinii*; *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, *T. violaceum* (synonymy. *T. glabrum*)

Epidermophyton floccosum (Harz) Langeron et Milchevitch 1930

synonymy. *Trichothecium floccosum* Harz 1870; *Trichophyton interdigitale* Sabouraud 1905; *Trichophyton cruris* Castellani 1908; *Epidermophyton inguinale* Sabouraud 1910; *Epidermophyton cruris* Castellani et Chammers 1910;

colony appearance:

- * slow: growth
- * texture: membranous becoming felty to powdery
- * color: yellow to khaki on the surface; chamois to brown on the reverse
- * pleomorphism
- * folded thallus on subcultures

microscopic appearance:

- * macroconidia; club-shaped, with thin, smooth walls, solitary or in groups
- * microconidia; absent

- * chlamydospores formed in large numbers in mature colonies
- * pleomorphism; cultures rapidly manifest pleomorphism, in which white, atypical sectors soon arise on the colony surface.; deterred by maintaining strains on Sabouraud glucose agar containing 3 to 5 % sodium chloride.

Remark: distinguished from other dermatophytes by its restricted, yellow to khaki colonies, its club-shaped macroconidia with thin, smooth walls, and its inability to form microconidia

Microsporum Gruby 1843

- * From a taxonomic point of view, *Microsporum* is distinguished from *Trichophyton* and *Epidermophyton* by its fusiform macroconidia with rough to echinulate walls.
- * In practice, the identification of many species rests primarily on the appearance of the macroconidia, since the microconidia are not sufficiently distinctive to be useful for this purpose.
- * Some species produce few or no macroconidia. The production of macroconidia can be stimulated by cultivating isolates on autoclaved rice grains, on potato glucose agar or on Sabouraud glucose agar containing 3 to 5 % sodium chloride.
- * Absence of conidia, the colony appearance and certain physiological tests are used in identification.

***Microsporum canis* Bodin 1902**

synonymy. *Microsporum felineum* (Bodin) Mewbornarz 1902; *Microsporum lanosum* (Bodin) Sabouraud 1907; *Microsporum pseudolanosum* Conant 1937; *Microsporum simiae* Conant 1937;

colony appearance:

- * rapid: growth
- * texture: downy to wooly, radial groove
- * color: white to yellow on the surface; yellow to yellow-orange on the reverse, rarely pale
- * culture on autoclaved rice grains: good growth, white mycelium, yellow pigment

microscopic appearance:

- * macroconidia; numerous, spindle-shaped, somewhat recurved at the apex with a thick and echinulate cell wall, containing up to 15 cells
- * microconidia; club-shaped, infrequent

***Microsporum gypseum* (Bodin) Guiart and Grigorakis 1928**

colony appearance:

- * rapid: growth

- * texture; downy becoming powdery to granular
- * color: beige on the surface; beige to red brown on the reverse,

microscopic appearance:

- * macroconidia; abundant, ellipsoidal to fusiform, symmetrical, thin-walled, containing 3 to 6 cells with rough or echinulate surface
- * microconidia; club-shaped, moderately abundant

Trichophyton Malmsten, 1845

- * From a taxonomic point of view, Trichophyton is distinguished from Microsporum by its smooth walls.
- * For the identification of many species, it is especially important to examine the morphology of the the microconidia.
- * In the species which are normally sterile in culture, the colony appearance, certain physiological tests, and sometimes the type of the lesion will prove useful in identification.

Trichophyton mentagrophytes (Robin) Blanchard 1896

synonymy. *Microsporon mentagrophytes* Robin 1853; *Trichophyton gypseum* Bodin 1902; *Trichophyton granulosum* Sabouraud 1909; *Trichophyton radiolatum* Sabouraud 1910; *Trichophyton asteroides* Sabouraud 1910; *Trichophyton interdigitale* Prestley 1917; *Trichophyton pedis* Ota 1922;

Trichophyton mentagrophytes var *mentagrophytes*

colony appearance:

- * growth; rapid
- * texture; powdery, granular
- * color: white to cream on the surface; brown-tan or red brown on the reverse,

Trichophyton mentagrophytes var *interdigitale*

colony appearance:

- * growth; moderately rapid
- * texture; flat, downy
- * color: white to cream on the surface; light-yellow, or red brown on the reverse,

microscopic appearance:

- * spiral hyphae; often present

- * microconidia; unicellular, round to pyriform, in closely rebranched clusters or along otherwise undifferentiated hyphae, usually numerous, sometimes rare in anthropophilic isolates
- * macroconidia; multiseptate, mostly club-shaped with thin smooth walls, solitary, often absent

physiologic tests:

- * urease test: positive
- * hair perforation: positive
- * growth factor requirements: none
- * potato glucose agar, cornmeal glucose agar: production of red pigment on the reverse of the majority of isolates which remain unpigmented on Sabouraud glucose agar.

M. persicolor

- * resembles granular, zoophilic isolates of *T. mentagrophytes*
- * poor, suppressed, surfaced growth at 37°C on Sabouraud agar
- * BCP- milk solids-glucose agar; sky blue color
- * rough-walled macroconidia on 3% to 5% salt-amended Sabouraud agar

Trichophyton rubrum (Castellani) Sabouraud 1911

synonymy. *Trichophyton purpureum* Bang 1910; *Trichophyton coccineum* Katoh 1925;

Epidermophyton rubrum (Castellani) Sabouraud 1910

colony appearance:

- * growth; slow to moderately rapid
- * texture; downy, sometimes powdery
- * color: white to pale pink on the surface; typically wine red, sometimes brown, yellow or even uncolored on the reverse,

microscopic appearance:

- * microconidia; numerous to rare, unicellular, club-shaped to pyriform, solitary along hyphae or sometimes in cluster
- * macroconidia; multiseptate, pencil-shaped or cigar-shaped, often absent

physiologic tests:

- * urease test: negative
- * hair perforation: negative
- * growth factor requirements: none
- * potato glucose agar, cornmeal glucose agar: production of red pigment on the reverse of the majority of isolates which remain unpigmented on Sabouraud glucose agar.

T. megninii

one of the most difficult dermatophytes to recognize on initial examination identical to *T. rubrum*
grow on ammonium nitrate + histidine but not without histidine differentiation between *T. mentagrophytes* and *T. rubrum*

Trichophyton tonsurans Malmsten, 1845

mahogany-red form, sulfureum form

colony appearance:

- * growth; slow
- * texture; variable, suede-like, sometimes powdery or velvety
- * color: white, beige, pale yellow (sulfureum form) or brown on the surface; yellow, dark brown or red brown on the reverse, microscopic appearance:
- * microconidia; numerous, of varying shapes and sizes (pyriform, club-shaped, or balloon shaped)
- * macroconidia; rare, sinuous, with thin smooth walls physiologic tests:
- * urease test: positive
- * hair perforation: negative (sometimes positive)
- * growth factor requirements: growth stimulated by thiamine

Trichophyton verrucosum Bodin, 1845

colony appearance:

- * growth; very slow; more rapid at 37°C than 25°C
- * texture; glabrous, sometimes lightly downy
- * color: white, sometimes yellow or greyish on the surface; no characteristic pigment on the reverse,

colony patterns of *T. verrucosum* on Sabouraud's dextrose agar at 37°C

- | | |
|----------|---|
| Type I | illdefined, whitish, discoid colony |
| Type II | illdefined, slightly yellowish colony with coarse radiating folds |
| Type III | welldefined, whitish, discoid colony with diffuse fine folds |

microscopic appearance:

- * microconidia; club-shaped, often absent
- * macroconidia; rat tail shaped, rare
- * chlamydospores in chains

physiologic tests:

- * urease test: negative
- * hair perforation: negative (sometimes positive)
- * growth factor requirements: thiamine required, and also often inositol growth pattern of *T. verrucosum* and *T. tonsurans* trichophyton agars

Tri. agr: trichophyton agar

T.V: *T. verrucosum*

T.T: *T. tonsurans*

참 고 문 헌

1. 김기홍: 피부사상균의 동정. 대한의진균지 2: 1-8, 1997
2. 김기홍, 문병천, 최종수: 대구지역에서 분리된 Trichophyton속의 진균학적인 성상 및 아형의 분류. 대한의진균지 2: 129-143, 1997
3. 김종철, 최종수, 김기홍, 서순봉: 대구지역에서 분리된 Trichophyton verrucosum의 진균학적 성상. 대한피부과학회지 30: 761-768, 1991
4. 박용묘, 최종수, 김기홍: Potato dextrose agar에서 배양한 수종백선균의 육안적 및 현미경 소견. 대한피부과학회지 29: 364-376, 1991
5. Elewski BE, Hazen PG: The superficial mycosis and the dermatophytes. J Am Aca Dermatol 21: 655-73, 1989
6. Rippon JW: Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3rd ed., W.B. Saunders Co, Philadelphia, 1988, pp.121-275
7. Rubell G, Talpin D: Dermatophytes: their recognition and identification. 2nd ed., University of Miami Press, Coral Gables, 1974, pp.1-118.
8. St-Germain G, Summerbell R: Identifying filamentous fungi. Star Publishing Co, Belmont, 1996, p112, 140-157, 220-229

■ 간 행 위 원 회 ■

- Editorial Board -

노 병 인(위원장)

Chief of Board : Byung In Ro, M.D.

조 백 기(간 사)

Editor in Chief : Baik Kee Cho, M.D.

조 상 현(부간사)

Associate Editor : Sang Hyun Cho, M.D.

김 기 홍

Ki Hong Kim, M.D.

김 정 애

Jeong Aee Kim, M.D.

박 석 돈

Seok Don Park, M.D.

신 완 식

Wan Shik Shin, M.D.

안 규 중

Kyu Joong Ahn, M.D.

이 광 훈

Kwang Hoon Lee, M.D.

전 재 복

Jae Bok Jun, M.D.

대한의진균학회 제 1 차 Workshop 초록집

1998년 11월 10일 인쇄

Publisher: Chung Won Kim, M.D.

1998년 11월 14일 발행

Editor in Chief: Baik Kee Cho, M.D.

발행인: 김 정 원

Published by:

편집인: 조 백 기

Korean Society for Medical Mycology

발행처: 대한의진균학회

Department of Dermatology, Yongsan Hospital

학 회 주 소

College of Medicine, Chung-Ang University

서울시 용산구 한강로 3가 65-207

65-207, 3-ka, Hangang-ro, Yongsan-ku

중앙대학교 의과대학 부속 용산병원

Seoul 140-757, KOREA

피부과내 140-757

Phone : 82-2-748-9573/4 Fax : 82-2-797-6277

전화 : (02) 748-9573/4 팩스 : (02) 797-6277

인쇄처: 서흥출판사 702-0143, FAX 714-7062
