

# 대한의진균학회

## 제5차 Workshop 초록

- 일 시 : 2003년 6월 15일 (일)
- 장 소 : 가톨릭 의과학연구원

### 대한진균학회 제5차 Workshop 진행계획표

시 간	내 용
14:00 - 14:30	등 록
14:30 - 15:45	1) 진균검사물 채취방법 ..... 최 중 수 교 수 (영남의대) 2) Molds의 동정 ..... 김 신 옥 연구원 (결핵연구원) 3) Malassezia 균종의 육안 및 현미경적 소견 ..... 안 규 중 교 수 (건국의대)
15:45 - 16:10	Coffee Break
16:10 - 17:40	실 습 1) 진균검사물 채취방법 (최중수 교수) 2) Mold 동정방법 (김신옥 연구원) 3) Malassezia 동정방법 (안규중 교수)
17:40 - 18:00	질의 및 응답

# 진균검사물 채취방법

영남의대 피부과학교실

최 종 수

## 1. 진균검사물 채취방법

### 1) 주의사항

진균질환의 진단에서 가장 중요한 단계이다.

KOH 검사와 진균배양 검사의 낮은 양성률 - 실험실과 시행하는 사람에 따라 큰 차이

#### (1) 안전성

진신감염을 일으키는 병원성 진균이 검출되고 있다.

가검물의 채취, 배양, 검사물의 폐기 등 전 과정에 걸쳐 주의한다.

#### (2) 균종의 다양화

교통의 발달, 애완동물, 야외 활동, 기회감염의 증가

#### (3) 진균도말 검사와 배양이 기본

항체나 항원 검사는 감수성과 특이성에 문제가 있다.

분자생물학적 방법 - 아직 시작 단계

### 2) 양성률을 높이려면

의심스러운 환부는 모두 조사한다.

균이 가장 잘 나올 곳을 선정 - 병변의 가장자리, 신선한 곳

충분한 양을 채취한다.

치료하지 않은 곳

진물, 세균감염이 없는 곳을 선택한다.

연고를 씻어내고 실시한다.

정확한 표기 - 날짜, 환자 정보, 부위, 배지 등을 기록한다.

### 3) 방 법

70% 알코올 스펀지로 소독한 후 건조되기 전에 칼로 긁어서 검체를 채취한다.

- 소독, 환부조직의 유효, 인설이 칼에 달라붙어 채취하기가 편하다.

칼 - 무디고 둥근 칼날을 사용한다. - 피부를 손상하지 않으면서 세계 긁을 수 있다.

칼자루 - 가늘고 길어야 tube에 접촉하기 쉽다.

면봉을 사용하는 경우는 많지 않다 (외이도, 농포).

4) 부위에 따른 채취방법

(1) 피 부

환상병소 - 병변의 가장자리에서 채취한다.

병변의 중심부는 인설만 있고, 균사가 없을 가능성이 많다.

병변의 가장자리는 새로 자라는 균사들이 풍부하다.

안면 - 옆면 > 전면

굵고 나면 붉어져서 미용적으로 문제가 된다.

발가락 사이 - 병변의 가장자리를 선택

발 전체 - 발등쪽 > 발바닥

소수포 - 터뜨려서 수포 뚜껍의 안쪽을 세게 긁어서 채취한다.

손 - finger web > 손바닥

(2) 두 부

병모를 채취한다. 병모는 쉽게 뽑힌다. 병모는 찌그러져 있다.

Wood 등으로 보면서 형광 부위를 찾는다.

젓은 거즈로 문지르면 병모를 쉽게 채취할 수 있다.

반드시 hair root 부위를 포함하여야 한다 (Adamson's fringe).

정상 hair를 뽑는 것은 무의미하다.

두피의 인설이나 농포도 중요하다.

black dot, 인설 등은 칼로 긁는다.

염증이 심한 곳은 균요소가 적다.

멸균된 빗이나 브러시 - 집단 검진에 편리하다. KOH를 할 수 없는 단점.

(3) 조갑 - 병형에 따라 다르다

distal subungual onychomycosis

가능하면 근위부에서 채취한다.

nail bed와 nail plate 사이의 과각화된 부위

굵은 인설은 제거하고 그 밑의 보드라운 것을 채취한다.

proximal subungual onychomycosis

punch나 drill을 사용하여 nail plate 제거 후 채취한다.

white superficial onychomycosis

되도록 표면이 아닌 안쪽에서 채취한다.

새 칼날로 포를 떼내듯이 조갑 판을 자른다.

(4) 전 풍

칼로 긁어 KOH + Parker ink로 검사하거나, scotch tape로 채취하고 염색한다.

(5) 면 포

comedon extractor로 면포를 채취하여 염색하여 관찰한다.

## 5) 피부 이외의 시료

## (1) 조직

소독 후 병소 부위와 정상조직을 동시에 채취한다. 절반은 고정하여 조직 검사를 하고 절반은 진균 검사에 사용한다. 0.9% NaCl로 세척 후 작은 조각으로 잘라 agar 배지에 놓고 증류수를 한 방울 떨어뜨린 후 배양한다. 조직을 슬라이드 위에 놓고 난자를 하거나, glass bead와 0.9% NaCl에 넣고 vortex 하여 사용할 수도 있다.

조직의 양이 작으면 배지 표면에 단순히 접촉하여 접종할 수도 있으며, 생김이 어려우면 Wade smear 하는 것처럼 칼날로 피부에 상처를 낸 후 조직액을 긁어서 사용할 수도 있으나 진균의 숫자가 적으면 양성률이 떨어진다.

## (2) 혈액

2회 이상 반복하며, 열이 있을 때 채혈한다.

채혈 부위를 소독하여 상재균의 오염을 방지한다. 2개 이상의 배지에 동시에 접종하여 37°C에서 배양한다. 혈액의 양은 배지의 5%가 적당하며 10%를 넘지 않도록 한다. 상품화된 lysis-centrifugation system을 사용할 수도 있다.

## (3) 체액

늑막액, 복수, 관절액 등을 채취할 때는 소독을 철저히 하며, 원심 분리하여 침사를 검사.

## (4) 객담, 기관지, 구강

객담은 3일 동안 아침마다 채취한다. 입 속을 물로 세척한 후 멸균용기에 받는다. 침, 콧물 등이 객담에 혼합되지 않도록 하고, 0.9% NaCl로 3회 세척하여 사용한다. 기관지 세척액은 그대로 사용하며, 원심 분리하여 진균의 농도를 높일 수 있다.

## (5) 소변

아침 첫 소변 중 중간뇨가 이상적이며, 정량적 배양을 위해 카테타나 방광천자를 이용할 수 있다. 채취 즉시 원심 분리하여 침사를 도말 표본과 배양에 이용한다. *Candida sp.*는 상재균이므로 10<sup>5</sup>/ml 이상 분리되어야 원인 균으로 판정한다.

## (6) 대변 및 직장 검사물

*C. albicans*가 정상 상재균이므로 10<sup>6</sup>/g 이상 분리되어야 원인 균으로 판정한다.

대변을 0.9% NaCl에 현탁하여 사용한다. 대변에 피가 섞인 부위가 있으면 면봉으로 채취.

## (7) 뇌척수액

3~8 ml 정도가 필요하며, 원심 분리 후 침사를 현미경 검경 및 배양에 사용한다. 양이 많을 때는 membrane filter (0.2 μm)에 거른 후 agar media에서 놓고 배양한다.

## (8) 농, 분비물

개방 화농성 병소는 피부상재균에 오염될 가능성이 높다. 폐쇄성 병소는 소독 후 천자한다. 검체량이 소량이면 1 ml의 0.9% NaCl 1 ml를 첨가하여 사용한다.

## (9) 질

면봉을 사용하지 말고 멸균 백금이를 사용한다.

## 2. 직접도말 검사

### 1) 직접도말 표본 제작

유리 슬라이드에 검체를 모은 후 cover glass를 덮는다.

너무 큰 덩어리는 제거하거나 분쇄하여 사용한다.

Cover glass 옆쪽에 KOH 용액을 한두 방울 떨어뜨려 검체가 젖도록 한다.

표면을 살짝 눌러 공기를 제거한 후 alcohol lamp로 가열한다.

너무 가열하여 끓이면 KOH crystal이 형성되어 관독이 어렵다.

KOH 용액은 10~20%를 사용하고, DMSO나 Parker ink를 추가하여 각질을 빨리 녹이거나 균요소를 염색하여 쉽게 볼 수 있다.

병모는 endothrix와 exothrix를 구분하기 위해서 누르지 않은 상태에서 관찰한다.

#### (1) KOH-DMSO

피부과에서는 반드시 사용한다. 손톱, 발톱을 쉽게 녹인다.

2시간이 지나면 균사까지 녹이므로 주의한다.

겨울에는 굳어지므로 농도를 낮추어 만든다.

KOH	20 g
DMSO	20 ml
Water	up to 100 ml

#### (2) + 5% glycerol

여러 시간 동안 방치하여도 KOH crystal이 형성되지 않는 장점이 있다.

#### (3) 염 색

백선균은 특별히 염색을 하지 않아도 쉽게 관찰된다.

Parker ink-KOH: *Malassezia furfur*의 염색, Parker ink는 black > blue

### 2) 직접도말 표본 검경

직접도말 표본을 눌러서 얇게 펴고, 여분의 KOH 용액을 닦아 낸 후 관찰한다.

condenser를 낮추고 어둡게 하여 미동나사를 약간씩 움직여 초점을 변화시키면서 관찰한다.

저배율 (X100)에서 관찰할 수 있어야 한다. 고배율 (X400)에서 확인한다.

슬라이드 전체를 다 본다.

현미경 lens가 KOH 용액에 쉽게 손상되므로 주의한다.

scabies mite, egg 등도 관찰될 수 있다.

### 3) 판 독

균사의 두께, 격벽, 분지, 포자 등을 관찰한다.

백선균은 모두 동일한 소견을 보이므로 균종의 구분은 불가능하다.

예외: *T. verrucosum*는 병모 내에 특징적인 chlamydospore 형성

흑색진균: 갈색 균사

*Aspergillus*: 매우 굵은 균사

Non-dermatophytic filamentous fungi - 굵고, 많은 branching hyphae 등 비전형적

Yeast - budding spore, pseudohyphae

#### (1) 위양성 반응

섬유 - 굵고, 격벽이 없으며, 분지하지 않는다.

Mosaic fungi - 각질세포의 가장자리를 따라 배열한다 <-> 직각으로 관통  
균사의 두께와 형태가 불규칙하다.

KOH crystal

덜 녹은 각질

연고, 화장품 등의 oil

칼날의 오염

#### (2) 위음성 반응

열심히 찾지 않음

active lesion이 아닐 때

시료를 적게 채취

항진균제 치료 중

세균 감염 부위

각질이 덜 녹았을 때

#### 4) 특수 검사

KONPA, KONCPA: 조갑진균증

형광 염료 + 형광 현미경

### 3. 진균배양 검사

#### 1) 진균검사물 채취방법

Aseptic technique을 사용한다.

살아 있는 균이 있는 곳을 선택한다. - 환상병소의 중심부나, 조갑 및 모발의 원위부에는 균의 숫자가 적고, 죽어 있을 가능성이 높다.

#### 2) 배지의 선택 및 용기

SDA - 균은 잘 자라나 동정에 필요한 착색이 나타나지 않는다.

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

백선균 동정에 적합하다.

1986년 경북의대 서순봉 교수님이 개발

(1) 조성

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

(2) 장점

*T. rubrum*의 특징적인 blood-red pigment 생산이 뚜렷

*T. mentagrophytes*의 여러 아형들이 잘 분리됨

*T. rubrum*의 균집락이 10% KOH 용액에 쉽게 젖는다 <-> *T. mentagrophytes*

장기간 계대배양하여도 용모 변성이 잘 일어나지 않는다.

*Candida albicans*는 후막포자를 형성하여 신속히 동정할 수 있다.

(3) 첨가제

항생제 Chloramphenicol - alcohol에 녹인다.

Cycloheximide - acetone에 녹인다.

saprophytic fungi를 억제하기 위해 사용하지만 일부 pathogenic fungi도 억제한다.

*Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus*, *mucor*, *Trichosporon beigeli*, *Candida tropicalis*, *C. parasilosis*, yeast phase의 dimorphic fungi

(4) 용 기

사면배지 (tube) > 평판배지 (plate)

평판배지는 쉽게 마르고, contamination이 잘되며, 배지 양이 많이 든다.

Tube 뚜껑 - silicon > 솜마개 > 나사마개

Tube - 너무 굵거나 얇으면 접종, 보관 등이 불편하다. 8 mm × 15 cm

(5) 배지 만들 때의 주의 사항

신선한 재료를 사용한다.

너무 오래 끓이지 않는다.

사면 배지 - 충분한 양을 넣고, 사면을 넓게 확보 (1:2)

김을 충분히 뺀다 - 지나친 물기는 contamination의 원인이 된다.

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

(6) 보관 방법

1주 이내에 사용한다. 3주가 지나면 폐기한다.

마르지 않도록 밀봉하여 4°C에서 보관.

3) 접종 및 배양

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

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

Aseptic - Alcohol lamp 위에서 모든 과정을 시행한다.

Cycloheximide 넣은 것과 없는 2가지 배지를 사용한다. 25℃와 37℃에서 배양한다.

#### 4) 판 독

##### (1) 육안적 관찰

성장 속도, 형태, 색깔

균집락의 표면과 배면을 관찰한다.

배지의 착색 여부

##### (2) 현미경 관찰

균집락이 가장자리나 표면을 셀로판 테이프나 가는 바늘로 채취하여 슬라이드 위에 lactophenol cotton blue로 염색하여 관찰한다. 균요소를 관찰한다 (macroconidia, microconidia, hyphae).

##### (3) False negative

접종한 균이 적을 때

죽은 균

항진균제 치료 중

접종을 잘못된 경우 - 배지에 접촉이 안됨, 뜨거운 칼

나쁜 배지 - 오래된 배지, 조성이 잘못, 배지선택을 잘 못한 경우

마개를 꼭 막아 질식

온도가 맞지 않을 때: 고온, 저온

contamination - 백선균이 자라기 전에 배지 전체를 덮어 버린다.

세균에 오염

##### (4) Contamination을 줄이는 방법

여러 병소에서 동시에 채취하여 배양

여러 개의 tube에 배양

mite 제거 - 나프탈렌

오염된 배지를 사용하지 않는다.

배지를 만들 때 물기를 충분히 말려서 보관한다.

평판배지 보다는 tube를 사용한다.

검사실 환경을 깨끗하게

Cycloheximide, 항생제 등을 첨가한 배지를 사용

칼 소독

병변을 알코올로 소독한 후 가검물을 채취한다.

##### (5) Pathogen vs contaminant

여러 병소에서 동시에 채취하여 배양

여러 개의 tube에 동시에 배양

시간 간격을 두고 여러 번 배양

반복하여 검출이 되면 pathogen으로 판단한다.

검체를 채취한 부위를 고려한다.



## 5) 특수 동정 검사

Hair perforation test, Mating test, Slide culture

Urease test, 특수배지

## 4. 진균 DNA 검출

## 1) 분자생물학적 방법의 용도

(1) 진단, (2) 분류 (Taxonomy), (3) fingerprinting (epidemiology)

## 2) 분자생물학적 방법의 장점

빠르다.

간편하다 - 일관성이 있다.

균종간의 거리를 측정할 수 있다.

동일 균종의 균주간 구분

## 3) 분자생물학적 방법의 어려운 점

균 채취 - 오래되면 nucleus 없어진다. DNase 작동

Contamination 제거 - Human DNA, Bacteria, fungi, PCR products

Cell wall 깨뜨리기가 힘들다 - cell wall 성분이 균종에 따라 다르다.

PCR inhibitors - 혈액에 포함된 heme과 그 대사산물들, 항응고제 (EDTA, heparin), 머리카락의 eumelanin, 근육의 myoglobin, 초자체, 뇌척수액, 소변, 대변, polyamines, 객담의 acidic polysaccharides, 중화되지 않은 formalin 고정액, DNA 추출에 사용된 화학물질들 (EDTA, sodium dodecyl sulfate, guanidinium, phenol, ethanol, dimethylsulfoxide, urea, formamide 등), 수술용 윤활제, 나무 이쑤시개, 살정제

상재균과 병원성 균의 구분이 곤란하다

PCR은 양적인 측정이 곤란하다.

완치 여부 확인 - 죽은 균의 DNA가 존재할 수 있다.

전통적인 진균학적 방법의 결과와 일치하지 않을 수도 있다.

비교할 균이 필요하다.

비용

## 4) Small scale vs Large scale

small scale - PCR 용으로 적당, 간편, 경제적, tube에 배양한 것을 직접 이용하거나 배양하지 않고 가검물을 직접 사용할 수도 있다.

large scale - hybridization, restriction enzyme 처리 등은 대량의 순수 DNA가 필요하다. 액체배지에 진탕하여 배양한다.

## 5) 방 법

## (1) 균의 순수 배양

사면 배지, 액체배지 + 진탕, No culture

## (2) Cell wall 파괴

물리적 방법 - glass bead, cryo-grinding, boiling

enzyme - 일관성이 없다, 비싸다

## (3) DNA 분리

Phenol -chloroform-ethanol

commercial kit-silica membrane 또는 spin column

## 참 고 문 헌

1. 김정애. 피부사상균의 배양, 동정 및 특수 검사. 대한의진균학회 제 1차 workshop 초록집, 1998, pp 9-29
2. 서순봉, 김기홍, 방용준. 가검물 채취 및 배양. 의진균학. 대학서림, 서울 1994, pp 179-197
3. 이종서, 이광훈. 조갑진균증의 진단방법에 관한 비교 연구. 대한피부과학회지 1995; 33: 467-473
4. 권윤희, 조백기. 조갑진균증의 진단에 있어 KONCPA 검사의 임상적 의의. 대한피부과학회지 1996; 34: 527-537
5. Kane J, Summerbell R. Dermatological mycology: Examination of skin, nails, and hair. In Laboratory handbook of dermatophytes. Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G, Star Publishing Co., 1997, pp 33-44

● 연자 소개 ●

성 명 : 최 종 수 (崔宗壽)

생년월일 : 1954년 1월 4일

1979년

연세의대 졸업

1983년

피부과학 전문의 취득

1983년 ~ 2003년 현재

영남대학교 피부과학 교실 교수

1988년

의학박사 취득

1990년 ~ 1991년

미국 University of California San Francisco 분교 연수

1997년 ~ 1998년

미국 Center for Disease Control & Prevention 연수

## Workshop 2

# Molds의 동정 - 기회감염을 일으키는 사상균을 중심으로 -

결핵연구원

김 신 옥

## 1. 서 론

### 1. Molds

진균 (Fungi)은 종속영양으로 생활하는 진핵생물 (Eukaryotes)이며, 편모 (flagella)나 광합성 요소인 엽록소 (chlorophyll)을 가지고 있지 않으면서 포자로 증식한다.

현재까지 100,000가지 이상의 진균들의 종 (species)이 보고되어 있으며, 사람에게 병을 일으키는 것으로 보고된 것은 275종이 넘는다.

진균을 형태학적으로 보면 크게 두 가지로 나눌 수 있다.

#### 1) Molds (moulds, filamentous fungi)

사상균이라고도 하며 균사 (hyphae)라고 불리는 분지하는 (branching) filaments를 가진다.

#### 2) Yeasts

효모 또는 yeast-like fungi라고 불리며, 포자는 발아하여 구형 또는 elongated single cells (budding)을 가지며, moist, 점성의 균집락을 형성한다.

### 2. 사상균의 분류학적 위치 (Classification)

#### 1) The Five Kingdoms (계) of Organism (Margulis, 1974)

Monera-Prokaryotes (bacteria, actinomycetes, blue green algae)

Protista-Eukaryotes, (protozoa, water or slime molds)

**Fungi**-Eukaryotes, (yeast, molds, rusts, mushrooms)

Plantae-Eukaryotes, (mosses, plants)

Animalia-Eukaryotes, (worms, arthropods, mammals)

#### 2) Fungi (계)

Zygomycota (문)

Ascomycota (문)

Basidiomycota (문)

**Deuteromycota (문): Fungi imperfecti**

#### 3) Deuteromycota (Fungi imperfecti)

Blastomycetes (강): *Cryptococcus*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*

Coelomycetes (강): *Phoma*

**Hyphomycetes** (강): Moniliaceae: *Aspergillus, Penicillium, Acremonium, Fusarium*

Dematiaceae: *Cladosporium, Curvularia, Phialophora, Exophiala*

### 3. 사상균동정을 위한 준비단계

#### 1) 순수배양 (purification of culture)

임상검체로부터 1차 분리 배양된 균들은 박테리아나 효모 (yeast), 사상균들이 섞여 자라게 된다. 먼저 이들 효모나 박테리아로부터 동정하고자 하는 사상균을 순수분리해야 하며, 순수분리하기 위해서는 멸균된 백금이를 가지고 균집락의 표면 (conidial heads, hypha)을 살짝 건드려서 준비된 Sabouraud's agar 배지면에 streaking하여 분산시킨다.

오염정도가 심하거나, 서로 엉켜 혼합배양이 된 경우에는 순수배양된 균을 얻기 위해서 위의 과정을 여러 번 반복하거나 희석배양을 해야 하며, 매일 균집락의 모양을 살피면서 순수배양된 균인지를 확인해야 한다.

#### 2) Bacteria가 아닌지 확인

어떤 bacteria는 yeast와 아주 비슷한 smooth, pasty, 또는 shiny, dull surface, yeasty의 균집락을 보일 때가 있는데 그런 경우에는 lactophenol cotton blue wet mount로 염색하여, 현미경하에서 bacteria가 아닌지를 구별하여야 한다.

#### 3) Actinomycetes가 아닌지 확인

Actinomycetes는 균집락이 작고, dry, wrinkled, powder의 모양을 띠게 되므로 이런 모양을 보이는 균집락은 lactophenol cotton blue wet mount로 염색하여, 현미경하에서 Actinomycetes의 특징적인 thin, branching filaments (직경이 1.0 μm 이하)가 아닌지를 구별하여야 한다.

#### 4) 사용되는 배지

Cornmeal agar, Potato dextrose agar, neutral Sabouraud Dextrose agar, Malt extract agar, Czapek-Dox agar

## II. 사상균의 동정

일단 순수분리된 균이어야 하며 사상균을 동정하기 위한 1단계는 육안적 관찰로서 균의 성장속도, 균집락의 형태, 색깔, 배지의 뒷면, texture, diffusible pigments, exudates, growth zones, aerial or submerged hyphae, colony topography, hard mass of cells 등을 관찰, 기록하면서 이 단계를 통해 어떤 균일지 추정할 수 있으며, 2단계로 lactophenol cotton blue wet mount로 염색하여, 현미경하에서 포자의 종류, 색깔, 크기, 포자형성, 등의 여러 가지 특징을 관찰 기록하면서 분류학의 key를 참고로 하여 동정을 하게 된다.

### 제1단계: 육안적 관찰

#### 1. 균집락의 형태와 색깔

균집락의 형태는 효모들에서보다는 사상균의 동정에 더 유용한 요소이다.

wooly 또는 velvety 등의 texture와 균집락 표면의 색깔과 아울러 균의 이면 (reverse)의 색깔도 중요한 요소이다.

균집락의 색깔은 cream/yellow, orange/salmon, purple/pink, green, greenish black, light sand brown 등 다양하며, 균집락의 topography는 flat powdery/suede, flat loosely cottony, domed, densely cottony, heaped, wrinkled, mostly sub-agar growth 등 다양하다.

예를 들면 균집락의 색이 dark-olive에서 점차 black으로 변하면서 솜털 (fluffy)모양의 균집락을 보이면 흑색사상균 (Dematiaceous hyphomycetes)일 가능성이 높다.

균집락의 형태에서 먼저 고려되어야 하는 것이 효모 (yeast)와 사상균의 차이인데, 대개의 경우 효모는 크립과 같은 균집락의 형태를 가지는 것이 사상균과 다른 특징인데 예외적으로 *Geothichum*, *Aureobasidium*, *Exophiala*, *Sporothrix schenckii* 등은 처음 분리될 때는 cream-colored이나 점차 black color를 띠는 yeast-like colonies를 가지는 molds인데, 계속해서 subculture하게 되면 균사 형태로 자라게 된다.

육안으로 보는 균집락의 형태는 이와 같이 다양하며, 이것은 어떤 특정 균에 항상 적용되는 것이 아니고 균을 배양할 때 사용되는 배지의 종류에 따라서 언제든지 달라질 수 있다. *Coccidioides immitis*가 다양한 균집락 형태를 나타내는 대표적인 예이다.

### 2. 발육속도 (growth rate)

균집락의 발육속도는 크게 신속발육 (fast-growing), 중등발육 (moderate-growing), 지연발육 (slow-growing)으로 크게 나뉘며 발육속도가 명확하게 구분되어 있는 것은 아니지만 신속발육은 대개 5일~일주일 이내에 full growth되는 것을 말하며, 중등발육은 6~13일 이내에, 지연발육은 14일 또는 그 이상 지나야 발육하는 것을 말한다.

균의 발육속도는 어떤 병원균인지를 찾아내거나 동정하려고 할 때 유용하게 이용될 수 있다. 예를 들면 현미경 관찰에서는 *Histoplasma capsulatum*과 유사하다고 생각되는데 만약 이 분리균이 2일 이내에 적당한 크기의 균집락으로 자란다면 *H. capsulatum*이 아닐 가능성이 높아진다. 이와 같이 발육속도가 균동정에 필수적이지만 접종된 균의 양, 사용되는 배지, 배양온도에 따라 많은 차이를 보일 수 있다.

대부분 병원성 진균은 30~32°C에서 잘 자란다.

### 3. 이형성 (dimorphism)

이형성은 병원성 진균을 동정하는데 아주 유용한 기준이 된다.

대개의 이형성 진균은 37°C에서 효모의 형태를 나타내고 25~30°C에서는 균사 형태를 보이는 것으로 *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*가 전형적인 이형성 균들이다.

### 4. 발육온도

균의 발육온도는 진균을 동정하는데 아주 중요한 기준이 되며, 같은 속 (genus)에서도 종에 따라 달라지며, 같은 종 내에서도 thermotolerance가 서로 다른 경우가 있다. 예를 들면 *Cladosporium bantianum*은 42~43°C의 온도에서도 균이 자라므로 다른 *Cladosporium spp.* (*C. carrionii*)과 구별이 가능하다. 또한 *Aspergillus*의 다른 종들은 48°C에서는 다 살지 못하는데 *Aspergillus fumigatus*는 48°C에서도 잘 자란다.

## 제 2단계: 현미경 관찰

lactophenol cotton blue wet mount 또는 slide culture preparation.

### 1. 포 자

포자의 종류가 유성생식 형태 (teleomorph) 또는 무성생식 형태 (anamorph)로 생산된 것인지에 따라 균동정에 영향을 미친다.

같은 종 안에서 포자의 특징은 현미경으로 볼 때는 사용된 배지에 따라 거의 차이가 없다.

#### 1) 포자의 종류

##### (1) 무성생식포자 (Asexual spores)

분아포자 (blastospores)-*Cladosporium spp.*, *Candida spp.*

분절포자 (arthrospores)-*Coccidioides immitis*, *Geotrichum*

후막포자 (chlamydospores)-*Candida albicans*

<대분생자 (macroconidia), 소분생자 (microconidia)-*Microsporium*, *Trichophyton* >

##### (2) 유성생식포자 (Sexual spores)

자낭포자 (Ascospores)-*Pseudallescheria boydii*

담자포자 (Basidiospores)-*Filobasidiella neoformans*

접합포자 (Zygospores)-*Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*

#### 2) cells per spore

특징: 한 개, 1~2, >2, all septa transverse, >2, some septa oblique or longitudinal

### 2. 포자의 색깔

특징: no color, green, brown/black

### 3. 포자형성 (spore formation)

무성포자를 가지고 있는 진균 (asexual fungi)을 속 (genus) 수준에서 동정하기 위해서는 포자의 모양이나 크기가 중요할 뿐 아니라 포자형성방식 (manner of sporulation)이 더욱 중요한 기준이 된다. 예를 들면 *Helminthosporium*와 *Bipolaris*는 균집락의 형태나 포자의 모양으로 보면 서로 아주 비슷하지만 포자형성방식에서는 각각 차이가 있음에도 불구하고 종종 같은 균으로 잘못 동정되는 경우가 있다.

특징: fragmentation of hyphae, singly at any one point, in succession (forming chains), in succession (forming clusters), inside large (>50 μm) structure

### 제3단계: 생화학적 검사 (biochemical tests)

피부사상균을 제외한 일반 사상균의 동정에 있어서는 생화학적인 검사들이 효모에서처럼 중요한 지표로서 사용되지는 않지만 진단을 목적으로 하는데 사용되는 생화학적 검사방법으로는 *Trichophyton mentagrophytes*와 *T. rubrum*을 구별하는데 사용되는 urease test가 있고, gelatin hydrolysis test는 *Cladosporium*이 병원성균인지 부생성 (saprophytic)균인지를 알고자 할 때 사용한다. 그밖에도 병원성 dematiaceous fungi를 최종 동정하기 위해서 tyrosine, xanthine, casein, starch의 가수분해능을 검사하기도 하며, 부수적으로 Cycloheximide resistance를 보기도 하는데 Cycloheximide (0.5 mg/ml)를 첨가한 배지에서 *Aspergillus*, *Pseudallescheria boydii*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium*, *Candida*, *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*

등의 성장이 억제된다.

### III. 사상균 동정을 위한 GUIDELINES

#### 1. 균집락의 형태적인 관찰

- 1) 균집락이 양털모양 (wooly)이고, 신속발육 (fast-growing), 7일 이내에 petri dish의 뚜껑까지 꽉 채우면: *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, *Mucomycetes*
- 2) 균집락의 색깔이 white to gray, gray-brown, or black이고
  - ㉠ 양털모양 (wooly)이고, 신속발육 (fast-growing), 배지의 뒷면이 dark shade or black이면: *Alternaria spp.*, *Helminthosporium spp.*, *Curvularia spp.*
  - ㉡ 편평 (flat)하며, velvety, black, 신속발육 (fast-growing), 배지의 뒷면이 black이면: *Cladosporium spp.*
  - ㉢ 지연발육 (slow-growing), suede aerial mycelia, olive-black to black 배지의 뒷면이 black이면: *Cladosporium spp.*, *C. carrionii*, *C. bantianum*, *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compactum*.
  - ㉣ 신속발육, 처음에는 white and wooly, 점차 grayish white로 변하면서, 배지의 뒷면이 black이면: *Allescheria boydii*.
  - ㉤ 신속발육, 처음에는 white and thin, 점차 yellowish, 나중에는 black으로 변하면: *Aspergillus niger*.
  - ㉥ Very slow-growing, compact colonies, gray or black, 짧고 양털모양의 기중균사 (aerial hyphae), 배지의 뒷면이 black이면: *Madurella grisea*.
  - ㉦ Very slow-growing, black colonies have a dark brown diffused pigment, 배지의 뒷면이 black이면: *Madurella mycetomii*.
  - ㉧ 중등발육 (moderately fast-growing), 양가죽모양 (suede)의 기중균사, gray-black to black, cream모양의, 배지의 뒷면이 black이면: *Phialophora jeanselmei*, *Cladosporium werneckii*, *Aureobasidium pullulans*, *Fonsecaea dermatitidis*.
- 3) 신속발육, brightly colored with suede to wooly mycelia이면: *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Trichoderma spp.*
- 4) 만약, 양털모양으로부터 양가죽모양에 이르기까지, whitish, 배지의 뒷면이 다양한 색깔을 띠면서:
  - ㉠ slow-growing and buff이면: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*.
  - ㉡ moderately fast-growing이면: *Coccidioides immitis*, *Geotrichum spp.*, *Chrysosporium spp.*, *Sepedonium spp.*
- 5) Powdery or granular clones, various shades of white, yellow, purple, brown이면: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum spp.*, *Trichopyton spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Chrysosporium spp.*
- 6) Small glabrous colonies in shades of light brown to black, 배지의 뒷면이 black이면: *Sporothrix schenckii*, *Geotrichum spp.*, *Cephalosporium spp.*

#### 2. 현미경 관찰

- 1) Non septate hyaline, wide hyphae, 다양한 크기의 포자낭 (sporangia)-Mucormycetes:



- ① Sporangia and columella present, without rhizoids: *Mucor spp.*
- ② Sporangia and columella, and rhizoids present with nodal sporangiophores: *Rhizopus spp.*
- ③ Sporangia and columella, and rhizoids present, with internodal sporangiophores: *Absidia spp.*
- 2) Septate, branching hyphae; either conidia or hyphae, or both, tan to dark brown - Dematiaceous fungi:
  - ① Large, dark, septate conidia with thin or thick walls; septa in one or two lanes: *Alternaria spp.*, *Helminthosporium spp.*, *Stemphylium spp.*, *Curvularia spp.*
  - ② Large, dark, single conidia: *Nigrospora spp.*
  - ③ Large numbers of small conidia arranged in branching, budding heads: *Cladosporium spp.*, *Fonsecaea spp.*
  - ④ Vase-shaped conidiophores로부터 Conidia가 생산: *Phialophara verrucosa*, *Fonsecaea spp.*
  - ⑤ Thick, large, black cells forming the hyphae,  
그 중 일부는 light-colored blastospores를 생산: *Aureobasidium pullulans*.
- 3) Septate, branching, hyaline hyphae:
  - ① 특징적인 분생자두 (conidial heads)의 모양: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Sco-pulariopsis spp.*
  - ② Conidiophores, terminating in clusters of conidia: *Fusarium spp.*
  - ③ Conidia borne individually on hyphae: *Sepedonium spp.*, *Monosprium spp.*
  - ④ Hyphae forming large numbers of rthrospores: *Geotrichum spp.*
  - ⑤ Dark, large bodies scattered through the hyapal groth: *Chaetomium spp.*, *Phoma spp.*

## 참 고 문 헌

1. Barron GL. The genera of Hyphomycetes from soil. Huntinton: Robert E. Krieger Co., 1977
2. Doory YA. Laboratory Medical Mycology. Philadelphia: Lee & Fibiger, 1980
3. Evans EG, Richardson MD. Medical Mycology; A Practical Approach. Oxford: IRL Press, 1989
4. Hoog GS, Guarro J. Atlas of Clinical Fungi. Baarn and Delft: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995
5. Isenberg HD. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington D.C.: American Society for micro biology, 1992
6. Koneman EW, Roberts GD, Wright SF. Practical Laboratory Mycology (2nd). Baltimore: Williams & Wilkins, 1978
7. Kwon-chung KJ, Bennet JE. Medical Mycology. Philadelphia: Lee & Fibiger, 1992
8. Larone DH. Medically Important Fungi (3rd); a Guide to Identification. Washington D.C.: American Society for microbiology, 1995
9. McGinnis MR. Laboratory Handbook of Medical Mycology. New York: Academic Press, 1980
10. Moore GS, Jaciow DM. Mycology for the Clinical Laboratory. Reston: Reston publishing Co., 1979
11. Raper KB, Fennell DI. The Genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1965

● 연자 소개 ●

성 명 : 김 신 옥 (金 信 玉)

생년월일 : 1957년 10월 25일

1980년 2월

건국대학교 생물학과 졸업

2000년 2월

중앙대 생물학과 미생물진공 석사

1980년 3월 ~ 현재

결핵연구원 미생물부 연구원

# Malassezia 균종의 육안 및 현미경적 소견

건국대학교 의과대학 피부과학교실

## 안 규 중

1996년 Guého 등은 분자생물학을 기본으로 하여 형태학, 미세구조학 및 생리학을 이용하여 *Malassezia* 속을 7개 균종으로 분류하였다. 즉, 기존에 분류된 *M. pachydermatis* (Weidman) Dodge 1935 및 *M. sympodialis* Simmons & Guého 1990 이외에 표준균종인 *Malassezia furfur* (Robin) Baillon 1889에서 새로 분리 분류된 신균종은 *M. globosa* Midgley, Guého & Guillot 1996, *M. obtusa* Midgley, Guillot & Guého 1996, *M. restricta* Guého, Guillot & Midgley 1996 및 *M. slooffiae* Guillot, Midgley & Guého 1996 등 4개 균종이다.

1987년 영국 Leeds 대학교의 Leeming과 Notman이 정상 피부에서 본 효모균을 배양하는데 가장 적합한 배지를 배합하였다. 이 배지는 glycerol monoesterate, bacteriological peptone, glucose, yeast extract, ox bile, agar No. 1, Tween 60, glycerol, cycloheximide, chloramphenicol 및 초고온 멸균 비탈지 우유를 포함한다. 이후 소개되는 각 균종의 배양 소견은 Leeming과 Notman 배지에서의 소견이다.

*M. furfur* (좁은 범위의 *M. furfur*)는 배양 시 비교적 크고 둔탁하고 부드러운 표면을 가진 용기된 원형 집락을 형성한다. 효모세포는 대부분의 균주에서 원형 또는 타원형으로 비교적 크며, 모세포로부터 넓은 기저면을 형성하면서 낭세포를 형성하지만, 일부 균주는 타원형의 크기가 작은 효모세포를 형성하여, 앞으로 분리 분류될 가능성을 시사한다. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 Catalase 검사에 양성이고, 0.5% Tween 60이나 0.1% Tween 80을 유일한 지질성분으로 첨가한 glucose/peptone 배지에서도 성장한다.

참고로 *M. furfur*는 Baillon이 1889년에 최초로 명명한 *Malassezia* 속의 표준균종으로 이후 오래 동안 *Malassezia* 속 효모균의 군사상을 총칭하여 왔으며, 1925년 Weidman에 의하여 동물에서 주로 발견되고 지질화합성이지만 비지질의존성인 *Pityrosporum pachydermatis* (후에 1935년 Dodge가 *Malassezia pachydermatis*로 명명)가 분리된 이후에는 사람에서 주로 발견되는 지질의존성 군사상을 칭하여 왔다. 1986년 *Pityrosporum* 속으로 분류하였던 효모상과 통합된 이후에는 군사상과 효모상 모두를 칭하게 되었다. 1990년 Simmons와 Guého가 *M. furfur*로부터 *M. sympodialis*를 분리 분류하고, 1996년 Guého 등이 *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* 및 *M. slooffiae* 등 4개 균종을 다시 분리 분류하면서 이제 *M. furfur*가 칭하는 균주의 범위는 더욱 축소되었다. Guého 등이 *Malassezia* 속의 균종들을 7개 균으로 구분하면서 그 중 한 균을 택하여 *M. furfur*로 한 것은 그들의 연구에 사용되었던 *Pityrosporum ovale*와 *M. furfur*의 신표준균종 (neotype species)이 그 균에 속하였기 때문이다. 결국 *M. furfur*는 과거 *Malassezia* 속의 상당부분 즉 지질의존성 균주 모두를 지칭하였으나 재분류로 인하여 그 범위가 축소되어 이제는 일부분만을 지칭하게 되었다.

*M. pachydermatis*는 배양 시 비교적 작고 부드러운 원형의 크림색 집락을 형성한다. 집락 주위의 배지는 혼탁해 진다. 현미경적으로 원통형의 소형 효모세포로 넓은 기저면에서 낭세포를 형성한다. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 Catalase 검사에 양성이고, 다른 *Malassezia* 균종들과 달리 지방성분을 첨가하지 않은 glucose/peptone 배지에서도 잘 성장하는데, 지방성분이 첨가되면 더 잘 성장한다.

*M. sympodialis*는 1990년 Simmons와 Guého가 *M. furfur*로부터 분리 분류한 균종으로, 배양 시 비교적 크고 광택이 있으며 부드럽고 편평한 표면을 가진 크림색의 부드러운 톱니 모양의 원형 집락을 형성한다. 현미경적으로 타원형 또는 원형의 대형 효모세포로 넓이가 모세포보다 작으나 낭세포와는 같은 기저면을 형성하며, 효모세포에 통상적인 반복적 아포형성 (repetitive budding) 이외에 본 균종에 특징적인 sympodial budding을 보인다. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 Catalase 검사에 양성이고, 0.5% Tween 60이나 0.1% Tween 80을 유일한 지질성분으로 첨가한 glucose/peptone 배지에서 성장한다. Guého 등은 본 균종이 Tween 20을 유일한 지질성분으로 10%로 첨가할 경우 성장하지 않는다고 하였는데 실제로, Tween 20을 10%로 첨가할 경우는 고형화가 되지 않아 이용에 어려움이 있다.

*M. globosa*는 1996년 Guého 등이 새로 분리 분류한 균종으로 배양 시 비교적 작고 색조가 옅은 용기된 평편하면서 중심부가 돌출된 톱니모양의 원형 집락을 형성하며 집락 주위의 배지는 투명해진다. 일부 균주는 색조가 약간 짙고 용기된 원형 집락을 형성하기도 하여 앞으로 분리 분류될 가능성이 있다. 현미경적으로 원형의 대형 효모세포로 좁은 기저면에서 낭세포를 형성하는데, 일부 낭세포는 길게 자라면서도 기저면은 계속 낭세포보다 좁아져 있는 특징적 양상을 보인다. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 Catalase 검사에 양성이고, 0.5% Tween 60이나 0.1% Tween 80을 유일한 지질성분으로 첨가한 glucose/peptone 배지에서 성장하지 않는다. 본 균종은 37°C에서는 잘 성장하지 않는다.

*M. obtusa*는 역시 1996년 Guého 등이 새로 분리 분류한 균종으로 배양 시 비교적 작고 부드러운 편평하며 끈적이는 원형 집락을 형성한다. 현미경적으로 타원형의 대형 효모세포로 넓은 기저면에서 낭세포를 형성한다. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 Catalase 검사에 양성이고, 0.5% Tween 60이나 0.1% Tween 80을 유일한 지질성분으로 첨가한 glucose/peptone 배지에서 성장하지 않는다. 본 균종은 보통 37°C에서 잘 성장하여 *M. globosa*와 감별하는데 이용된다.

*M. restricta*는 역시 1996년 Guého 등이 새로 분리 분류한 균종으로 배양 시 비교적 작고 용기된 원형의 둔탁한 백색 집락을 형성한다. 집락 주위의 배지는 혼탁해지며 간혹 투명층을 형성하기도 한다. 현미경적으로 원형 또는 타원형의 소형 효모세포로 좁은 기저면에서 낭세포를 형성한다. 다른 *Malassezia* 균종들과 달리 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 Catalase 검사에 유일하게 음성이고 0.5% Tween 60이나 0.1% Tween 80을 유일한 지질성분으로 첨가한 glucose/peptone 배지에서 성장하지 않는다.

*M. slooffiae*는 역시 1996년 Guého 등이 새로 분리 분류한 균종이다. 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 Catalase 검사에 양성이고, 0.5% Tween 60을 유일한 지질성분으로 첨가한 glucose/peptone 배지에서 성장하지만 0.1% Tween 80을 유일한 지질성분으로 첨가한 glucose/peptone 배지에서는 성장하지 않는다.

## 참 고 문 헌

1. 안규중. *Malassezia* 속의 계통 분류. 의진균지 1998; 3: 81-88
2. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-355
3. Leeming JP, Notman FH. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2017-2019

## ● 연자 소개 ●

성 명 : 안 규 중 (安圭重)

생년월일 : 1954년 4월 19일

1978년 2월	서울대학교 의과대학 졸업
1983년 2월	서울대학교병원 피부과 전공의 수료
1984년 8월	서울대학교 대학원 의학박사 취득
1994년 9월 ~ 1995년 8월	영국 리즈대학교 의진균학 연수
1998년 6월 ~ 2002년 6월	대한의진균학회 학술이사
2002년 10월 ~ 현재	대한피부과학회 윤리법제이사
1991년 4월 ~ 현재	건국대학교 의과대학 조교수, 부교수, 교수
2002년 4월 ~ 현재	건국대학교 의료원 기획조정실장