

대한의진균학회

제7차 Workshop 초록

● 일 시 : 2007년 11월 3일(토)

● 장 소 : 서울 건국대학교병원 대강당(지하 3층)

▶ 주제 : 표재성 진균증의 동정 ◀



주최 : 대한의진균학회
대한피부과학회 피부진균연구회

대한의진균학회

제7차 Workshop 초록

● 일 시 : 2007년 11월 3일(토)

● 장 소 : 서울 건국대학교병원 대강당(지하 3층)

▶ 주제 : 표재성 진균증의 동정 ◀



주최 : 대한의진균학회
대한피부과학회 피부진균연구회

대한의진균학회 제7차 Workshop 진행계획표

시 간	내 용
13 : 00 – 13 : 30	등 록
13 : 30 – 13 : 40	개회식 조백기 교수 (가톨릭의대)
13 : 40 – 14 : 10	연제발표 좌장 : 김기홍 교수 (영 남 의 대) Dermatophytes 동정 최종수 교수 (영 남 의 대)
14 : 10 – 14 : 40	연제발표 좌장 : 노병인 교수 (관 동 의 대) <i>Candida</i> 동정 이미경 교수 (중 앙 의 대)
14 : 40 – 15 : 10	연제발표 좌장 : 안규중 교수 (건 국 의 대) <i>Malassezia</i> 동정 이양원 교수 (건 국 의 대)
15 : 10 – 15 : 30	Coffee break
15 : 30 – 17 : 30	실습 (13층 연구실) 전체를 4조로 나누고 다음의 4가지 주제로 20분씩 <i>Malassezia</i> 동정 (실습) 이양원 (건 국 의 대) 분자생물학적 동정 (실습) 이양원 (건 국 의 대) <i>Candida</i> 동정 (실습) 이미경 (중 앙 의 대) Dermatophytes 동정 (실습) 최종수 (영 남 의 대)
17 : 30 – 17 : 40	질의 및 응답 좌장 : 유희준 이사장 (한 양 의 대)
17 : 40 – 17 : 50	폐회식

Workshop 1

Dermatophytes 동정

영남대학교 의과대학 피부과학교실

최 종 수

목 적

지역 분포
균종의 유입
균종의 변화: 증감, 소멸
균종의 이동: 동물 → 사람, 사람 → 사람, 동일 개체 내 이동

방 법

진균 배양
형태관찰 (colony 육안관찰, 현미경 관찰)
생리학적 검사
분자생물학적인 방법

Taxonomy of fungus

Class	Hyphae	Sexual spore	Asexual spore
<i>Zygomycetes</i>	aseptated	zygospore	sporangium
<i>Ascomycetes</i>	septated	ascospore	conidium
<i>Basidiomycetes</i>	septated	basidiospore	conidium
<i>Deuteromycetes</i>	septated	not found	conidium

Dermatophytes는 ascomycetes에 속한다.

유성세대 Anamorph - asexual stage

Telomorph - sexual spore: ascospore: + or -

예) *T. mentagrophytes*

var *mentagrophytes* *Arthroderma behamie*

var *erinacei*

var *interdigitale* *Arthroderma vanbreuseghemii*

우리나라에서 확인된 백선균

서순봉 (1976~1995)

T. rubrum 81.7%, *T. mentagrophytes* 5.8%, *M. canis* 5.7%

E. floccosum 1.0%, *T. verrucosum* 0.6%, *M. gypseum* 0.2%
M. ferrugineum 0.04%, *T. tonsurans* 0.03%, *T. violaceum*

최근

Very common: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*

Common : *M. canis*, *M. gypseum*

Rare : *T. tonsurans*, *E. floccosum*, *T. verrucosum*

Very rare : *T. violaceum*, *M. ferrugineum*, *T. schoenleinii*

1. 배지

일반용도

Sabouraud dextrose agar (SDA), Mycosel agar

Potato dextrose agar (PDA): conidiation 촉진

Cornmeal with Tween 80: conidiation 촉진, *T. rubrum*의 붉은 색

Dermatophyte test medium (DTM): phenol red

특수 용도

Christensen urea agar

Trichophyton agar #1 - #7 (Difco)

Takashio medium (Diluted Sabouraud medium): 교배용

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

1986년 경북의대 서순봉 교수님이 개발

SDA -균은 잘 자라나 동정에 필요한 착색이 나타나지 않음

백선균 동정에 적합하다.

T. rubrum -특유의 붉은 색, KOH/증류수 흡수

분색자를 잘 형성

*T. mentagrophytes*의 아형 구분

융모변성 억제

C. albicans 후막포자 촉진

조성

Potato dextrose agar (Oxoid) 20g, Corn meal agar (Difco) 20g

Peptone 4g, Tween 80 6 ml, 증류수 1L

2. 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 cycloheximide: 배지가 충분히 식은 후 (60℃) 첨가한다

3. 보관 방법

1주 이내에 사용한다. 3주가 지나면 폐기한다
마르지 않도록 밀봉하여 4℃에서 보관

4. 진균배양을 위한 진균검사물 채취 방법

Aseptic technique을 사용한다.

살아 있는 균이 있는 곳을 선택한다: 환상병소의 가장자리, 조갑 및 모발의 근위부
많은 양을 채취

5. 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.

6. False negative (배양이 안되는 경우)

접종한 균이 적을 때
죽은 균, 항진균제 치료 중
접종을 잘못된 경우 배지 접촉 안됨, 뜨거운 칼
나쁜 배지: 오래된 배지, 조성이 잘못, 배지선택 잘못
마개를 꼭 막아 질식
온도가 맞지 않을 때: 고온, 저온
contamination: 백선균이 자라기 전에 배지 전체를 덮는다.
세균에 오염

7. Contamination을 줄이는 방법

여러 병소에서 동시에 채취하여 배양, 여러 개의 tube에 배양
검사실 환경을 깨끗하게, mite 제거 -나프탈렌
오염된 배지를 사용하지 않는다.
배지를 만들 때 물기를 충분히 말려서 보관
평판배지 보다는 tube를 사용한다.
Cycloheximide, 항생제 등을 첨가한 배지 사용
칼 소독, 병변을 알코올로 소독한 후 가검물을 채취

8. Pathogen과 contaminant의 구분

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.

Dermatophyte 동정

1. Colony의 육안적 관찰

성장속도

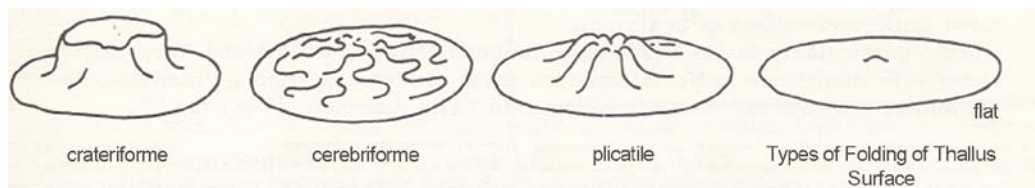
표면과 배면의 성상

색깔: 표면, 배면

Topography: Flat, raised, heaped

Texture: Smooth, fluffy, granular, suede, velvety

Pattern of folding: Cerebriform, craterform



2. 현미경적 관찰

Hyphae

Septation

Pattern: spiral, raquet, chandelier, nodular body

Pigmentation

Vesicles or swollen cells

Conidium (conidia): asexual reproduction ↔ spore


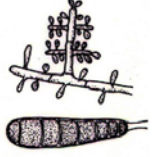
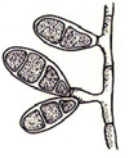
Macroconidia: Size, number of septum, shape, wall thickness, surface

Microconidia: Shape, group, 균사에의 부착 양상

3. 생리적 검사

모발천공 검사, Urease test, Growth factor requirement

Dermatophytes: 3 genus

	Macroconidia	Microconidia	Involved	
<i>Microsporum</i> spp.	numerous spindle-shaped thick walled spiny surface	numerous	skin, hair	
<i>Trichophyton</i> spp.	rare pencil or fusiform thin walled smooth surface	Numerous 균에 따라 특징적	skin, hair nail	
<i>Epidermophyton</i> spp.	numerous boat-shaped thick or thin walled smooth surface	not produced	skin, nail	

T. rubrum

성장속도: slow 14일

Colony 형태

표면: 솜털모양 (fluffy), white to buff

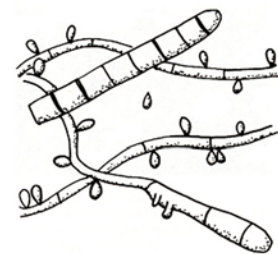
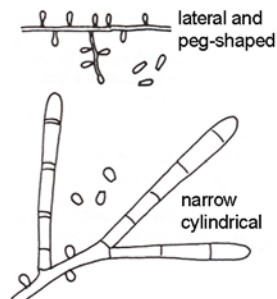
배면: 포도주색 >brown, yellow, no-color

현미경 소견

Microconidia: numerous to rare
tear-shaped, solitary along hyphae

"전기줄에 참새가 앉은 모양"

Macroconidia: rare, pencil-shaped

*T. mentagrophytes*

성장속도: moderate, 7~10일

종류

var *mentagrophytes*: zoophilicvar *interdigitale* : anthropophilic

Colony 형태: 매우 다양

zoophilic - 과립형 (granular)

anthropophilic - 음모형 (downy), 분말형 (powdery), 복숭아색형 (persicolor)

Powdery form: Radial or concentric fold

배면: brown > colorless, yellow, red

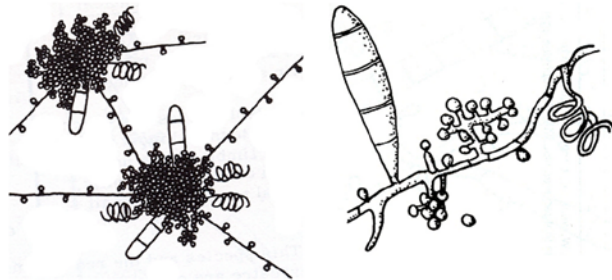
현미경 소견

Microconidia: very round, clustered

Coiled spiral hyphae

"포도송이와 덩굴"

Macroconidia: 가끔, thin walled



T. rubrum vs *T. mentagrophytes*

PDACT

붉은 포도주색

KOH 또는 증류수를 흡수: *T. rubrum*

현미경 소견

T. mentagrophytes: coiled hyphae, clustered microconidia

Hair perforation test: *T. mentagrophytes*: 양성

Urease test: *T. mentagrophytes*: 양성

Bacterially contaminated *T. rubrum*

T. raubischekii

T. tonsurans

성장속도: moderately slow, 12일

Colony 형태

Sulfureum 형: 황색조

Mahogany-red 형: 처음에는 선홍색 반점
이후 회색 분말, 탁한 붉은 색으로 변한다.

배면: Mahogany-red

현미경 소견

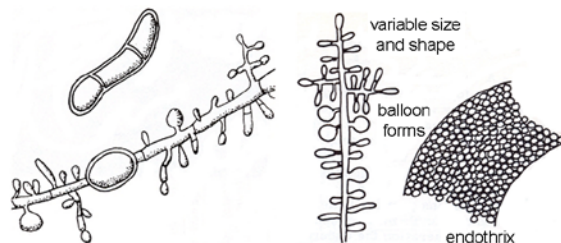
Micronidia: diagnostic

Variable: tear drop, 곤봉, 성냥알, balloon forms

Conidiophore: perpendicular to hyphae

May spiral coils

Physiologic test: thiamine dependent



T. verrucosum

성장속도: very slow 21~30일, 37도에서 더 잘 자란다

Colony 형태

Small, heaped, button-like > flat

Texture: glabrous > downy

White -> gray or yellow

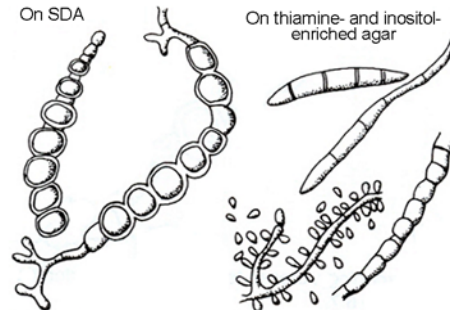
배면: various, 특징없다.

현미경 소견

염주양의 후막포자 (chlamidoconidia in chain)

Macroconidia: 쥐꼬리 모양

Physiologic test: Thiamin, inositol 필요



M. canis

성장속도: moderate, 6~10일 이내

Colony 형태

표면: whitish, fluffy, 방사상 주름

가장자리: 균사가 방사선상으로 퍼져나간다.

배면: deep yellow -> yellow brown

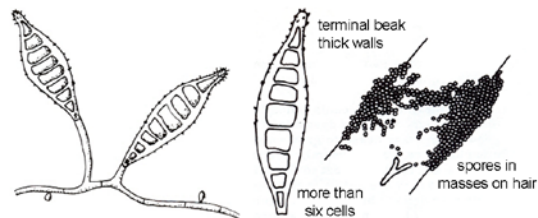
현미경 소견

Macroconidia: 풍부하다. 특징적

Long, spindle shaped, rough, thick walled

손잡이 (knob) 같은 끝, 6개 이상의 세포

Microconidia: a few



M. gypseum

성장속도: moderateley rapid, 6일 이내

Colony 형태

표면: flat, spreading, powdery to granular

Buff -> tan to cinnamon brown (등황색)

배면: variable

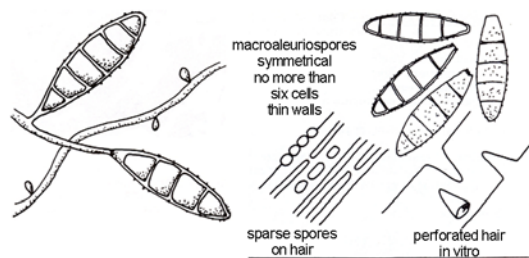
현미경 소견

Macroconidia: 매우 풍부, 특징적

Symmetrical, rough, thin walled, 6개 이내의 세포

끝부분: rounded <-> pointed *M. canis*

Microconidia: usually



E. floccosum

성장속도: moderately slow, 15일 이내

Colony 형태

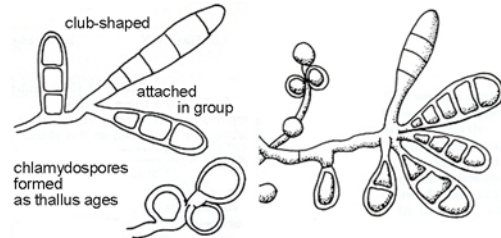
표면: brownish yellow to olive gray or khaki

Lumpy and sparse → folded, radial groove. velvety

수주 후 fluffy

배면: orange to brownish, 가끔 yellow border

Pleomorphism이 잘 생긴다.



현미경 소견

Macroconidia:

배양 초기에 발견된다.

Smooth, thin walled, club shaped, round ends

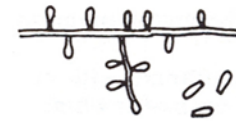
2-6 세포, single or clusters

Microconidia: no

요 약

1. Colony 색깔

포도주색:	<i>T. rubrum</i>
황 금 색:	<i>M. canis</i>
카 키 색:	<i>E. floccosum</i>
신 나 문:	<i>M. gypseum</i>



2. 성장 속도

빠르다

M. gypseum, *M. canis*

T. mentagrophytes

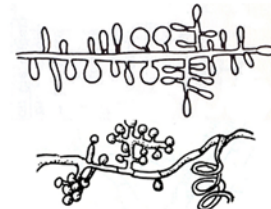
늦다

E. floccosum, *T. tonsurans*

매우 늦다

T. verrucosum, *T. violaceum*, *M. ferrugineum*, *T. schoenleinii*

T. concentricum, *T. yaundeii*, *T. soudanense*



참 고 문 헌

1. 서순봉, 김기홍, 방용준. 의진균학. 대학서림, 서울, 1994
2. 김정애. 피부사상균의 배양, 동정 및 특수 검사. 대한의진균학회 제 1차 workshop 초록집, 1998: 9-29
3. 김기홍. 피부사상균의 육안적 소견 및 현미경 소견, 대한의진균학회 제 3차 workshop. 의진균지 2001; 6: 179-185

4. 전재복. 백선균의 동정. 대한의진균학회 제 6차 workshop. 의진균지 2005; 10: 178-185
5. Rebell G, Taplin D. Dermatophytes. Their recognition and identification. University of Miami Press, Coral Gables, Florida, 1970
6. Larone DH. Medically important fungi. A guide to identification. 3rd ed. Washington: ASM, 1995: 161-181

● 연자 소개 ●

성명 : 최 종 수(崔宗壽)

생년월일 : 1954년 1월 4일

1979년 2월	연세대학교 의과대학 의학과 졸업
1988년 2월	연세대학교 대학원 박사
1979년 2월	의사면허증 취득
1983년 2월	진단검사의학과 전문의 취득
1990년 9월 ~ 1991년 3월	미국 캘리포니아대학 샌프란시스코분교 피부과 연구원
1997년 8월 ~ 1998년 7월	미국 질병관리예방센터(CDC) 연구원
1983년 4월 ~ 현재	영남대학교 의과대학 피부과학교실 교수

◆ 관심분야 ◆

의진균학

분자생물학

Workshop 2

Candida 동정

중앙대학교 의과대학 진단검사의학과

이 미 경

서 론

현재 *Candida* species에는 대략 200여종이 있으며, 사람에서 칸디다증을 일으키는 주요 균종으로는 *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* 등의 7가지가 있고, 최근 *C. dubliniensis*도 새로운 병원균으로 생각되고 있다. 이중 가장 중요하고 흔한 병원균은 *C. albicans*이지만 *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* 등의 균종도 의미있는 병원균으로 간주되고 있다 (Table 1). 또한 *C. glabrata*와 *C. krusei*는 fluconazole에 자연내성을 보이는 것으로 생각되고 있어, *Candida*는 균종별로 현재 사용 중인 항진균제에 대해 최소억제농도 (MIC)가 다른 것으로 알려져 있다. 즉 현재 대부분의 *Candida* 균종은 예측 가능한 감수성 유형을 보이고 있고, 항진균제 감수성을 확인하기 위한 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 표준 검사법을 임상 검사실에 도입하기에는 어려움이 있다는 이유로, 아직까지 일상적 항진균제 감수성 검사는 권장되지 않는다. 그러므로 치료 계획을 세우고 정확한 역학적 자료를 확보하기 위하여 보다 정확하고 신속한 *Candida*의 균종 동정이 요구되고 있다.

Candida species 분리와 동정을 위한 배지

배지는 나사 마개가 있는 시험관 (2.5×150 mm)이나 100 mm 직경의 배양접시에 조제한다. 평판배지는 넓은 표면을 이용할 수 있어 유용하다. 그러나 평판배지는 공기 중에 노출되기 때문에 연장된 배양기간 동안 건조에 견딜 수 있게 배지 두께가 두꺼워야 한다. 외부의 오염을 막고 병원성 사상균으로부터 검사실 직원을 보호하기 위하여 배지의 뚜껑을 기체가 침투할 수 있는 테이프 등으로 봉한다. 시험관 배지는 진균 분리를 위해서는 표면이 좁지만 안전하고 건조와 오염의 위험이 없다.

1. Sabouraud Dextrose Agar (SDA): 일차 분리에 사용되는 일반목적의 배지.
2. Brain Heart Infusion (BHI) agar: 효모균, 특히 *C. neoformans* 검출을 위한 강화배지. 일부 이상성 진균에서 사상형-효모형 전환에 사용될 수 있음.
3. Cornmeal agar: *C. albicans*에서 후막분생자 형성 (chlamydoconidium). *Trichophyton rubrum*에서 색소 생산.
4. *Candida* ID (bioMerieux), CHROMagar: *Candida* spp.의 선택과 감별 배지. 특징적인 색 발생으로 일부 균종을 동정.
5. Blood agar plate (BAP): *C. albicans*의 spiking 관찰 가능.

Table 1. Distribution of *Candida* species isolated from different clinical specimens

Specimen	No. of isolates							Total (%)
	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	Other	
Sputum	749	146	9	80	16	13	27	1040 (44.0)
Bronchial washing	204	42	194	31	8	1	9	489 (20.7)
Urine	103	171	9	49	21	1	4	358 (15.1)
Blood	60	21	12	28	56	1	2	179 (7.6)
Pus	26	8	4	5	15	0	4	63 (2.7)
Stool	35	9	0	4	10	0	1	59 (2.5)
Catheter tip	15	1	3	1	19	0	0	39 (1.6)
Oral cavity	19	2	0	2	0	0	2	25 (1.1)
Ear discharge	4	0	1	0	16	0	1	22 (0.9)
Ascitic fluid	8	4	0	0	4	0	2	18 (0.8)
Cervical discharge	12	1	0	3	0	0	0	16 (0.7)
Transbronchial lung biopsy	8	1	4	0	2	0	0	15 (0.6)
Vaginal discharge	7	0	0	1	0	0	0	8 (0.3)
CSF	4	3	0	0	0	0	0	7 (0.3)
Throat swab	5	1	0	0	0	0	0	6 (0.3)
Gastric juice	2	0	0	0	0	0	1	3 (0.1)
Other	11	3	0	0	2	0	1	17 (0.7)
Total	1272	413	236	204	169	16	54	2364 (100)

(신 등. 대한임상미생물학회지 2004; 7: 164)

6. Chocolate agar plate

검체의 선택, 채취 및 수송

진균 감염의 원인균을 성공적으로 분리하기 위해서는 적합한 검체 선택, 적절한 검체 채취 및 신속한 검체 수송이 이루어져야 한다. 검체에 원인 진균이 있다고 의심될 때 직접 현미경 검사 소견과 관계없이 진균배양이 이루어져야 하며, 검체가 현미경 검사와 배양 모두를 시행하기에 충분하지 못할 경우에는 검체 전부를 배양에 사용하여야 한다.

검체는 무균적으로 채취하여 새지 않는 살균된 용기에 넣어 2시간 이내에 검사실로 보낸다. 처리가 지연될 경우 정상적으로 무균인 검체들은 (예, 혈액, 골수, 뇌척수액, 또는 심부 검체) 37℃(37℃ 배양기가 없다면 35℃)에 배양하고, 세균의 오염 가능성이 있는 검체들은 (예, 피부 검체, 경기관 흡인액, 내이 흡인액, 및 결막 배양) 4℃에서 냉장 보관한다.

진균의 검출 기회를 높이기 위하여 가능한 경우 검체는 항진균제 투여 전에 채취한다.

일차 배양에서의 검사

진균 배양은 최소 4주간 배양하며, 배지는 첫 7일 동안은 매일 검사하고 그 이후에는 최소 일주일에 두 번 검사해야 한다. 배양이 시작된 첫 일주일 동안 매일 배지를 판독하여 진균 집락이 자랐는지 확인하고, 집락이 보이면 집락의 크기, 모양 및 색을 관찰한다.

Candida spp.의 분리를 위하여 의뢰된 생식기 부위나 점막 표면에서 얻은 검체는 7일 후에 버릴 수 있다. 효모균의 집락은 둥글거나 평탄하며 점액성 혹은 반죽 같거나, 거칠어 보이기도 하는데, 기중균사 등의 솜털 구조는 보이지 않는다.

일차 배양에서 분리된 *Candida*의 추정동정

*Candida*는 균종별로 azole계 약제와 amphotericin B와 같이 현재 사용 중인 항진균제에 대해 MIC가 다른 것으로 알려져 있으며, 특히 *C. albicans*는 fluconazole을 포함한 대부분의 항진균제에 감수성

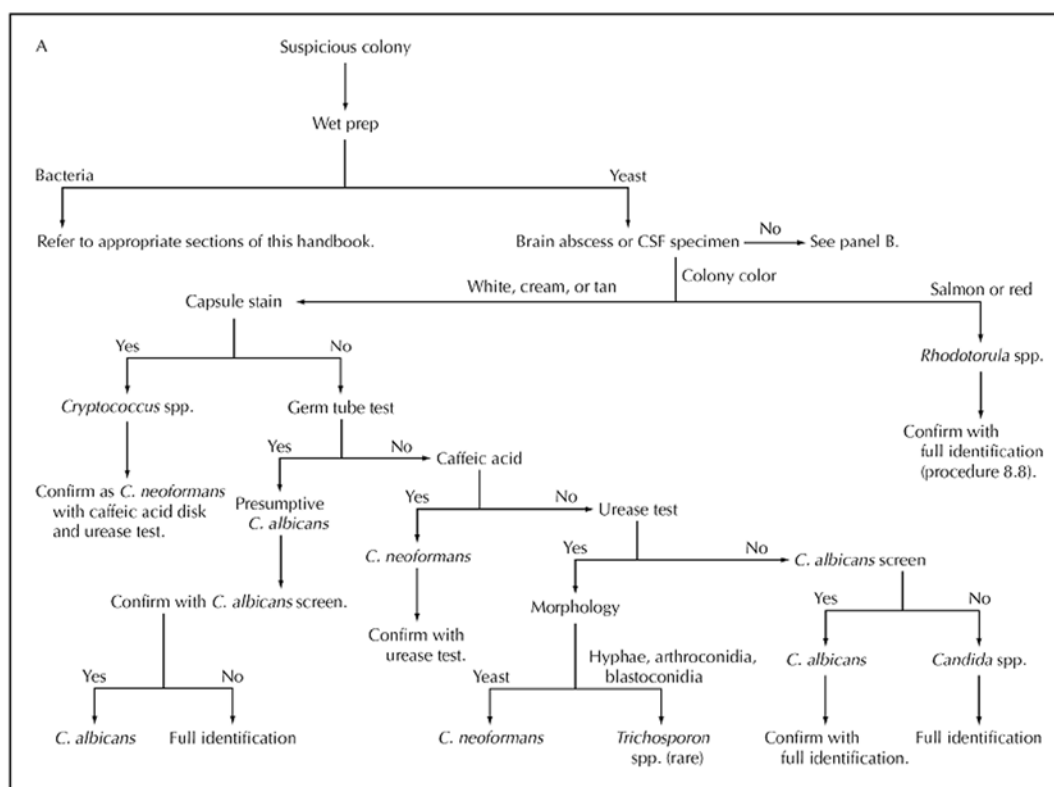


Fig. 1. Flowchart for evaluating a possible yeast species on primary culture (Examination and evaluation of primary cultures. In: Isenberg HD ed. Clinical Microbiology Procedures Handbook. 2nd ed. Washington DC, USA, ASM press, 2004: 8. 5. 5.).

을 보이고 있어 항진균요법을 위한 *C. albicans*의 신속한 추정 동정이 필요하다.

1. *C. albicans*의 추정 동정을 위한 신속검사법

1) 발아관 검사 (Germ tube test)

2) Spiking on BAP

3) CHROMagar

4) Cornmeal tween 80 agar

형태학적 특징(진균사나 가균사의 유무, 분아분생자, 후막포자 혹은 분절분생자)

5) 효소활성을 이용한 검사법

Albistrip (Lab M. Ltd., Bury, UK)

Murex *C. albicans* CA50 (Murex Diagnostics, Norcross, GA. USA)

6) 단클론 항체를 사용한 검사법

Bichro-latex albicans (Fumouze Diagnostics, Asnieres, France)

2. 효모균 추정 동정법

1) 발아관 검사

2) Spiking on BAP

3) CHROMagar

4) Cornmeal tween 80 agar

5) Rapid urease

6) Rapid nitrate reductase

7) Caffeic acid disk

8) Rapid trehalose assimilation

9) India ink

*Candida*의 균종 동정

효모균의 균종 동정에는 탄수화물 동화반응이 자주 이용되는데, 상품화된 제품인 API 20C (bioMérieux, France) 등은 탄수화물 동화 반응을 이용한 검사로서 전통적인 당 동화 수기법에 비해 편리하고 신속하며 비교적 정확하게 칸디다를 동정할 수 있다.

1. Carbon assimilation tests

1) API 20C test (bioMérieux, France)

2) Vitek Yeast Biochemical Card (bioMérieux, France)

3) YT microPlate (Biolog, CA)

2. Carbohydrate fermentation tests

Table 2. Fermentation reactions for some *Candida* spp.

Species	Fermentation reaction			
	Glucose	Maltose	Cellobiose	Sucrose
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-
<i>C. dubliniensis</i>	+	+	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	+	-	-	+(w)
<i>C. krusei</i>	+	-	o	-
<i>C. lusitaniae</i>	+	-	+	V
<i>C. parapsilosis</i>	+	-	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	+	-	+(v)

-, negative; +, positive; o, not tested routinely; v, rare negative; V, strain variation; w, weak

3. 분자생물학적 기법에 기초한 방법

1. Multilocus enzyme electrophoresis
2. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
3. Southern blot hybridization
4. 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)
5. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)
6. DNA 염기순서분석

● 연자 소개 ●

성명 : 이 미 경(李 美 暻)

생년월일 : 1965년 1월 18일

1990년 2월	중앙대학교 의과대학 의학과 졸업
1999년 2월	중앙대학교 대학원 박사
1990년 2월	의사면허증 취득
1997년 2월	진단검사의학과 전문의 취득
1997년 3월 ~ 2003년 8월	중앙대학교부속 필동병원 진료조교수
2002년 2월 ~ 2003년 2월	미국 질병관리예방센터 (CDC) 초청연구원
2003년 9월 ~ 2006년 8월	중앙대학교 의과대학 조교수
2006년 9월 ~ 현재	중앙대학교 의과대학 부교수

◆ 관심분야 ◆

임상미생물학

임상진균학

분자생물학

Workshop 3

Malassezia 동정

건국대학교 의과대학 피부과학교실

이 양 원

Introduction & Background

***Malassezia* yeasts**

- Lipophilic fungi which are regarded as normal flora of the skin
- Recovered in 75-98% of healthy adults
- ***Malassezia* yeasts are also implicated in various skin diseases**
 - ➡ pityriasis versicolor, *Malassezia* folliculitis, seborrheic dermatitis, atopic dermatitis and systemic fungal infection
- **Other disorder :**
Psoriasis, Confluent and reticulated papillomatosis, Transient acantholytic dermatosis, Onychomycosis.

Introduction & Background

Malassezia yeasts

In 1996, Guého *et al* revised the genus *Malassezia* using morphology, ultrastructure, physiology and molecular biology (mole% GC and the direct rRNA sequencing).



As a result, the genus has been enlarged to include seven species comprising *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta* and *M. slooffiae*

Introduction & Background

Malassezia yeasts

- Many previous research
 - ➔ Morphological analysis of the size, surface, color, and shape of cultured colony and biochemical analysis
 - ➔ Time-consuming, multi-step process
 - No taxonomic component into consideration
 - No genetic link between species

So the morphological and biochemical methods have many limits in identifying and classifying new species.

Taxonomy of *Malassezia* Species

- **Lipid dependent species:** *M. furfur*, *M. sympodialis*,
M. globosa, *M. obtusa*,
M. restricta, *M. slooffiae*
- **Lipid independent species:** *M. pachydermatis*
- **Recently in Japan :** *M. dermatis*, *M. japonica*, *M. yamatoensis*
(Sugita et al., 2002, 2003, 2004)
M. nana
(Hirai et al., 2004)

Detection and identification of *Malassezia* species

I. Phenotypic method

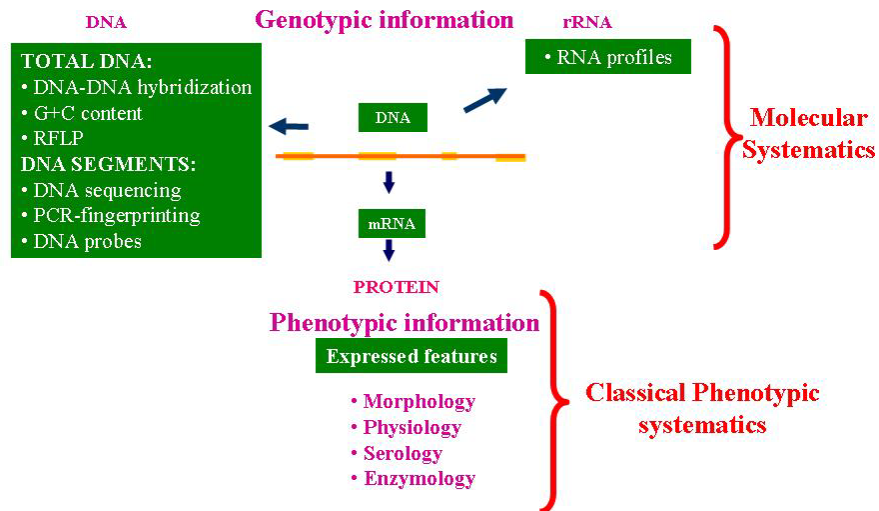
Colony and cell morphology, Tween non-ionic detergent,
Cremophore EL(castor oil), Catalase, Temperature, β -glucosidase

II. Molecular method

1. PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)
2. RAPD (Random amplification of polymorphic DNA)
3. AFLP (Amplified fragment length polymorphism)
4. DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)
5. SSCP (Single strand conformational polymorphism)
6. DNA sequencing
7. tFLP (terminal fragment length polymorphism)
8. Pyrosequencing technology
9. RFLP (Restriction fragment length polymorphism)

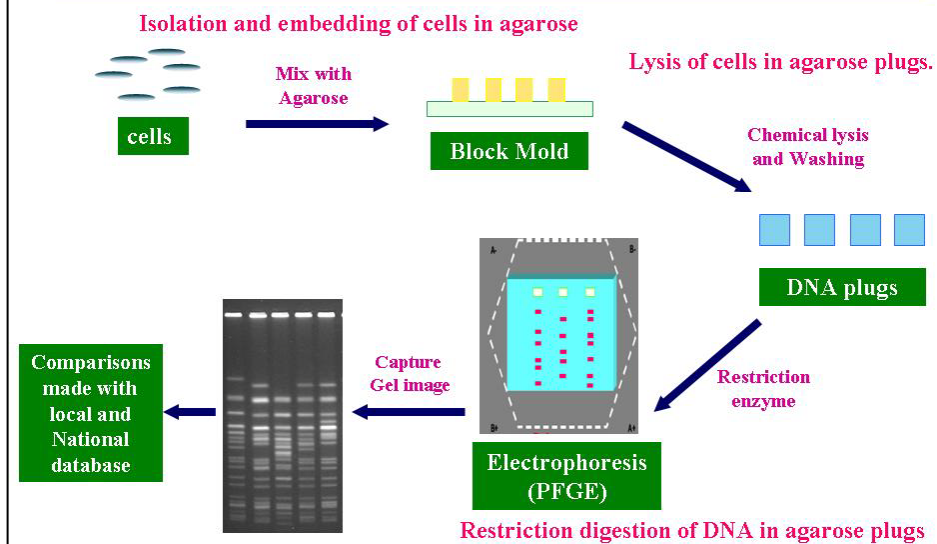
The recent researches use various molecular biology methods

Overview of cellular components for polyphasic taxonomy



Molecular analysis

1. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)



Merits and demerits of 'PFGE'

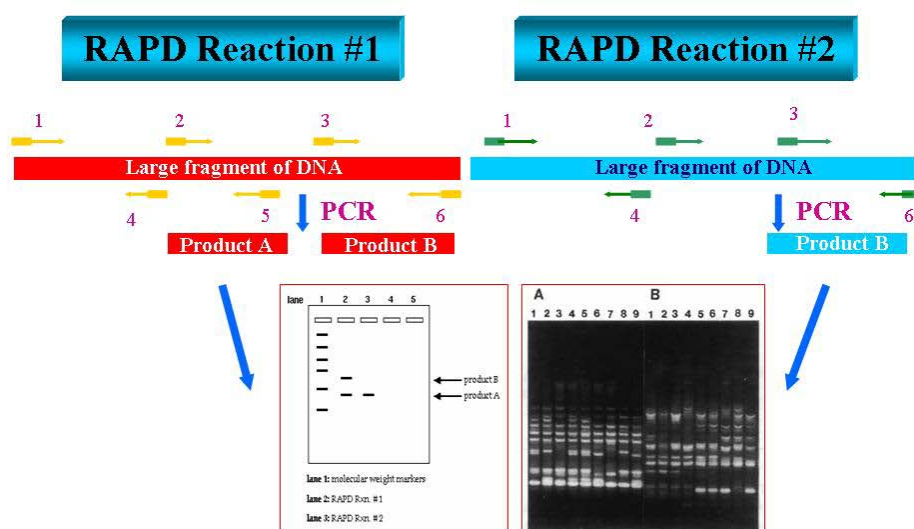
Merits

- Higher resolution power for strain identification
- Reproducible

Demerits

- Time-consuming (60-72h)
- Requires a high-level of skill and specific equipment

2. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)



Merits and demerits of 'RAPD'

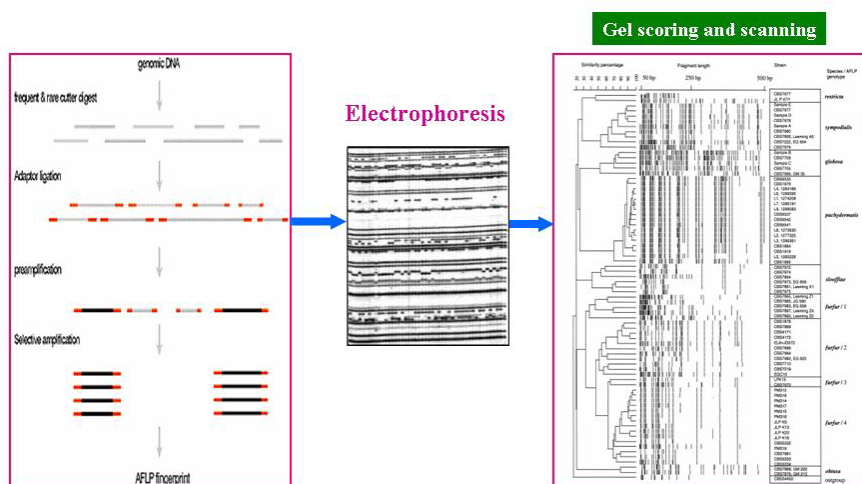
Merits

- High information density
: variable band patterns between most known species
- Quick

Demerits

- Too complicated to interpret because of many band pattern
- Not sufficiently reliable for identification and discrimination on clinically isolated yeast

3. Amplified fragment length polymorphism (AFLP)



Bart Theelen et al. Identification and typing of Malassezia yeasts using AFLP, RAPD and DGGE. FEMS Yeast Research 2001; 1; 79-86

Merits and demerits of 'AFLP'

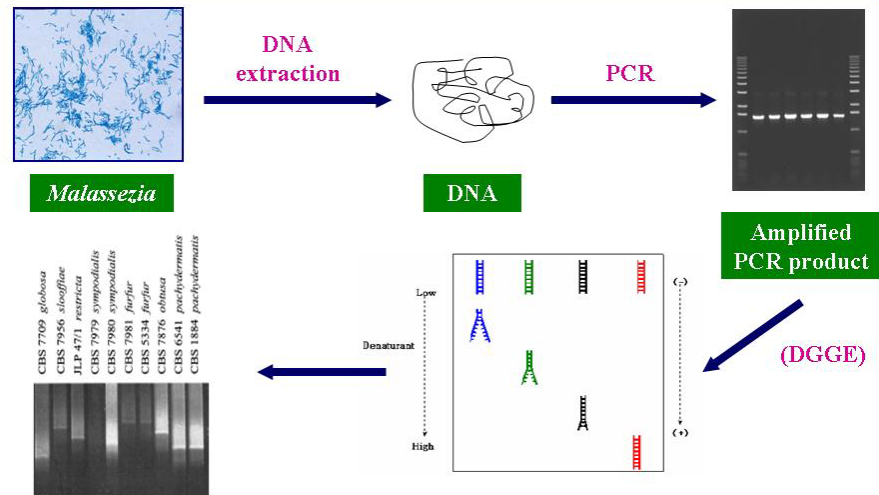
Merits

- Highly sensitive
(The AFLP procedure typically detects more polymorphisms)
- Useful for the identification of unknown isolates

Demerits

- Too complicated to interpret
- Need prerequisite
: database covering the genetic variation
: efficient software tool

4. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)



Theelen B et al. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res* 2001; 1: 79-86

Merits and demerits of 'DGGE'

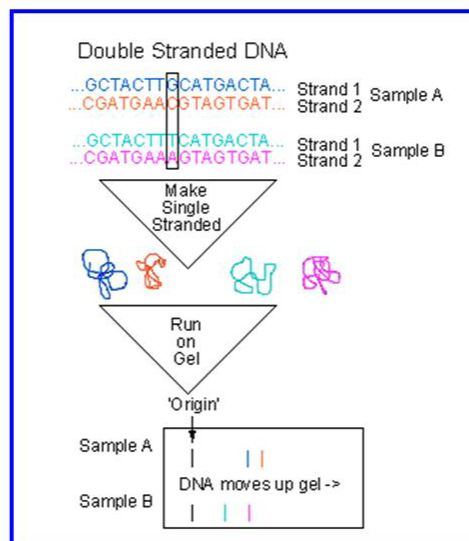
Merits

- High sensitivity
- : Used to analyze PCR-amplified, G-C clamped segments of DNA <500 bp

Demerits

- Confirmed by DNA sequencing
- Technically demanding

5. Single-stranded conformation polymorphism (SSCP)



Merits and demerits of 'SSCP'

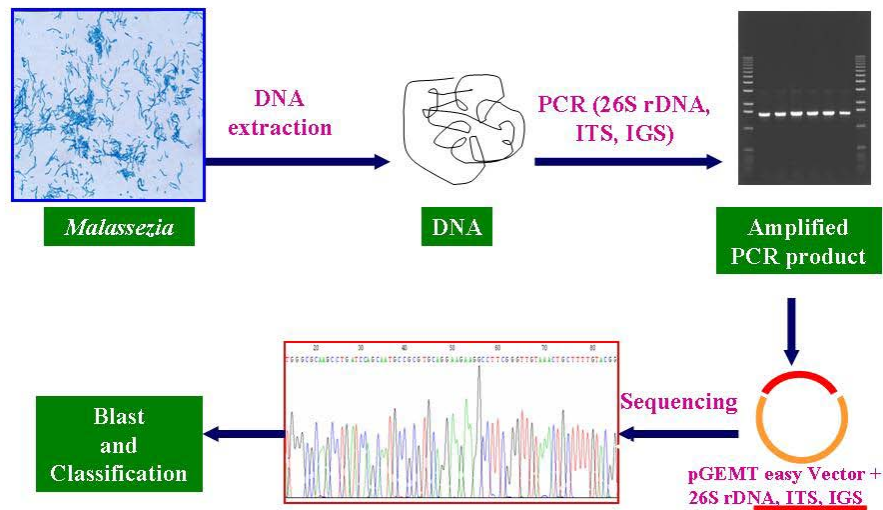
Merit

- Can detect DNA polymorphisms
- Higher resolution power for strain identification

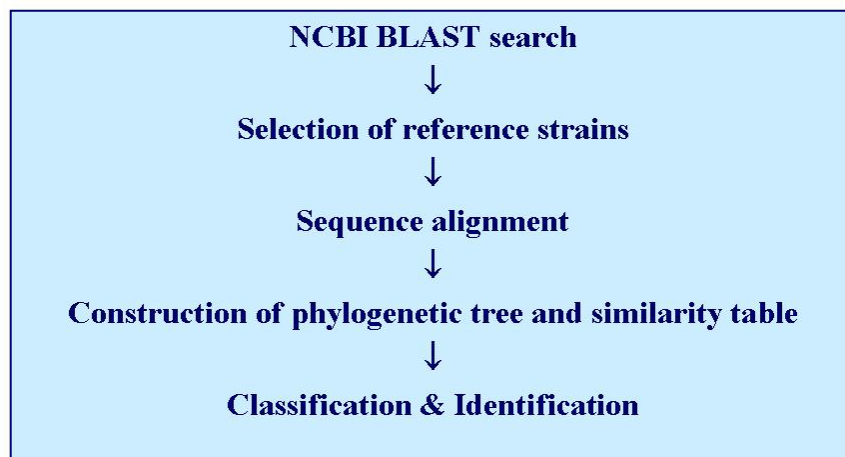
Demerits

- Single-stranded DNA mobilities are dependent on temperature, pH
- So, technically demanding

6. DNA sequencing



Sequence analysis (phylogenetic analysis)



Merits and demerits of 'DNA sequencing'

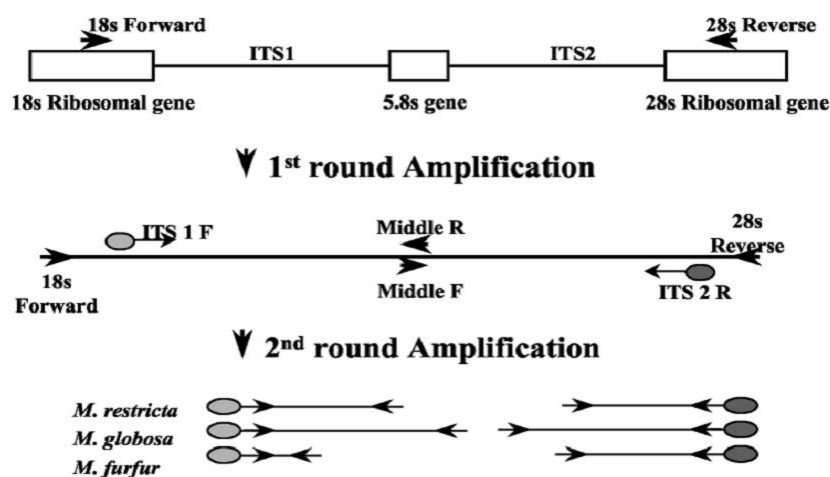
Merits

- Fast
- Reproducible, reliable sequencing technique

Demerits

- At present no database
- Need special equipment
- Sequencing of 18-40 base was not enough for differentiation of specific species.

7. terminal fragment length polymorphism (tFLP)



Gemmer CM et al. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3350-3357

Merits and demerits of 'tFLP'

Merits

- High sensitivity
- Rapid differentiation of *Malassezia* species in complex clinical sample
- Time saving (Eliminating the need for cultivation and restriction digestion)

Demerits

- Expensiveness (Fluorescently-labeled primers)
- Requires a specific equipment

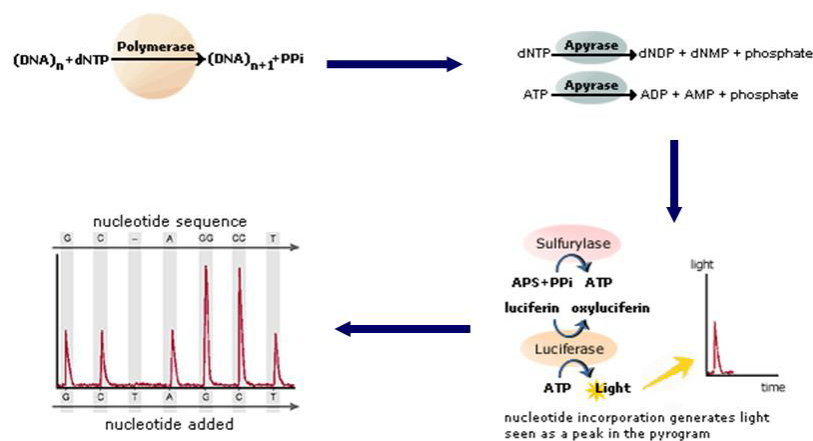
8. Pyrosequencing technology

- **Pyrosequencing**
 - A relatively new technology, provides rapid, short-read sequencing of 30-40 bases.
- The sequence data obtained by the Pyrosequencing technology suggested that 18 to 32 bases were sufficient for identification of *Candida*, *Aspergillus* spp and *H. pylori*.
- The obtained sequence data was analyzed by BLAST/ GeneBank for identification.

8. Pyrosequencing technology

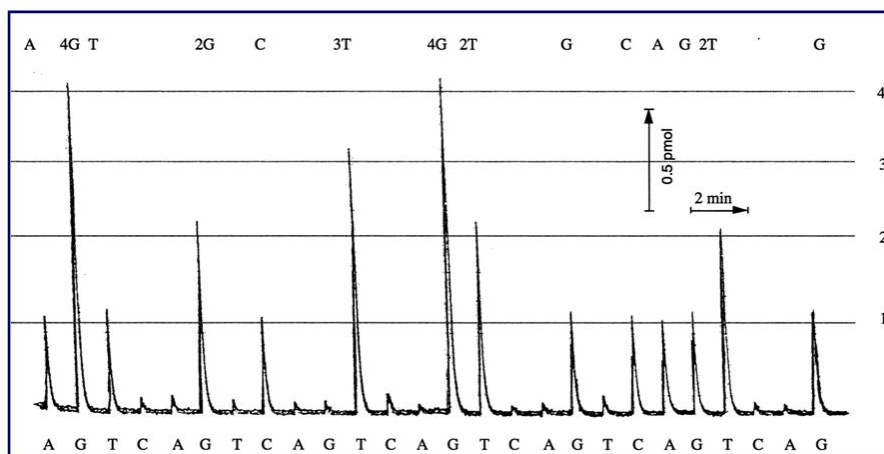
- **Pyrosequencing has the potential advantages**
 - Rapid analysis, accuracy, flexibility, parallel processing, and easily automated.
 - No need for labeled primers, labeled nucleotides, and gel-electrophoresis
 - Manual setup of 96 reaction samples take 15 min, and each pyrosequencing was completed in 90 min.
- Pyrosequencing technology appears to be a good diagnostic tool for detection and identification of fungal pathogens.

8. Pyrosequencing technology

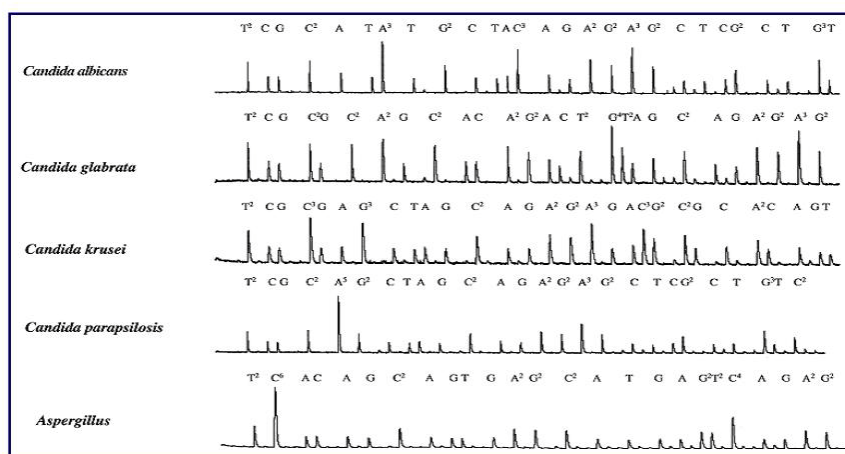


A schematic draw of the principle of pyrosequencing

8. Pyrosequencing technology

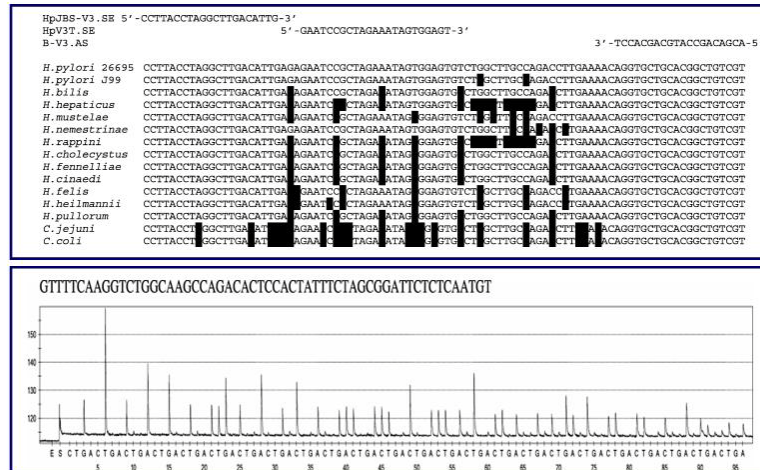


8. Pyrosequencing technology



B. Gharizadeh et al. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology.
Mycoses 2003;47:29-33

8. Pyrosequencing technology



Isabelle Nilsson et al. Multiple Displacement Amplification of Isolated DNA from Human Gallstones: Molecular Identification of Helicobacter DNA by Means of 16S rDNA-Based Pyrosequencing Analysis. Helicobacter 2005; 10(6); 592

Merits and demerits of 'Pyrosequencing technology'

Merits

- Fast
- Reproducible, reliable sequencing technique

Demerits

- Too expensive
- The limitation in using pyrosequencing, unless complete genome has founded.
- Variable site is necessary.
- Sequencing of 18-40 base can not be enough for differentiation of specific species.



The application of pyrosequencing method in identification and classification of *Malassezia* yeasts

8. Pyrosequencing technology

■ Objective

We sought to implement novel molecular biology technique, namely pyrosequencing method in identifying and classifying *Malassezia* yeasts, and assess its clinical applicability

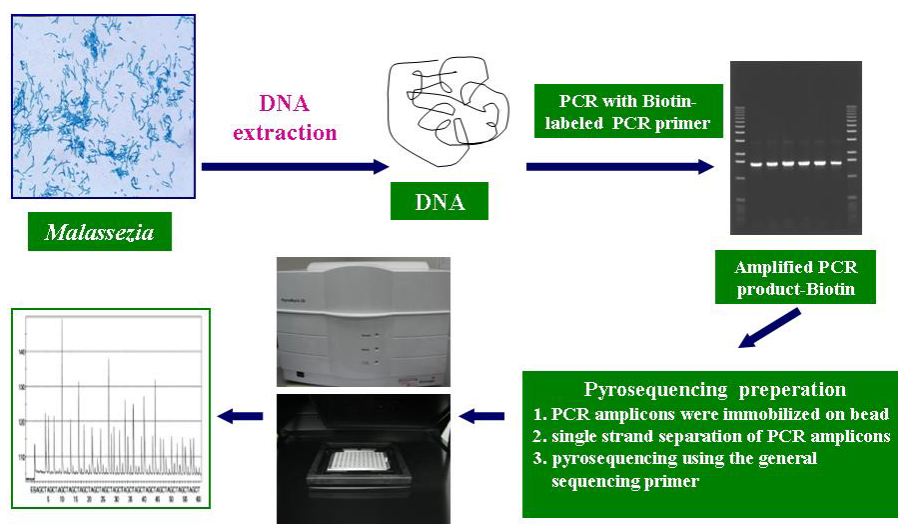


Pyrosequencing technology

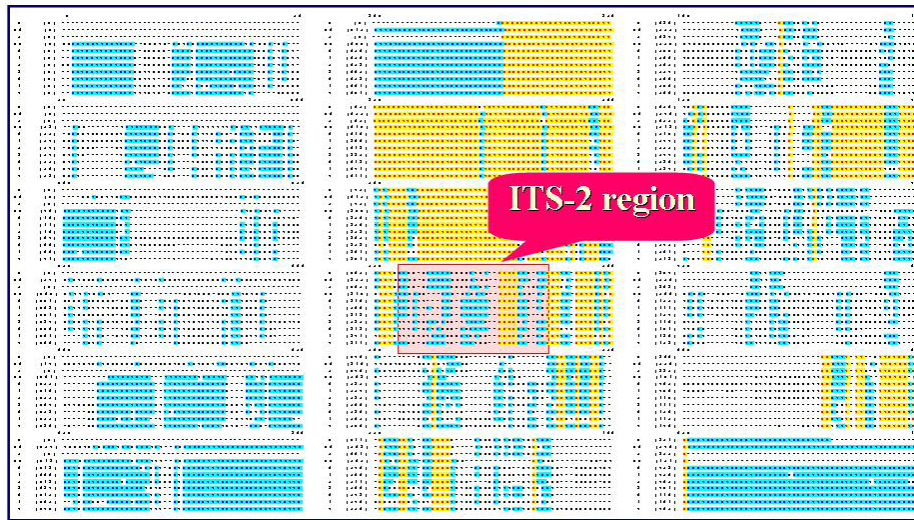
Material and Method

 KONKUK UNIVERSITY HOSPITAL

8. Pyrosequencing technology



Alignment of ribosomal RNA gene sequences



Pyrosequencing Assay-PCR primer sequences design

451 500

1 (125) CCGTGGCGG-AAAGGCAGGATAT--GGCGGA-C-GGSGTTC-GATGGGTC
10 (345) CCGTGGCGG-AAAGGCAGGATAG--GGCGGA-C-GGSGTTC-GATGGGTC
5 (124) CCGTGGCGG-AAAGGCAGGAGTGG--GGCGGTTAG-GATGGGTC
11 (361) GGGTGGCGAAA--GGA-GTCTTA--GGCGGCG-GAAGTTC-GATGGGTC
2 (392) CCGTGGCGATT--GGA-CTGGTTT-GGCGGAC-C-GAAGTTC-GATGGGTC
6 (400) CCGTGGCGATTTCGGC-CTGCTTTTGGCGCA-C-GAAGTTC-GATGGGTC
4 (393) CCGTGGCGATT--GGC-CTGGTTT--GGCGGAT--AAGTTC-GATGGGTC
3 (435) CCGTTTTTTCAGAA-TGGTA--GGCGAA--GGSGTTGAGATGGGTC
8 (393) CCGTTTTT-CATTGAAA-CTGGTTT--GGCGGAT--GGSGTTCGATGGGTC
9 (379) TGGTGTGTGATAGACGCTATGCG--GGCGGCG-GAAGTTC-GATGAGCG
7 (369) CCGTGGCGG-AAAGGTA-CTGTGC--GGCGGA--GGSGTTC-GATGGGTC

1. *M. dermatis* M9931
2. *M. furfur* CBS 1878
3. *M. globosa* CBS 7966
4. *M. japonica* CBS 9432
5. *M. nana* JCM 12085
6. *M. obtusa* CBS 7876
7. *M. pachydermatis* CBS 1879
8. *M. restricta* CBS 7877
9. *M. slooffiae* CBS 7956
10. *M. sympodialis* CBS 7222
11. *M. yamatoensis* M9986

TTGAGTGCCG TGAATTCTCT CT
||||| ||||| ||
TCTCT CTCCCAAGC
|||||
TTGAGTGCCG TGAATTCTCT CTCCCAAGC GGTTGCGATT GCAGTCTGTT GCGGACGAG GTTGGATGGG
TGCTTCTGCC TGTTTCGCAA GAAACAGGCT CGCCCGAAAT GCATTAGCGC CTTTGGGA
||||| |||||
CGTAATCGCG GAAACCTC



KONKUK UNIVERSITY HOSPITAL
SINCE 1931

Pyrosequencing technology

RESULT



KONKUK UNIVERSITY HOSPITAL

8. Pyrosequencing technology

PCR for pyrosequencing of 11 *Malassezia* standard strains



8. Pyrosequencing technology

Pyrogram and alignment sequence



8. Pyrosequencing technology

Pyrogram and alignment sequence



8. Pyrosequencing technology

Pyrogram and alignment sequence



8. Pyrosequencing technology

Pyrosequencing result of *Malassezia*

- Only *M. obtusa* sequencing corresponded 100% among 11 *Malassezia* standard strains.
- In case of *M. furfur*, it corresponded 93% because of sequence missing.
- In 4 cases, *Malassezia* strains haven't matched with expected strain but, matched with other strain.
- Rest of 5 *Malassezia* strains, pyrosequencing failed.

8. Pyrosequencing technology

- The limits of pyrosequencing of *Malassezia* strains in this study

- Since there is not enough sequencing information, it is difficult to apply pyrosequencing.
- There is possibility to not correspond between sequence in NCBI and standard strain that we have now.

- A brand new attempt in *Malassezia* detection.
- More studies are necessary to apply pyrosequencing method in *Malassezia* detection.

9. PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)

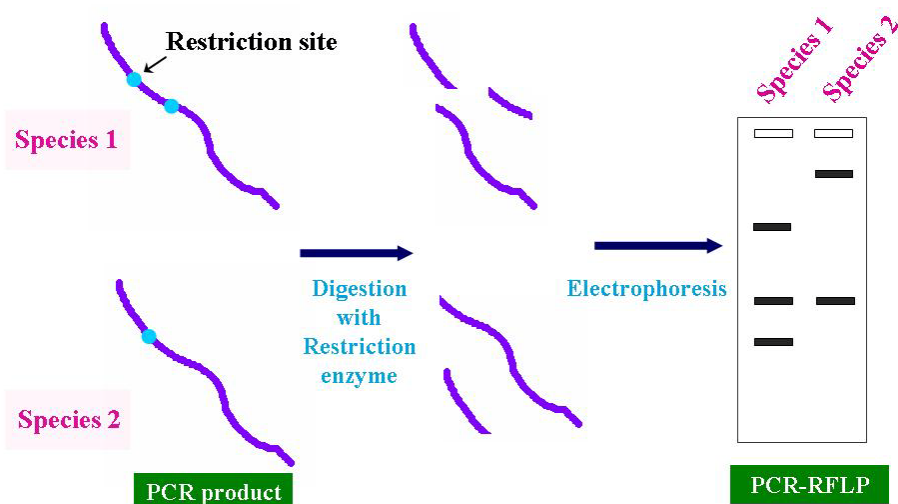
Restriction enzymes cut DNA at precise points producing

- If two organisms differ in the distance between sites of cleavage of a particular restriction endonuclease, the length of the fragments produced will differ when the DNA is digested with a restriction enzyme.

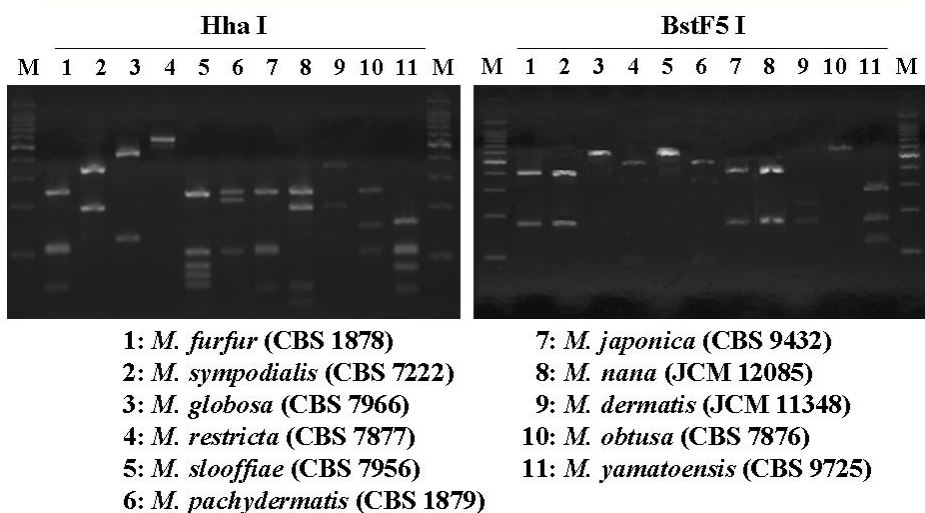
9. PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)

- PCR can be used to amplify very small amounts of DNA, usually in 2-3 hours, to the levels required for RFLP analysis. Therefore, more samples can be analyzed in a shorter time.
- Measuring the differences in length (polymorphisms) of the cleaved DNA strands allows you to track genetic variation.

9. PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)



PCR-RFLP pattern of *Malassezia* species



Merits and demerits of 'RFLP'

Merits

- High accuracy
- Simple
- Fast
- Cost effective

Demerits

- Do not provide data on clinically relevant intraspecific variation
- Several experiments may be necessary in order to identify unknown isolates.

Closing remark

- The 26S rDNA PCR-RFLP is useful for *Malassezia* molecular epidemiology studies also provides initial evidence for novel clinical associations

We are convinced that further studies coupled with utilization of more sophisticated molecular approach will surely facilitate the exploration for this field.

Thank you



● 연자 소개 ●

성명 : 이 양 원(李 陽 遠)

생년월일 : 1971년 1월 26일

◆ 학 력 ◆

1996년 2월	경희대학교 생명과학부 유전공학과 졸업 (이학사)
2000년 2월	건국대학교 의과대학 의학과 졸업 (의학사)
2003년 2월	건국대학교 대학원 의학석사 학위취득 (피부과학 전공)
2006년 8월	건국대학교 대학원 의학박사 학위취득 (피부과학 전공)

◆ 경 력 ◆

2000년 3월 ~ 2001년 2월	건국대학교 병원 수련의
2001년 3월 ~ 2005년 2월	건국대학교 병원 피부과 전공의
2005년 3월 ~ 2006년 2월	건국대학교 병원 피부과 전임의
2006년 3월 ~ 현재	건국대학교 병원 피부과 조교수

◆ 학회활동 ◆

대한피부과학회 정회원
대한건선학회 정회원
대한의진균학회 정회원
대한모발학회 정회원
대한여드름학회 정회원
대한의진균학회 간행위원회 부간사