

개에서 분리한 진균의 동정과 PCR을 이용한 진단

장화석¹ · 문영찬 · 이상원 · 김휘율 · 김태종

건국대학교 수의과대학

Identification of Fungus from Dog and Diagnosis using PCR

Hwa-seok Chang¹, Young-chan Moon, Sang-won Lee, Hwi-yool Kim and Tae-jong Kim

College of Veterinary Medicine, Konkuk University

Abstract : This study was performed to examine the mycological features of canine skin. A total of 50 dogs with skin lesions were examined for dermatology from October, 2000 to April, 2001. The isolation rates of dermatophytes, yeast, filamentous fungi and superficial fungi were 36.4%, 13.5%, 35.3% and 13.6%. The dermatophytes isolated in dogs were *Microsporum canins* and *Trichophyton mentagrophytes* were 75% and 25%. The yeast and superficial fungi isolated in dogs were *Candida albicans*, *Rhodotorula minnata*, *Candida ceferrii* and *Malassezia spp.* were 16.7%, 16.7%, 16.7% and 50%. The filamentous fungi by *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.*, *Alternaria spp.* were 12.5%, 12.5%, 50%, and 25%. To determine if polymerase chain reaction (PCR) could be applied for diagnosis of dermatophytes, yeast and filamentous fungi, control and clinical samples were tested. The size of specific PCR product in agarose gel was 340 bp for dermatophytes and 210 bp for yeast and filamentous fungi, respectively.

Key words : dog, fungus, PCR, mycological features, diagnosis

서 론

지구상에는 약 150만 여 종의 진균이 존재하는 것으로 추정되고 있으며, 이중 100종 이하의 진균만이 사람에게 대한 1차 병원체로 존재하여 사람과 동물사이에서 기생 순환하며, 독립체로 유지될 수 있는 능력을 지닌다⁴¹. 한편 동물에 병원성을 나타내는 진균은 300종 이상이 보고 되었다. 동물에 병원성이 있는 진균은 일차적으로 불완전균류(Fungi Imperfecti)와 자낭균아문(Ascomycota)에서 속한다⁶¹. 그 중에서 피부사상균은 각화된 조직, 발가락, 털 그리고 각질층의 감염부위에서 주로 발견되는데, 현재 38종 이상의 피부사상균이 밝혀져 있으며 그 중에서도 대표적인 것에는 *Microsporum spp.*과 *Trichophyton spp.* 혹은 *Epidermophyton spp.* 등이 있다. 이들 미생물은 독특한 진균으로 각화된 조직에 침투하여 생존할 수 있다²³. 피부사상균은 사람 및 각종 동물의 피모 및 피부 각질층에 침범하여 염증성 반응을 일으키는 주요 피부 감염병의 원인균으로 밝혀져 있어 공중보건학적으로 중요시되고 있다⁵⁷. 그리고 이것은 인체친화성 (anthropophilic), 동물친화성(zoophilic) 및 토양친화성 (geophilic)으로 분류한다. 피부사상균은 각화조직을 분해하는 능력을 가지고 있어서 표피와 모낭의 손상을 초래하며, 병변은 원인체의 대사산물에 의한 숙주의 과민반응에 의해 나타난다. 숙주의 방어기전에 의해 원인체가 다시 정상적인 피모로 옮겨가게 되면 결국 병변의 가장자리에서 새롭게 증식하

게 되고 중심부의 치유조직에는 원형의 탈모가 나타나게 된다⁴⁹. 피부사상균은 생체조직을 침범하지 않고 그들이 생산한 대사물질에 의해 숙주에서 반응을 일으키며 진균의 종류와 숙주에 따라 병변의 염증반응 정도가 다르게 나타난다.

일반적으로 동정되는 사상성진균은 *Alternaria spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* 등이 있는데 건강한 개체의 피부에서도^{57,60,62} 동정됨은 물론 *Penicillium spp.*와 *Aspergillus spp.*는 각종 동물의 피부, 이도, 안결막, 폐, 기관지, 태아(유산)에 발생한 진균증의 원인균이 된다⁶¹. *Aspergillus*의 subtype에는 *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* 등이 있다²⁹. *Penicillium spp.*은 증상이 비슷하나 비노기계에서도 관찰된다⁶¹. *Candida spp.*는 자연계에 광범위하게 분포되어 있고, *Candida albicans*를 제외하고는 상재균(saprophytes)으로 사람과 동물의 진피, 비강, 기관지 및 자궁 등에 존재하면서 잠재적이거나 급성의 감염증을 발생시킨다고 한다. 사람에서는 패혈증, 심내막염, 골수염 및 기관지염, 폐렴 등을 일으키며 동물에서는 중이염, 자궁염, 위장염, 상피염, 유방염 및 유산을 일으킨다^{5,20,27,28,34,43}. 진균의 분류 및 동정은 환축의 임상적 관찰, 분리주의 배양 특성, 현미경적 관찰 및 생리적 성장, 수용성 단백질 양상, 혈청의 특성 등의 생화학적 방법을 이용하여 왔다⁵⁸. 그러나 같은 균종내에서도 형태학적으로 다양한 균집락을 보이며 교배능력이 부족한 균이 있어 정확한 균종 구분이 어려울 경우가 있다. 최근에는 분자생물학적 특성을 이용하여 감별동정을 하고 있다^{7,13,15,18,19,32,53,62,63}. 특히 감염증을 일으킬 수 있는 진균의 종류는 점차 증가하고 있는데^{9,24} 배양 성공률이 낮고 효모균이나 사상성진균이 배양

¹Corresponding author.
E-mail : vet_chang@hanmail.net

된 경우에는 오염균 여부를 확인하기 위해 임상적인 관찰과 배양에 있어 좀 더 엄격한 진단기준을 적용해야 하는 문제 등 기존의 검사 방법에는 한계가 있어 그 분포에 대해 많은 논란이 있었다. 임상적으로 진균증으로 의심될 때 병변 부위에서 병리조직 검사를 시행함으로써 진균의 존재 유무 및 균사와 포자의 형태 관찰을 통해 원인균을 추정^{31,40,56}하고 있다. 감염균에 대한 유전자를 이용한 분자생물학적 진단은 가장 정확하고 예민한 진단법으로 알려져 있으며, 임상질환이나 원인균에 따라 다양한 가검물을 분자생물학적 진단에 이용하고 있다. 특히 polymerase chain reaction(PCR)을 이용한 진단방법이 최근 개발되어 PCR의 결과로 진균 감염 여부를 판정하며 증폭된 유전자를 제한효소로 처리하여 나타난 절단양상의 다형성(restriction fragment length polymorphism; RFLP)을 바탕으로 원인균이 피부사상균, 효모균, 사상성 진균중 어느 균류에 속하는지를 동정한다²⁴.

수의 임상적으로 진균 감염증에는 신속한 진단과 알맞은 항진균제의 투여가 요구되고 있지만 전통적인 진균학적 방법, 항원, 항체 반응 등 기존의 진단 방법으로는 한계가 있다. PCR을 이용한 분자생물학적 진단법은 매우 빠르고 감수성이 높으며, 진균학적 지식없이도 시행할 수 있는 장점이 있으며 의학계열에서 많은 연구 및 발전이 있었다^{10,24,39}. 그러나 아직 국내에서 진균의 진단방법에 관한 연구와 유전자를 이용한 진단에 대한 수의학적인 연구는 미비하고 이루어지지 않았다.

본 연구는 일반적인 병원성 진균에 대한 기존 진단방법의 정리 및 문제점을 검토하고 PCR을 이용한 분자생물학적 진단방법을 임상에 도입하기 위한 기초자료를 만들기 위해 실행하였다.

재료 및 방법

공시 동물

2000년 10월부터 2001년 4월까지 6개월간 서울 및 경기 지방의 동물병원에서 피부질환으로 인하여 내원한 개 50마리 중 진균성 질환으로 확인된 22마리를 실험대상으로 하였다.

표준 균주

임상분리주와 비교하기 위해서 표준균주를 생명공학연구소 유전자 은행에서 균주 KCTC 6316(*Trichophyton mentagrophytes*), 6375(*Trichophyton rubrum*), 6591(*Microsporum canis*), 6585(*Microsporum audouinii*)를 분양받고 서울대학교 미생물연구소 미생물균주센터에서 IMSNU 31065 (*Aspergillus fumigatus*)를 분양 받아 실험에 공시하였다.

검체 채취

5-10분 간에 Wood's lamp를 예열하고 암실에서 검사하였다. 병변 부위에 3-5분 동안 lamp를 지속적으로 비추었을 때 황록색 형광을 나타낸 털을 채집대상으로 하였다. 70% 알코올을 적신 솜으로 병변 부위를 깨끗하게 하고 털과 일

부 인설을 멸균된 핀셋을 사용하여 수집하였다. Wood's lamp에서 형광을 발하지 않는 병변 부위는 새롭게 형성되거나 활발히 확장되는 병변을 선택, 가장자리의 인접부위에서 인설 및 가피와 털을 수집하였다.

배 양

피부사상균 및 효모 그리고 사상성 진균을 분리하기 위하여 모든 검체는 dermatophytes test medium(DTM)을 사용하여 25°C에서 2주간 배양하였다. DTM에서 색의 변화가 없는 균주들은 Sabouraud's dextrose agar(SDA)와 potato dextrose agar(PDA)에 재접종하여 25°C와 35°C에서 배양하였다.

동 정

현미경적 관찰

(1) Saline wet mount

깨끗한 slide glass위에 검체 한방울과 생리식염수 한방울을 넣고 혼합한 후, coverslip으로 덮고 현미경의 저배율과 고배율을 사용하여 조명에서 관찰하였다.

(2) Potassium hydroxide (KOH) mount

검체를 얇게 도말하여 slide glass위에 놓고, 10% KOH (potassium hydroxide 10 gm, glycerol 20 ml, distilled water 80 ml) 용액을 한방울 떨어뜨려 혼합한 후 coverslip을 덮었다. 알코올 램프에 2-3회 통과시키면서 가볍게 가열시키고, 약 20분 후 검체가 투명해졌을 때 저배율과 고배율로 관찰하였다.

검체의 염색. Slide glass 위에 검체를 놓고 Lactophenol cotton blue(LPCB) 용액 한방울을 가했다. 시약과 검체를 잘 혼합한 후 coverslip을 덮고 현미경으로 100배, 400배로 관찰하고 매니큐어로 가장자리를 봉합하여 영구표본을 제작하였다.

LPCB 용액은 1 ml당 phenol (20 µl), lactic acid (20 µl), glycerol (40 µl), cotton blue (china blue, 0.05 gm)이 되도록 제조한 후, distilled water (20 ml)를 혼합하였다.

Scotch tape technique. LPCB 시약을 slide glass 위에 한방울 떨어뜨린 후, 약 1 cm 넓이의 투명한 스카치 테이프의 접착면을 집락 표면에 압착시켰다. 스카치 테이프로 slide glass 위에 부착시킨 후 현미경을 이용하여 관찰하였다.

Urease 산생검사. Urea agar base (29 g), dextrose (4 g) 그리고 distilled water (100 ml)을 혼합한 후, syringe filter를 이용하여 여과시킨 뒤, agar (15 g)과 distilled water (900ml)를 혼합하여 증탕한 후 121°C에서 15분간 고압멸균하여 50°C까지 식힌 후, 여과된 urea base와 agar를 혼합하였다.

Urease 검출시약을 멸균된 petri dish에 분주하였다. *Trichophyton mentagrophytes*와 *Trichophyton rubrum*를 분별하기 위해 접종하였으며 실온에서 배양한 후 1~2일내에 배지가 붉게 변하면 *Trichophyton mentagrophytes*으로, 색의 변화가 없으면 *Trichophyton rubrum*으로 분류하였다.

DTM test. 피부사상균의 분류를 위하여 dermatophytes

test medium(DTM)을 사용하였다. SDA를 121°C에서 15분간 고압멸균한 후, 50°C로 식혔다. 그 후 phenol red (0.2 µg/ml, Sigma), cyclohexidine (0.5 µg/ml, Sigma), chlortetracycline (0.1 µg/ml, Sigma), getamicin(0.1 µg/ml, Sigma)을 혼합하여 90×15 petri dish에 18 ml씩 분주하였다. 그리고 배지가 배양 7-14일 동안 붉게 변하면 피부사상균으로 분류하였다.

API C 20 AUX test. 효모의 분리 및 생화학적 성상을 알기 위하여 배양 3~4일만에 자라는 집락들 중에 DTM 배지에서 성장은 하였으나 무색인 균주들은 API C 20 AUX test를 실시하였고, 변색한 균주는 scotch tape test를 통해 사상성 진균임을 확인하였다.

DNA 분리. Fungal DNA를 분리하기 위하여 Liu 등²⁰의 실험방법을 변형시켜 적용하였다. 1.5 ml eppendorf tube에 500 µl lysis buffer (400 mM tris-HCl [pH 8.0] + 60 mM EDTA [pH 8.0], 150 mM NaCl + 1% Sodium dodecyl sulfate)에 소량의 mecclia를 넣은 후 상온에서 10분간 방치하고 pH 4.8로 교정하여 150 µl potassium acetate를 넣었다. 그리고 나서 10,000×g로 1분간 원심분리하여 상층액을 다른 eppendorf tube에 넣은 후 다시 원심분리하였다. 그리고 원심분리된 상층액을 eppendorf tube에 넣고 동량의 isopropyl alcohol를 넣은 후 뒤집어서 흔든 후 10,000×g로 2분간 원심분리하여 상층액을 버렸다. DNA pellet을 300 µl의 70% ethanol로 세척한 후 10,000 RPM으로 5분간 원심분리하여 상층액을 버리고 DNA pellet을 진공펌프로 건조시켰다. 그리고 50 µl의 3차 증류수에 용해시켰다.

중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR). Makimura 등²⁴의 보고에 따라 primer 1은 18SF1 (5'-AGGTTTCCGTAGGTGAA CCT-3', *S.cerevisiae* 18S rDNA의 1764-1783 bp), primer 2는 58SR1 (5'-TTCGCTGCGTCTTCATCGA-3', *S. cerevisiae* 58S rDNA의 53-34 bp)를 사용하였다.

10×reaction buffer 5 µl, 2 mM dNTPs 5 µl, Taq-polymerase (5U/ml)를 0.5 ml, first primer 1 µl, second primer 1 µl, 진균 DNA용액 10 µl 등을 포함한 반응 혼합물이 50 µl가 되도록 하여 PCR를 시행하였다. 반응 조건은 1차로 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 60°C에서 15초, extension은 72°C에서 15초로 10회 반복하고, 2차로 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 63°C에서 15초, extension은 72°C에서 15초의 반응회수를 15회 실시한 후 마지막에 extension을 72°C에서 10분을 시행하였다. 증폭된 DNA는 ethidium bromide (0.5 µg/ml)가 포함된 2% agarose gel에서 100 volt에서 40분간 전기영동하여 UV transilluminator 상에서 증폭된 DNA band를 확인하였다.

결 과

DTM 배지에서 배양한 검체 중에서 색깔의 변화가 있는 것은 바로 현미경 검사를 실시하여 세부동정을 실시하였고,

DTM 배지에서 색깔의 변화가 없는 것은 SDA와 PDA에 재접종하여 배양시킨 후 현미경 검사와 필요에 따라 API C 20 AUX test를 실시하여 *Microsporum canis*와 *Penicillium spp.* 그리고 *Malassezia spp.*가 각각 27.3%, 18.2%가 검출되었다(Table 1). 피부사상균중에서 *Microsporum canis*의 특징적인 현미경적 소견에 따라 긴 능형으로 비대칭적이며 벽이 두껍고 표면은 작은 돌기가 있고 6개 이상의 격벽이 있는 대분생자가 있는 것을 확인하였다(Fig 1). 곤봉모양의 소분생자도 간혹 발견되었는데, 성장이 빠르고 백색, 양털 모양의 집락을 형성하였고, 배지 뒷면은 밝은 황색 내지 옅은 노란색을 띠었다. *Trichophyton mentagrophytes*은 황색과립의 덩어리가 사방으로 수직상으로 뻗어있는 과립형 집락이 존재하였다(Fig 2). 과립형 집락에서는 소분생자가 많이 발견되었다. 효모에서는 *Candida albicans*(Fig 3), *Candida ciferrii*

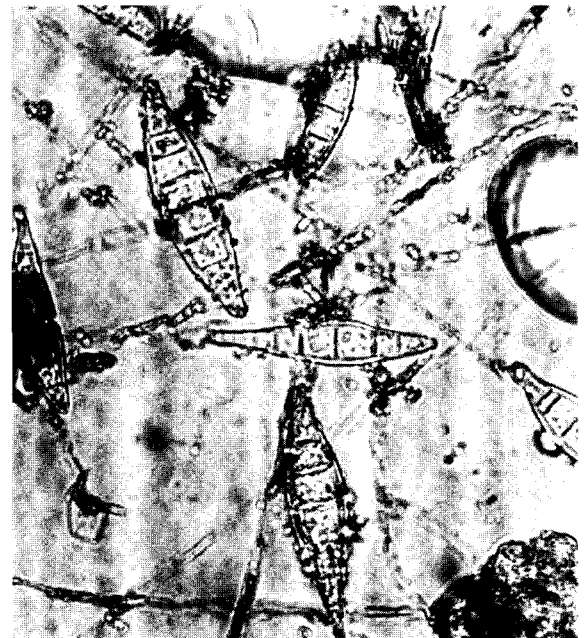


Fig 1. *Microsporum canis* LPCB stain ×40.

Table 1. Fungi isolated from hairs and scales of dogs

Species	No. of positive animals (%)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2 (9.1)
<i>Microsporum canis</i>	6 (27.3)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 (4.5)
<i>Penicillium spp.</i>	4 (18.2)
<i>Aspergillus niger</i>	1 (4.5)
<i>Alternaria spp.</i>	2 (9.1)
<i>Candida ciferrii</i>	1 (4.5)
<i>Candida albicans</i>	1 (4.5)
<i>Malassezia spp.</i>	3 (13.6)
<i>Rhodoturula minuta</i>	1 (4.5)
Total	22 (100)



Fig 2. *Trichophyton mentagrophytes* LPCB stain $\times 200$.

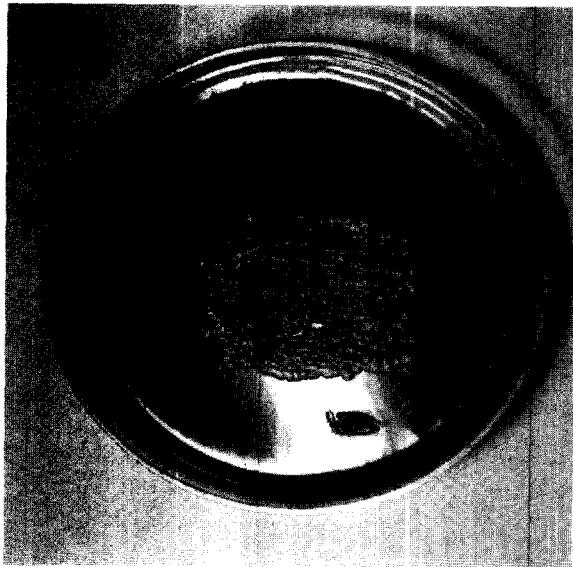


Fig 3. *Candida Albicans* SDA Medium 72 h.

(Fig 4), *Rhodoturula minuta*(Fig 5)가 검출되었다. 효모 특유의 과일향이 나는 크림색 집락은 3일 후면 판별이 가능하였다. API test에서 무반응인 것은 현미경 검사를 실시하여 *Malassezia spp.*(Fig 6)로 판명이 났다. 이형태의 효모상과 균사상으로 온도에 따라 이루어졌으며 특징적인 원형의 효모상을 나타내었다. 사상성 진균에서는 *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus niger*, 그리고 *Alternaria spp.*가 검출되었다. *Aspergillus spp.*는 SDA에서 배양하였을 때 신속하게 자라며, 집락은 융단 또는 벨벳 모양으로 청색, 녹

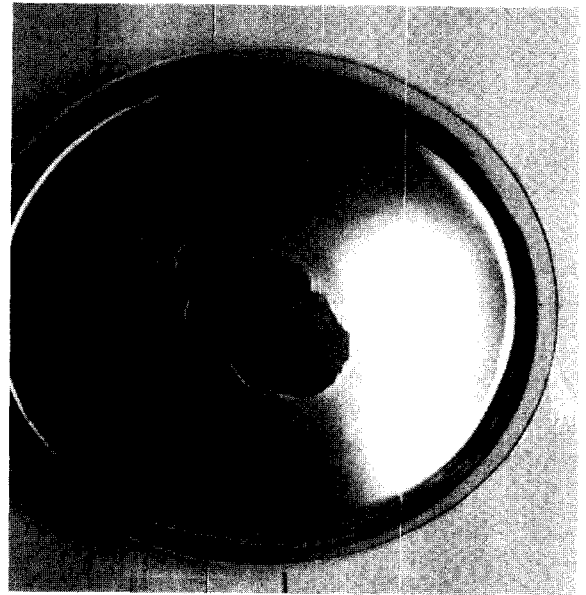


Fig 4. *Candida ciferrii* SDA Medium 72 h.

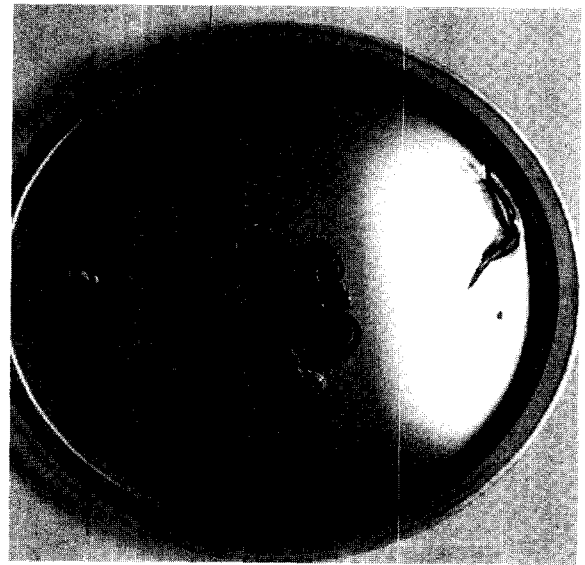


Fig 5. *Rhodoturula minuta* SDA Medium 72 h.

색, 흑색, 백색 등의 다양한 색을 띠었으며, 조밀한 분생자를 생성하였다. 현미경으로 관찰하였을 때 균사체는 격막이 있고, 가지가 없으며, 끝에는 곤봉 모양의 정낭(vesicle)이 있었으며, 그 정낭은 플라스크 모양의 경자(梗子)가 한줄 또는 두줄로 둘러져 있었다. *Aspergillus fumigatus*는 정낭의 2/3 위치에 한줄로 분생자와 연결되어 있었고, 분생자병과 수평을 이루었으며(Fig 7), *Aspergillus niger*는 정낭 전체에 두줄의 분생자가 방사형으로 배열(Fig 8)된 것을 확인하였다. *Penicillium spp.*은 SDA에서 배양하였을 때 신속하게 발육되고, 집락은 초기에 벨벳모양의 백색이었다가 후기에는 분말모양의 청록색이 되며 가장자리는 백색을 띠었다. 현미경으

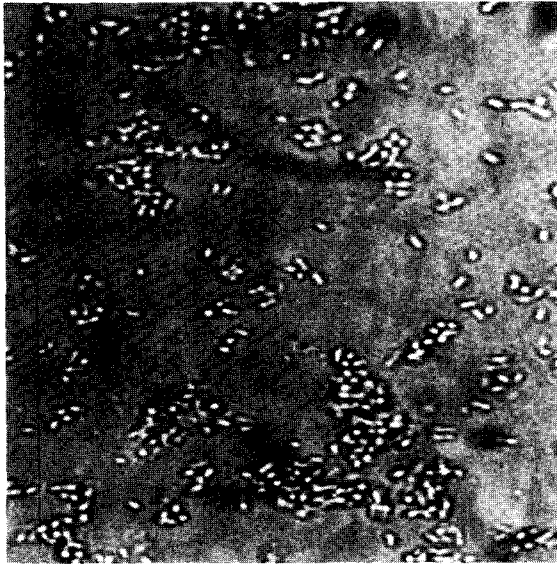


Fig 6. *Malassezia* spp. tease mount $\times 200$.

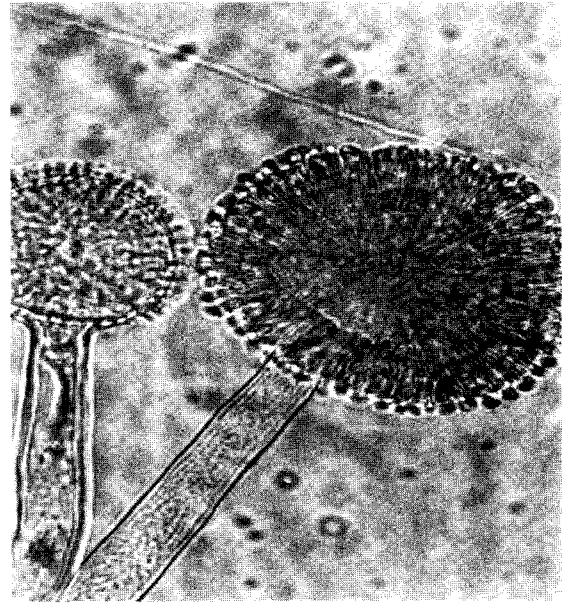


Fig 8. *Aspergillus niger* LPCB stain $\times 600$.

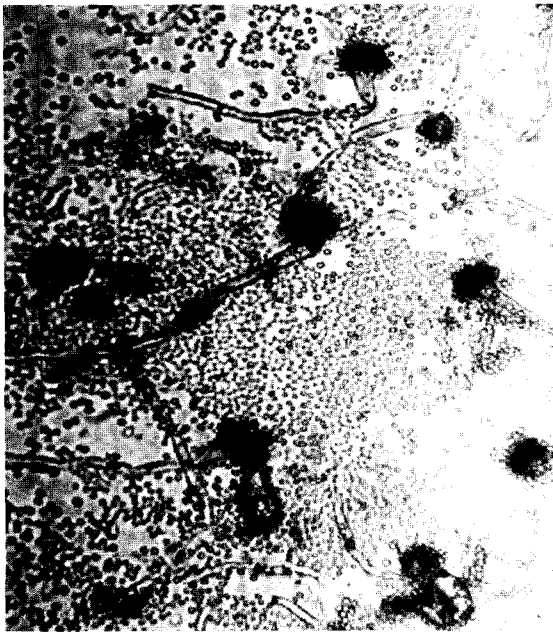


Fig 7. *Aspergillus fumigatus* LPCB stain $\times 200$.

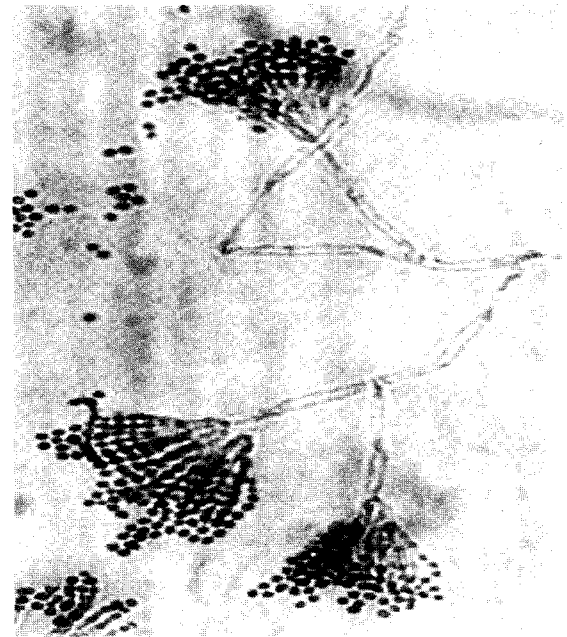


Fig 9. *Penicillium* spp. LPCB stain $\times 200$.

로 관찰하였을 때 균사는 격막이 있고, 플라스크 모양의 경자(梗子)를 형성하며 빗자루 모양을 이루고, 그 위에 원형의 피아로분생자(phialoconidia)가 연쇄를 이루었다(Fig 9). *Alternaria* spp.를 SDA에서 배양하였을 때 밝은 회색의 양털모양으로 흑녹색 또는 갈색을 띠는 집락이 관찰되었다. 현미경상에서 생식구조와 균사는 흑색이며 포로분생자(poroconidia)는 사슬을 이루고 수평격막이나 수직격막을 모두 가지며 끝이 뾰족한 원뿔 모양이 관찰되었다(Fig 10).

개의 피부 병변에서 분리된 피부사상균을 종에 따라 분류한 성적은 *Microsporum canis*는 75%를 차지하였고,

*Trichophyton mentagrophytes*은 25%이었다(Table 2). 현미경 검사소견에서 *Microsporum canis*는 특징적인 분생자를 많이 함유하고 있었다.

개의 피부 병변에서 분리된 사상성 진균을 종에 따라 분류의 분포는 *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium* spp., *Aspergillus niger*, *Alternaria* spp.가 각각 12.5%, 50%, 12.5% 그리고 25%를 차지하였다(Table 3).

개에서 분리한 효모, 효모양 진균과 표재성 진균의 분포는



Fig 10. *Alternaria* spp. LPCB stain $\times 200$.

Table 2. Species of dermatophytes isolated and their distribution in dogs

Species	No. of positive animals (%)
<i>Microsporum canis</i>	6 (75)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2 (25)
Total	8 (100)

Table 3. Species of filamentous fungi isolated and their distribution in dogs

Species	No. of positive animals (%)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	1 (12.5)
<i>Penicillium</i> spp.	4 (50.0)
<i>Aspergillus niger</i>	1 (12.5)
<i>Alternaria</i> spp.	2 (25.0)
Total	8 (100)

Table 4. Species of yeast, yeastlike fungi and superficial organism isolated and their distribution in dogs

Species	No. of positive animals (%)
<i>Candida ciferrii</i>	1 (16.7)
<i>Candida albicans</i>	1 (16.7)
<i>Malassezia</i> spp.	3 (50.0)
<i>Rhodoturula minuta</i>	1 (16.7)
Total	6 (100)

Candida albicans, *Candida ciferrii*, *Malassezia* spp., *Rhodoturula minuta*가 각각 16.7%, 16.7%, 50%, 그리고 16.7%를 차지하였다(Table 4).

Table 5. Biochemical properties of yeast species

Biochemical Properties	yeast Species		
	<i>C.albicans</i>	<i>C.ciferrii</i>	<i>R.minuta</i>
Glucose	+	+	+
Glycerol	+	+	+
2-Keto-D-gluconate	+	+	+
Arabinose	-	+	+
Xylose	+	+	+
Adonitol	+	-	-
Xylitol	+	+	-
Galactose	+	+	-
Inositol	-	+	-
Sorbitol	+	+	+
Methyl-D-Glucoside	+	-	-
N-acetyl-D-Glucosamine	+	+	+
Cellobiose	-	+	+
Lactose	-	-	-
Maltose	+	+	-
Saccharose	+	+	+
Trehalose	+	+	+
Melezitose	-	-	+
Raffinose	-	+	-

C : *Candida* R : *Rhodoturula*

72시간의 배양된 임상분리주에서 나온 *Candida albicans*, *Candida ciferrii* 그리고 *Rhodoturula minuta*의 API C 20 AUX test를 이용한 생화학적 성상은 Table 5와 같다.

18SF1과 58SR1 primer를 사용하여 분리된 표준균주와 임상분리주의 피부사상균의 PCR 산물은 ethidium bromide 로 염색된 agarose gel에서 모두 동일한 1개의 band가 340 bp에서 관찰이 되었다(Fig 11A, B). 그리고 사상성 진균에서는 모두 동일한 1개의 band가 210 bp에서 관찰이 되었다(Fig 12A) 효모와 *Malassezia* spp.에서는 각각 210 bp와 260 bp를 나타내었다(Fig 12B).

고 찰

진균의 동정에 사용되는 배지는 SDA, PDA, DTM 등이 많이 사용되고 있다. SDA는 모든 진균의 배양에 전통적으로 사용하고 있는 배지이다^{6,44}. 그러나 일반적으로 배양균의 분생자 형성이 불량하고 오랫동안 배양하면 용모성 변이가 생기며, *Trichophyton* spp.에서도 집락의 모양이 다양하게 나타나며 서로 다른 균종이라도 비슷하게 나타나는 경우가 있다. 그리하여 corn meal agar, urease test, 모발천공시험등을 통해 재동정한다⁶. 또한 이것을 보완하기 위하여 potato dextrose corn meal tween-80 agar (PDCT)를 널리 사용하

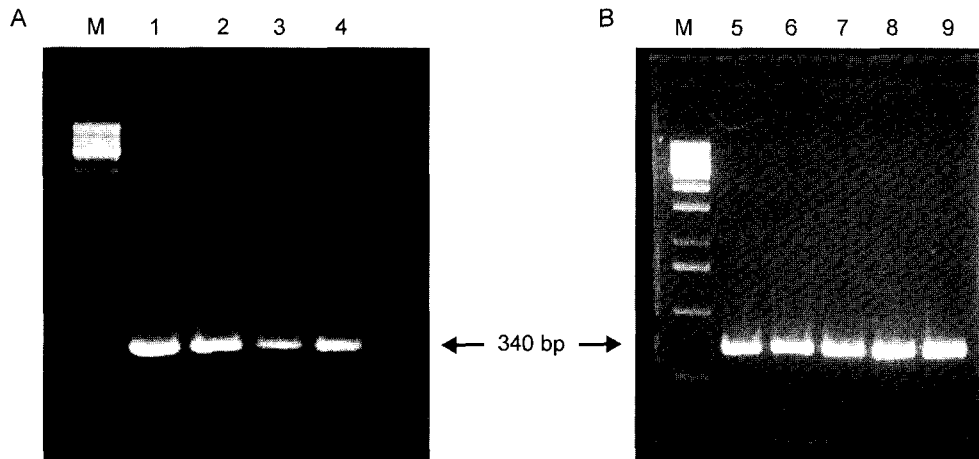


Fig 11. Specific PCR product of dermatophytes.

A: controls M: 1Kb ladder 1: *T.mentagrophytes* 2: *M.audonii* 3: *T.rubrum* 4: *M.canis* B: clinical isolates 5: *M.canis* 6: *M.canis*: 7: *M.canis* 8: *M.canis* 9: *mentagrophytes*

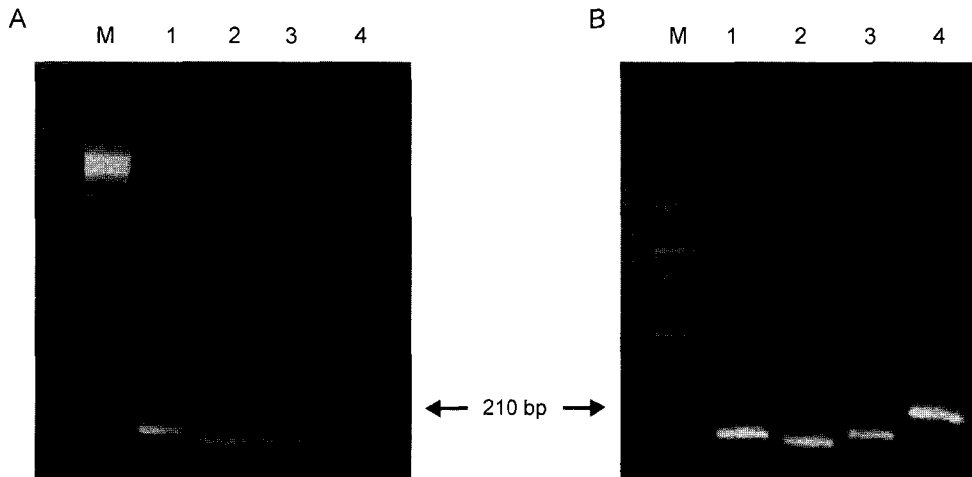


Fig 12. specific PCR product of filamentous fungi, yeast and *malassezia spp.*

A: filamentous fungi M: 1Kb ladder 1: *A.fumigatus* 2: *A.niger* 3: *penicillium spp.* 4: *alternaria spp.* B: yeast and *malassezia spp.* M: 100 bp ladder 1: *C.albicans* 2: *C.ciferrii* 3: *R.minuta* 4: *malassezia spp.*

고^{46,47}, 또한 DTM 배지에서의 배양 성공율을 높이기 위해 Dermatophytes Identification Medium (DIM)의 개발도 이루어졌다¹². 진균의 균사나 포자를 직접 검출하는 방법으로 KOH test를 실시하였지만, 균사가 많지 않은 경우에는 감수성이 저하되는 단점이 있다^{17,26}. 일반적으로 chlorazol black E 염색이나 KONPA 검사를 하는 방법도 있는데³⁸, 최근 시도되는 방법에는 Neutral red 염색법이 있다^{25,45}.

피부사상균은 25°C, 효모와 사상성 진균으로 의심되는 검체는 35°C에서 배양되었다. 이것은 배양온도가 성장에 있어서 감수성³⁶을 가지게 되고, 효모와 같은 경우는 온도에 따라 후막포자를 형성하는 경우와 형성하지 않는 경우가 나타나므로 유의해서 배양했다⁴¹. *Candida albicans* 같은 경우는 25°C에서 후막포자를 형성하지만, 30°C 이상의 온도에서는

후막포자 형성이 되지 않는다^{3,42,52}. *Malassezia spp.*는 일반 염색상에서 비교적 용이하게 관찰이 되며 일반적인 수의임상에서는 DIFF-QUICK 염색이 권장된다²⁴. 또한 배지는 Leeming과 Notman의 배지가 가장 권장된다^{16,51}.

피부사상균의 동정은 모발에서의 침범양상, 분리된 집락의 육안적 소견, 집락의 현미경적 소견, 여러 영양배지에서의 성장여부, 성장온도 및 생화학적 성상을 통해 균종을 동정할 수 있으며, 유성세대가 확인된 균종은 교배실험을 통해 최근에는 분자생물학적인 방법을 통해 확인할 수 있다^{39,48}. 피부사상균은 모발, 피부의 각질층 및 조갑에서 병변을 일으킬 뿐 아니라, cycloheximide가 함유된 배지에서 잘 자라며, 배지의 산도가 알칼리에서도 잘 자라고, 성장하면서 알칼리로 변화시키며 현미경 소견상 대분생자와 소분생자를 생산시킨

다³¹. 피부사상균은 처음에는 배지의 단백질을 사용하며 알칼리성 대사산물은 배지를 황색에서 적색으로 변화시킨다. 단백질이 고갈된 후에 피부사상균은 탄수화물을 사용하여 산성 대사산물을 남긴다. 배지는 적색에서 황색으로 바뀐다. 대부분의 다른 진균은 탄수화물을 처음에 사용하고 난 후에만 단백질을 사용한다. 이 결과 DTM이 적색으로 변할 수 있으나 장기간(10-14일)의 배양 후에만 나타난다²³. Urease 산생 검사에서 *Trichophyton mentagrophytes*의 표준균주와 임상분리주는 변색을 확인하였고, *Trichophyton rubrum*은 무색반응을 나타내었다. 그러나 *Microsporum gypseum*와 *Microsporum canis*에서도 변색 반응이 있으므로 유의하여야 한다. 또한 모발천공 검사 역시 *Trichophyton mentagrophytes* 외에도 *Microsporum gypeum*의 모발천공능력이 강함을 유의, 다른 균종과의 동정에 주의해야 한다^{41,59}. 개에서 피부 사상균은 *Microsporum canis*와 *Trichophyton mentagrophytes*가 검출되었는데 이것은 지금까지의 기존의 연구결과와 매우 동일한 양상을 나타내었다^{50,56,62}. *Microsporum canis*는 성장이 빠르고 백색, 양털 모양의 집락을 형성하며, 배지 뒷면은 밝은 황색 내지 오렌지 색을 띤다. 이번 실험에서 표준균주와는 다르게 임상 분리주에서는 배양기간이 더 길어진 것도 있었다. *Microsporum canis*의 특징적인 현미경적 소견은 긴 능형으로 비대칭적이며 벽이 두껍고 표면은 작은 돌기가 있고 6개 이상의 격벽이 있는 대분생자가 있는 것이다. 곤봉모양의 소분생자도 간혹 발견된다. 그러나 pleomorphism이 생기거나 최근에는 환축의 분리주에서도 대분생자가 생성되지 않는 경우가 있어 동정에 어려움이 많으며 이때 autoclaved rice grain, potato dextrose agar에서 배양하면 대분생자의 생성이 많아져서 대분생자를 발견할 수 있다⁴¹. *Trichophyton mentagrophytes*은 황색과립의 덩어리가 사방으로 수직상으로 뻗어있는 과립형 집락이 존재한다. 과립형 집락에서는 소분생자가 많이 발견되고 있다⁴¹. 이번 실험에서 주된 감별요인은 urase test와 모발천공시험이었다. 그러나 다른 균종과의 감별에서는 이들의 검사법이 정확한 지표가 될 수 없었다.

사상성 진균에서 *Aspergillus spp.*는 포자가 고도로 분지되어 있으며, 원형의 축주(columella)를 특징으로 하는 곰팡이로써 주변환경에 널리 분포되어 있다. 그러나 포유류는 조류나 파충류에 비하여 *Aspergillus*에 상대적으로 저항성을 가지고 있으며, 면역억제성 약물, 장기간의 항생제 치료, 곰팡이에 오염된 사료를 통해 과도하게 포자에 노출되었을 때, *Aspergillosis*가 주로 발생한다. 대부분이 침투성으로 오는 경우가 많으며, 육아종성 균종(granulomatous mycetoma)을 폐 또는 기관지에 일으키며⁵², 폐조직을 통하여 혈류를 따라 파종성으로 신체의 여러 부위로 확산되기도 한다. 현재까지 피부 점막피부의 *Aspergillosis*는 개에서만 보고되었고 염증, 탈색, 궤양, 그리고 외비도와 때때로 비경의 가피형성 및 비루가 속발성으로 보일 수 있다. 부생 진균인 *Alternaria spp.*도 검출되었는데 이 균은 땅과 유기 노폐물속에 산재하는 사물기생성 진균으로 고양이와 개의 소화기의 미생물총에 흔

한 성분이다. 기회 창상감염을 유발하며 *Alternaria spp.*는 개와 고양이에서 드물게 피부질환을 유발하는 것으로 보고되고 있으며, 피부의 간찰진이나 외상부위에서 불분명한 분획의 탈모, 홍반과 인설 형성, 코의 결절성으로 궤양화 되고 탈색된 염증 등이 나타난다²³.

효모 중에서 일반적인 *Candida spp.* 외에 *Rhodotorula spp.*가 검출되었다. *Candida*는 피부, 이도, 소화관의 정상 상재균이며, 면역억제시 발생 가능한 기회병원성이다. *Rhodotorulosis*는 매우 드물며, 비경, 비공, 코연접부, 눈주위 등의 반죽상 가피를 동반한 홍반성 피부염을 가진다. 그러나 이번 실험에서의 검출은 직접적인 병원성의 유무를 정확히 알 수가 없었다. 그러나 여러 배지와 방법을 통한 배양으로 나온 결과로써 직접적인 병원성을 알기 위해서는 생체조직의 생검과 조직의 염색이 필요하였다^{37,54}.

현재 수의학에서도 기존의 진단방법 중에서는 가장 신속하게 시행되고 배양의 기간없이 검체만 가지고 진단을 내릴 수 있는 분자생물학적인 연구가 여러방면에서 시행되고 있다. 진균의 검출방법 중 분자생물학적인 방법은 여러가지가 있는데, 전기영동과 ethidium bromide는 종특이 PCR인 경우 전기영동 후 ethidium bromide 염색하여 증폭여부와 그 크기를 보고 진균을 동정할 수 있다. 가장 빠르고 간단하지만, blotting 후 probe를 사용하는 것보다 감수성이 낮다. 범진균 primer를 사용하여 PCR을 하면 전기영동상 증폭된 DNA의 크기가 대부분 비슷하므로 어떤 균종인가를 구분하는 단계가 필요하다.

이번 실험에서 분석한 ITS는 유핵세포 핵내의 ribosomal RNA유전자 (rDNA)를 표준대상으로 하였는데, 이것은 균종간 상이함은 물론 같은 균종내에조차도 다양할 수 있다³⁵고 하며 세균동정에 유용하게 사용되어져 왔고¹², 18S, 5.8S 및 28S rDNA 사이에 ITS1 부위와 ITS2 부위가 있는데 18S rDNA와 5.8S rDNA 사이에 위치한 ITS1 부위가 ITS2 부위보다 염기서열 변이가 더 심하다고 하였다⁹. 최근까지 ITS1 부위의 진균의 분류에 대한 보고도 다수 있었다³³. 그리하여 이 부분을 통한 연구가 이루어졌다.

피부사상균과 사상성 진균의 band가 각각 340 bp와 210 bp로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 효모와 *Malassezia spp.*는 210 bp와 260 bp를 나타내었다. 그러나 다른 균종과의 차이점이 없기에 염기서열 분석 같은 보강 연구가 있다면 세부적인 균종의 분리가 가능함을 알 수 있었다. 그러나 일반적으로 감염여부의 판단에는 빠르며 정확한 방법으로 사료된다. PCR-DNA 염기서열 분석은 증폭된 DNA의 염기서열을 알 수 있으면 많은 정보를 얻을 수 있는 장점이 있지만 시간과 비용이 많이 든다⁵⁹.

이외에도 진균감염의 분자생물학적 진단 방법에는 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)와 RAPD(Randomly amplified polymorphic DNA)이 있다. PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)은 증폭된 PCR산물을 제한효소처리후 전기영동하여 절단된 크기를 비교하여 보면 염기서열의 차이를 간접적으로 알 수 있다. 그

러나 제한효소를 처리하는 시간과 비용, 높은 순도의 진균 DNA, 많은 양의 PCR 산물 등이 필요하다. RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA)은 Random primer와 낮은 온도의 결합반응으로 PCR하면 다양한 크기의 DNA를 얻을 수 있다. 따라서 염기서열을 알지 못하는 진균들도 균종을 구분할 수 있는 장점이 있으나, 반응조건에 따라 결과가 달라지는 등 재현성이 높지 않다^{1,49}.

이상으로 진균의 ITS1 부위의 분석으로 전통적인 방법으로 분류 및 동정이 적어도 2-3주 걸리고 때로는 어려웠던 것이 1-3일내 빠르게 균종 동정과 계통발생 연구를 할 수 있는 가능성을 확인하고 진균 감염 검출의 전통적인 방법에 보완이 될 수 있으며 진균성 감염의 진단에 유용할 것으로 생각된다.

결 론

서울 및 경기 지역에 피부병으로 내원한 개 50마리에서 일반적인 배양 및 분리 방법과 분자 생물학적인 분류 방법으로 진균의 분리 및 동정을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 피부사상균은 36.4%, 효모 13.5%, 사상성 진균 35.3%, 표재성 진균 13.6%가 검출되었다.
2. 피부사상균이 분리된 개에서 *Microsporum canis*는 75%, *Trichophyton mentagrophytes*는 25%가 분리되었다.
3. 효모가 분리된 개에서 *Candida albicans* 16.7%, *Rhodotorula minuta* 16.7%, *Candida kefyr* 16.7% 그리고 *Malassezia spp* 50%가 분리되었다.
4. 사상성진균이 분리된 개에서 *Aspergillus fumigatus* 12.5%, *Aspergillus niger* 12.5%, *Penicillium spp* 50%, *Alternaria spp* 25%가 분리되었다.
5. 피부사상균은 염색된 agarose gel에서 ITS1 부위는 340 bp의 band를 나타내었다.
6. 사상성진균과 효모에서는 염색된 agarose gel에서 ITS1 부위는 210 bp의 band를 나타내었다.

참 고 문 헌

1. Anly SA, Melo, Leila P. de Almeida, Arnaldo L. Colombo, Marcelo RS. Briones, Evolutionary distances and identification of *Candida* species in clinical isolates by Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD). *Mycopathol* 1998; 142: 57-66.
2. Baek SC, Chae HJ, Houh D. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Int J Dermatol* 1998; 37: 682-688.
3. Cannon PF. International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. Part 2. *Microbial Sciences* 1986; 3: 285-287.
4. Catten MD, Murr AH, Glodstein JA, Mhatre AN, Lalwani AK. Detection of fungi in the nasal mucosa using polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 2001; 111: 399-402.
5. Dean DA, Burchard KW. Fungal infection in surgical patients. *Am J Surg* 1996; 171: 374-382.
6. Elewski BE, Hazen PG. The superficial mycoses and the dermatophytes. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 655-673.
7. Gracer Y, Fari ME, Presber W, Sterry W, Tietz HJ. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermomyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol* 1998; 138: 576-582.
8. Haneke E. Fungal infections of the nail. *Semin Dermatol* 1991; 10: 41-53.
9. Hershkovitz MA, Lewis LA. Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Mol Biol Evol*, 1996; 13: 1276-1295.
10. Hopfer RL. Use of molecular biological techniques in the diagnostic laboratory for detecting and differentiating fungi. *Arch Med Res* 1995; 26: 287-292.
11. Ira F. Salkin, Arvind A, Padhye, Kemna ME. A new Medium for the Presumptive Identification of Dermatophytes. *J Clin Microbiol* 1997; 2660-2662: 1997.
12. Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Apl Environ Microbiol* 1993; 59: 945-952.
13. Kano R, Okabayashi K, Nakamura Y, Ooka S, Kashima M, Mizoguchi M, Watanabe S, Hasegawa A. Differences among chitin synthase 1 gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Med Mycol* 2000; 38: 47-50.
14. Kim JA, de Gusmao NB, Okada K, Takaki GM, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M. Identification of *Trichophyton tonsurans* by random amplified polymorphic DNA. *Ann Dermatol* 1999; 11: 135-141.
15. Koichi Makiumra. Detection and identification of a wide range of medically important fungal species from PCR and Southern analysis. 1996.
16. Leeming JP, Notman FH. Improved methods for isolation and enumeration of *Malassezia furfur* from human skin. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 2017-2019.
17. Lefler E, Haim S. Evaluation of direct microscopic examination versus culture in the diagnosis of superficial fungal infection. *Mykosen* 1981; 24: 102-106.
18. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Molecular dermination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 1997; 137: 351-355.
19. Loeffler J, Hebart H, Magga S, Schmidt D, Klingspor L, Tollemar J, Schumacher U, Einsele H. Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diag Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 207-212.
20. Lyles RH, Chy C, Mellors, JW, Margolick JB, Detels R, Giorgi JV, Al-Shboull Q, Phair JP. Prognostic value of plasma HIV RNA in the natural history of Pneumocystis carinii pneumonia, cytomegalovirus and Mycobacterium avium complex. Multicenter AIDS cohort study. *AIDS* 1999; 13: 341-349.
21. Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H, Yamaguchi H. Phylogenetic Classification and Species Identification of Dermatophyte Strains Based on DNA Sequences of Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1 Regions. *J Clin Microbiol* 1999;

- 920-924.
22. Midgley G, Moore MK, Cook JC. Mycology of nail disorders. *J Am Acad Dermatol* 1994; 31: 64-74.
 23. Miller WH, Scott DW, Griffin CE. Small animal dermatology. 5th Philadelphia WB Saunders 1995: 316-372.
 24. Michell TG, Sandin RL, Bowman BH, Meyer W, Merz WG. Molecular Mycology; DNA probes and applications of PCR technology. *J Med Vet Mycol*, 1994; 32: 351-366.
 25. Naka W, Hanyaku H, Tajimi S. Application of neutral red staining for evaluation in human scales. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 31-36.
 26. Nishimoto K, Homma K. Comparative study between potassium hydroxide mount and culture examination during the treatment of dermatophytoses and candidiasis. *Jap. J Med Mycol* 1986; 27: 119-123.
 27. Odds FC. *Candida and Candidosis*. 2nd ed. London: Bailliere Tindall. 1988.
 28. Pfaller M, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species; frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY program. The SENTRY Participant Group. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1886-1889.
 29. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK, Carter GR. Class Mycology, subclass *Aspergillus* species In: *Clin Vet Microbiol*. 1994: 391-394.
 30. Rebell G, Talpin D. *Dermatophytes ; their recognition and identification* University of Miami Press coral Gable. 1974: 1-118.
 31. Sher RK, Ackerman AB. Subtle clues to diagnosis from biopsies of nails. *Am J Dermatopath* 1980; 2: 55-56.
 32. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. *Eur J Clin Invest* 2000; 30: 511-518.
 33. Uijthof JMJ, Van Belkum A, de Hoog GS, Haase S. *Exophiala dermatitidis* and *Sarcinomyces phaeomuriformis*, ITS1-sequencing and nutritional physiology. *Med Mycol* 1998; 36: 143-151.
 34. Wenzel RP. Nosocomial candidemia risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1531-1534.
 35. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J, Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. San Diego Academic Press. 1990: 315-247.
 36. 광태훈, 최중수, 김기홍. 배양온도가 피부사상균의 경구용 항진균제 감수성 검사에 미치는 영향. *대한피부과학회지* 1995; 33: 240-247.
 37. 권경술, 임채성, 장호선, 정태안, 오창근. 표재성 및 심재성 진균증의 진단에 있어서 Fungi-Fluor(r) solution 염색의 유용성에 관한 연구. *대한피부과학회지* 1997; 35: 870-876.
 38. 권윤희, 조백기. 조갑진균증의 진단에 있어서 KONPA 검사의 임상적 의의. *대한피부과학회지* 1996; 34: 527-537.
 39. 김기홍. 피부사상균의 동정. *대한의진균학회지* 1997; 2: 1-8.
 40. 김성욱, 조백기. 조갑진균증에서 진균 배양과 병리조직소견의 비교검토. *대한의진균학회지* 1997; 2: 31-42.
 41. 김영균, 김태운, 김신부, 김성권, 김승균, 김영자, 김충환, 김봉철, 이건설, 정경석, 이장호, 최양순. *임상진균학*. 2판 서울: 고려의학 2000.
 42. 김영지. 개 및 바다사자의 피부사상균에 대하여. *경북대학교 석사논문* 1996.
 43. 김태중, 장국현. 젖소의 유방염유두에서 분리된 *Candida* 속 진균의 성장과 약제 감수성. *축산과학연구소논문집* 1986; 11: 211-218.
 44. 박용묘, 최중수, 김기홍. Potato Dextrose Agar에서 배양한 수증 백선균의 육안적 및 현미경 소견. *대한피부과학회지* 1991; 29: 364-376.
 45. 박장규, 이우재, 서기범, 이중훈. Neutral red 염색을 이용한 피부사상균의 생육성 평가. *대한피부과학회지* 1996; 34: 122-126.
 46. 방용준, 이건설, 김쌍용. Potato Dextrose Corn meal Tween 80 agar에서 *Trichophyton mentagrophytes* 아형의 진균학적 성장. *임상병리검사과학회지* 1999; 31: 120-127.
 47. 방용준, 이건설, 노병의. 새로 고안한 배지에서 진균학적 동정에 관한 연구. *임상병리검사과학회지* 1995: 27-31.
 48. 서순봉, 김기홍, 방용준. *의진균학*. 2판. 서울: 대학서림. 1999.
 49. 신재은. 개와 고양이 피부사상균증의 역학적 및 진균학적 연구. *강원대학교 석사논문* 1999.
 50. 신종희, 이창재, 이지연, 송정원, 기승정, 서순팔, 양동욱. 임상검사실에서 분리된 *Aspergillus* Species에 대한 Random Amplified Polymorphic DNA 분석. *대한임상미생물학회지* 2001; 4: 33-39.
 51. 안규중. 전풍 병변에서 배양된 *Malassezia* 균종의 분류. *대한피부과학회지* 1997; 35: 736-743.
 52. 윤병일, 허권, 김대용, 박용복, 하태영, 서일복. 말에서 급성장염과 관련된 폐장에서의 *Aspergillus* 감염증. *한국임상수의학회지* 1998; 15: 180-114.
 53. 이영신, 유재일, 최연화, 주형렬, 김봉수, 김동한. RAPD PCR분석에 의한 국내 피부사상균속 분류 및 동정. *대한의진균학회지* 1998; 3: 107-114.
 54. 이종서, 이광훈. 조갑진균증의 진단방법에 관한 비교 연구. *대한피부과학회지* 1995; 33: 467-473.
 55. 조상현, 조백기. 조갑백선에서 병리조직검사의 임상적 의의. *가톨릭대학 의학부 논문집* 1990; 43: 993-1001.
 56. Joseph M, Schech, 허준호, 이병천. Survey and case study of dermatophytosis of dog and cat occurring in Seoul area. *대한수의학회지* 1992; 32: 681-689.
 57. 주진숙. 실험쥐의 피부사상균증 및 분리균의 항진균제에 대한 감수성. *경북대학교 석사논문* 1998.
 58. 주진숙, 최원필. 실험쥐의 피부사상균증 및 피부 정상진균총에 관한 연구. *대한수의공보학회지* 1998; 22: 49-56.
 59. 최원필, 윤성웅, 송동준, 이춘식, 김영은, 박철정. *Microsporum*에 의한 개의 피부사상균증 및 개, 고양이의 피부사상균보급현황. *대한수의학회지* 1999; 33: 35-239.
 60. 최원필, 이현준, 조길제, 하태영. 말의 피부사상균 및 피부 mycoflora에 관한 연구. *대한수의학회지* 1996; 36: 389-394.
 61. 최원필, 강신범, 고흥범, 김용환, 김종면, 김태중, 우희종, 이두식, 전부형, 최신수의미생물학, 번역학. 대구 경북대학교출판부 1996.
 62. 최원필, 이순일, 이근우. 개 피부병의 병인학적 및 역학적 특성 연구. *대한수의학회지* 2000; 40: 94-100.
 63. 최중수, 김기홍, 신동훈, 이순정, 박용묘. DNA probe를 이용한 피부사상균의 동정. *대한피부과학회지* 199; 37(부록): 65.
 64. 최중수, 황계영, 김기홍, 신동훈, 이태훈, 김성광. Arbitrarily Prmed PCR를 이용한 피부사상균의 동정 및 분류. *대한피부연구학회지* 1995; 3: 39-50.