

Isolation and Identification of *Candida dubliniensis* and Distribution of *Candida* spp. from Oral Cavity of Healthy People

Su Jung Kim

Department of Biomedical Laboratory Science, Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea

Candida spp. are yeast form fungi, which cause an opportunistic infections in a immune suppressed patients however it is a normal flora of the respiratory system, the gastrointestinal system, and the urogenital system of healthy person. It is investigated that the distribution of *Candida* spp. cause an oral disease from oral cavity of healthy people and also identified *Candida dubliniensis*. Distribution and identification of the yeast form fungi in oral cavities of healthy people was investigated by an automatic identifier, VITEK2 system. We found 21 strains of *Candida albicans*, 3 strains of *Candida famata*, one strain of *Candida tropicalis*, *Candida haemulonii*, *Candida krusei*, and *Candida dubliniensis*. In addition, one strain of *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., and two unknown strains were isolated. *Candida dubliniensis* which forms a mass by more than 2 chlamydo-spores was isolated from a healthy person for the first time. *Candida dubliniensis* was not grown at 42°C whereas *Candida albicans* was grown well. It is known that *Candida dubliniensis* was isolated in AIDS while it is found in healthy people from this study, which will be helpful to investigate the distribution of *Candida* spp.

Keywords: *Candida dubliniensis*, Oral cavity, *Candida* spp.

Corresponding author: Su Jung Kim
Department of Biomedical Laboratory Science,
Daegu Health College, Daegu 702-722, Korea.
Tel: 82-53-320-1303
E-mail: sjkim@mail.dhc.ac.kr

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2013 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

Received: October 6, 2013
Revised: November 18, 2013
Accepted: November 19, 2013

서론

Candida spp.는 인체에 상재하는 효모형 진균으로서 정상인에서 약 30~50%정도로 분리되며 호흡기계, 장관계 및 생식기계 등에 상재하고 있으면서 면역이 저하된 환자에게 발생하는 기회감염의 원인균이다(Gutierrez 등, 2002; Shin 등, 2004; Kim 등, 2012). 특히, 구강 내 상재하는 *Candida* spp.는 인체의 건강상태를 반영하며 면역기전이 약화된 당뇨병이나 갑상선 기능저하 등의 내분비계 이상으로 나타나는 질환에서도 *Candida albicans*가 정상인 보다 많이 검출됨이 보고되었다(Lee 등, 2002). *Candida* 속에는 약 200여종이 분포하며 그 중 병원균으로 분류되는 것으로는 *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, 그리고 *Candida parapsilosis* 등이 있으며 최근 *Candida albicans*로 잘못 분류되었다가 1995년에 새롭게 명명된 *Candida dubliniensis*는 Human immunodeficiency virus (HIV) 감염 환자의 구강으로부터

터 처음 분리되었다(Oh 등, 2005; Kim 등, 2009). 최근 많은 연구진들의 연구에 따르면 *Candida dubliniensis*는 HIV 환자뿐만 아니라 면역억제제 투여자 등의 기초질환을 앓고 있는 환자에게서도 분리되었다(Giammanco 등, 2002). 침윤성 질병을 유발하는 것으로 알려진 *Candida dubliniensis*는 *Candida albicans*와 같이 구강상피세포 및 점막에 부착하는데 이것은 aspartyl proteinases의 분비에 의해 이루어지며 구강상피세포내로 흡착하여 구강 및 점막을 침윤하여 독성을 유발한다(Gutierrez 등, 2002). 균종에 따라 특이질환을 유발하기에 이들 종의 정확한 동정은 임상적으로 매우 중요하다. *Candida dubliniensis*와 *Candida albicans*는 형태학적으로 매우 유사하여 분리동정 시 매우 유사한 성상을 나타내고 있는데 차이점으로는 후막포자(chlamydo-spore)의 형성 개수, CHROM agar에서의 집락의 성상, 42°C에서의 증식 유무 등으로 감별할 수 있으며 미생물 자동화 기기인 VITEK 2 System (Bio merieux Inc. Hazelwood, MO, USA)과 분자생물학적 기법을 이용하여 최종 동

정한다(Bang 등, 1996; Yu 등, 2012).

국내 많은 연구진들에 의해 *Candida* spp.의 분포 및 동정에 관한 연구는 6개월 이상 스테로이드제 복용환자, 당뇨병환자, 악성종양환자 등의 구강으로부터 칸디다균의 분포를 조사하였으며 특히, *Candida dubliniensis*에 대한 조사는 2009년에 환자 호흡기 분비물로부터 *Candida dubliniensis*를 분리하고자 하였으나 분리되지 않았으며, 2012년에 칸디다증 환자의 혈액으로부터 *Candida dubliniensis*가 처음 보고되었다(Kim 등, 2009; Kim 등, 2010; Yu 등, 2012). 그러나 아직 환자가 아닌 정상인의 구강에서는 분리된 바 없다.

이런 이유로 본 연구진은 정상인의 구강 내에서 어떤 종류의 *Candida* spp.가 분리되는지를 살펴보고, 과거에는 *Candida dubliniensis*가 *Candida albicans*로 잘못 동정되는 경우가 많았기에 본 실험에서는 정확히 감별하기 위한 방법으로 온도에 따른 집락 생성 유무, Sabouraud dextrose agar (SDA; Becton, Dickinson and Company, USA)에서 집락 모양, 후막포자 형성 개수, 그리고 VITEK 2 System을 이용하여 다양한 방법을 통해 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 및 채취방법

본 연구는 2012년 9월에서 10월 사이 대구시 거주자로서 검체 채취 6개월전부터 질병으로 병원을 내원한 적인 없고, 당뇨와 고혈압을 앓고 있지 않는 성인을 대상으로 하였으며 성별 분포는 남성 64명, 여성 56명으로 총 120명을 대상으로 하였다. 채취방법으로는 멸균된 설압자를 이용하여 구강 내 점막부위를 2~3회 채취하였다(Bang 등, 1996).

2. 배양

효모균 배양을 위해 Sabouraud dextrose agar (SDA; Becton, Dickinson and Company, USA)를 이용하여 검체를 접종하고 실온에서 3일간 배양하였다(Bang 등, 1996; Lee 등, 2002).

3. VITEK 2 system

정확한 *Candida* spp.를 동정하기 위해 SDA에서 자란 집락을 이용하여 미생물 자동화 기기인 VITEK 2 System (Bio merieux Inc. Hazelwood, MO, USA)을 이용하여 최종 균명을 동정하였다(Kown 등, 2002; Kim 등, 2009; Choi 등, 2010).

4. Slide culture

SDA를 10 mm 정도의 정사각형으로 자른 다음 slide glass에 놓

고 yeast형 집락을 채취하여 10 mm 정사각형 배지표면에 획선을 그어 균을 접종하고 그 위에 cover glass를 덮은 후 약 3~7일간 배양한다. 자란 집락을 확인하기 위해 새로운 slide에 lactophenol cotton blue를 한 방울 놓고 배양 시 덮어놓은 cover glass를 slide에 덮은 후 현미경을 이용하여 200배 저배율에서 후막포자를 관찰하였다(Bang 등, 1996).

5. 발아관 시험

*Candida dubliniensis*와 *Candida albicans*의 특징인 발아관 생성여부를 확인하기 위해 멸균시험관에 사람혈청과 SDA에서 자란 집락을 넣고 37°C, 2~3시간 배양 후 광학현미경을 이용하여 발아관을 확인하였다(Park and Lee, 2008).

6. 42°C 발육능

온도에 따른 *Candida dubliniensis*와 *Candida albicans*의 집락 형성 유무를 이용하여 감별을 위해 SDA에 접종 후 42°C에서 48시간 배양하였다(Ells 등, 2011)

결 과

1. 정상인의 구강 내 효모양 곰팡이 분포 및 동정

2012년 9월에서 10월 사이 대구시 거주자로서 남성 64명, 여성 56명으로 총 120명을 대상으로 멸균된 설압자를 이용하여 구강 내 점막부위를 닦은 후 SDA에 접종한 후 실온에서 3일간 배양한 결과 전체 120개의 배지에서 균이 배양되었으며 그 중 33명에서 33주의 효모형균이 배양되었고 나머지 87명에서 87주의 균사형균이 분리되었다. 미생물 자동화 기기인 VITEK 2 System을 이용하여 33주의 효모형 곰팡이를 동정한 결과, *Candida* spp. 29주, *Cryptococcus laurentii* 1주, *Saccharomyces cerevisiae* 1주, 그리고 미동정 균주 2주로 동정되었다. *Candida* spp. 29주는 *Candida albicans*가 21주, *Candida famata* 2주, *Candida sake* 1주, *Candida tropicalis* 1주, *Candida haemulonii* 1주, *Candida krusei* 1주, *Candida parapsilosis* 1주, 그리고 *Candida dubliniensis* 1주가 동정되었다. 남녀별 분리 빈도는 남자는 15명(45%), 여자는 18명(55%)에서 효모균이 분리되었다. 남자의 경우 *Candida albicans*가 11주(73%), *Candida dubliniensis* 1주(6.7%), *Candida parapsilosis* 1주(6.7%), *Candida famata* 1주(6.7%), 미동정 균주가 1(6.7%)분리 되었다. 여자의 경우는 *Candida albicans*가 10주(55.6%), *Candida krusei* 1주(5.6%), *Candida famata* 1주(5.6%), *Candida tropicalis* 1주(5.6%), *Candida sake* 1주(5.6%), *Candida haemulonii* 1주(5.6%), *Cryptococcus laurentii* 1주(5.6%), *Saccharomyces cerevisiae*

1주(5.6%), 그리고 미동정 균주 1주(5.6%)가 분리되었다. 각 연령대별 효모균 분리율은 20대 28.6%(8/28명), 30대 14.3%(3/21명), 40대 31.9%(7/22명), 50대 25%(4/16명), 60대 이상 38%(11/29명) 분리 되었다(Table 1).

2. *Candida albicans*와 *Candida dubliniensis*의 감별

SDA에서 *Candida albicans* 균종은 광택이 있는 백색집락을 형성하고 *Candida dubliniensis*는 거친 백색집락으로 자라며(Fig. 1) 발아관 형성시험 시 사람혈청과 SDA에서 자란 균집락을 넣고 37°C, 2~3시간 배양 후 광학현미경으로 관찰하면 2 균종 모두 발아관을 생성하였다(Fig. 2). 2 균종 간의 감별점으로는 후막포자 생성 개수로 구별하며 후막포자를 관찰하기 위해 Slide culture를 통해 배양된 균을 lactophenol cotton blue로 염색하여 광학현미경

을 이용하여 400배에서 관찰하였다. *Candida dubliniensis* 균종은 후막포자를 2개 이상 형성하여 덩어리지만 *Candida albicans* 균종은 후막포자를 1개 생성하였다(Fig. 3). 또한, 42°C 발육능을 조사한 결과, *Candida dubliniensis*는 42°C 미발육이나 *Candida albicans*는 발육하였다(Fig. 4).

고 찰

Candida spp.는 인체부위 중 마찰을 일으키는 곳과 습윤한 피부에 상재하며 숙주의 방어기능이 저하되었을 때 가장 주목할 수 있는 균종으로 알려져 있다(Bang 등, 1996; Ells 등, 2011). 칸디다 감염증은 당뇨, 고혈압 등의 만성질환과 면역결핍증인 AIDS, 그리고 스테로이드제와 면역 억제제를 투여 받는 면역이 약화된 환자에서 분리빈도가 높다고 보고 되었다(Yoo 등, 2001; Giammanco 등, 2002; Shin 등, 2004). *Candida* spp. 중 *C. albicans*가 가장 많이 분리되고 있으며 패혈증을 유발하는 칸디다혈증의 원인균으로 알려져 있다(Oh 등, 2005). 최근 최신 진단동정기기와 분자생물학적 동정법의 발달로 *C. albicans*의 일부가 *C. dubliniensis*로 재동정되었다(Oh 등, 2005; Kim 등, 2009; Ells 등, 2011). 2균종은 형태학적으로 매우 유사하여 병원내에서도 진단시 어려움을 나타내고 있기에 감별점으로는 CHROM agar에서 집락 모양, 후막포자 형성 개수, VITEK 2 System, 그리고 분자생물학적 진단법이 이용되었다(Sanguinetti 등, 2007; Ells 등, 2011). 병원성 곰팡이를 최종 동정

Table 1. Identification of microorganisms isolated from Oral Cavity using the VITEK system

Sex	Isolation fungi (%)
Male	<i>Candida albicans</i> 11주(73%)
	<i>Candida dubliniensis</i> 1주(6.7%)
	<i>Candida parapsilosis</i> 1주(6.7%)
	<i>Candida famata</i> 1주(6.7%)
	미동정 균주 1주(6.7%)
Female	<i>Candida albicans</i> 10주(55.6%)
	<i>Candida krusei</i> 1주(5.6%)
	<i>Candida famata</i> 1주(5.6%)
	<i>Candida tropicalis</i> 1주(5.6%)
	<i>Candida sake</i> 1주(5.6%)
	<i>Candida haemulonii</i> 1주(5.6%)
	<i>Cryptococcus laurentii</i> 1주(5.6%)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1주(5.6%)
	미동정 균주 1주(5.6%)

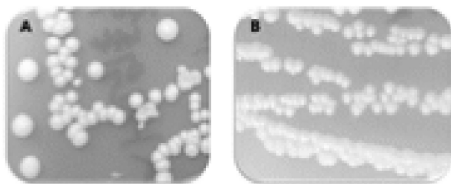


Fig. 1. Morphology Colony between *Candida dubliniensis* (A) and *Candida albicans* (B) on Sabouraud dextrose agar. (A) rough colonies (B) smooth colonies.

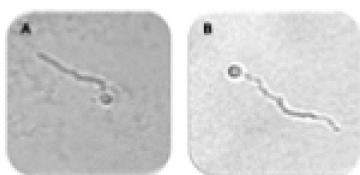


Fig. 2. Germ tube formation between *Candida dubliniensis* (A) and *Candida albicans* (B) as presumptive identification test.

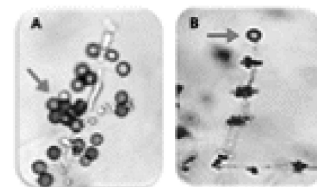


Fig. 3. Chlamydospore production by *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. (A) Example of a *Candida dubliniensis* strain demonstrating triplet of pairs of chlamydospores (arrow). (B) Example of a *Candida albicans* strain demonstrating a single terminal chlamydospore (arrow).

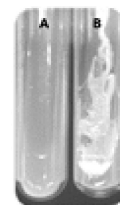


Fig. 4. Growth at the 42°C between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* on Sabouraud dextrose slant agar. *Candida dubliniensis* (A) was not grown at 42°C whereas *Candida albicans* (B) was grown well.

하는 방법으로 미생물자동기 기기인 VITEK 2 System과 분자생물학적 진단법이 많이 이용되고 있으며 VITEK 2 System은 생화학적 성장법으로 동정하며 정확도는 약 98.2%이상이고 PCR법의 정확도는 99%로 평가되었다(Sanguinetti 등, 2007). 이에 본 연구진은 다양한 구강질환을 일으키는 원인균인 *Candida* spp.의 구강 내 분포를 조사하고 국내 정상인의 구강에서 처음으로 *C. dubliniensis* 1주가 분리되었기에 *C. albicans*와의 혼동을 막기 위해 다양한 방법을 이용하여 감별하고자 하며 향후 PCR법을 이용하여 정확도를 높이고자 한다.

정상인의 구강에서 곰팡이를 분리한 결과 전체 120주가 선별되었으며 그 중 33주는 효모형이고 87주는 균사형으로 분리되었다. 그 중 효모형 곰팡이 33주를 대상으로 VITEK 2 System을 이용하여 동정한 결과, *Cryptococcus laurentii* 1주, *Saccharomyces cerevisiae* 1주, *Candida albicans*가 21주, *Candida famata* 3주, *Candida tropicalis* 1주, *Candida haemulonii* 1주, *Candida krusei* 1주, 그리고 *Candida dubliniensis* 1주, 그리고 미동정 균주가 2주가 분리되었다. 남녀별 분리 빈도는 남자는 15명 45% (15/33명), 여자는 55% (18/33명)로 나타났으며 성별에 따라서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 남자의 경우 *Candida albicans*가 11주(73%), *Candida dubliniensis* 1주(6.7%), *Candida parapsilosis* 1주(6.7%), *Candida famata* 1주(6.7%), 미동정 균주가 1 (6.7%) 분리되었고, 여자의 경우는 *Candida albicans*가 10주(55.6%), *Candida krusei* 1주(5.6%), *Candida famata* 1주(5.6%), *Candida tropicalis* 1주(5.6%), *Candida sake* 1주(5.6%), *Candida haemulonii* 1주(5.6%), *Cryptococcus laurentii* 1주(5.6%), *Saccharomyces cerevisiae* 1주(5.6%), 그리고 미동정 균주 1주(5.6%)가 분리되었다. 성별에 따라서도 균종에는 큰 변화를 나타내지 않았다. 각 연령대별 효모균 분리율은 20대 28.6% (8/28명), 30대 14.3% (3/21명), 40대 31.9% (7/22명), 50대 25% (4/16명), 60대 이상 38% (11/29명)이며 연령별 분포에서는 60대 이후에서 효모균 분리율이 높게 나타났으며 연령대가 높을수록 점차 면역력이 저하되어 구강내에 상재균이 많을 것으로 생각되며 30대에서 약간 감소한 원인은 정확히 파악되지는 않으나 적은 대상자 수를 검체로 이용한 것이 요인일 것으로 생각된다. 이런 결과는 당뇨병 환자의 구강에서 분리보고에서 연령이 높을수록 칸디다의 분리율이 높다는 연구결과와 일치하는 것으로 조사되었으나(Lee 등, 2002) 향후 연령대별 검체수를 증가시켜 연구를 진행할 필요성이 있다고 생각된다. *Candida* spp.는 정상인의 구강과 피부에 상재하면서 아구창 및 피부질환을 유발할 수 있으며 면역이 저하된 환자 특히 항암치료 및 화상환자 그리고 AIDS에서 전신감염을 유발할 수 있는 기회감염균이다. *Candida* spp. 중 가장 많이 분리되고 있는 것은 *Candida*

*albicans*이며 *Candida albicans*에 의한 패혈증을 유발시에는 치사율이 약 40~50%에 달한다(Shin 등, 1999). 과거임상에서 *Candida albicans*로 동정되었던 일부가 최근에 진단기술의 개발로 재동정한 결과 *Candida dubliniensis*로 재동정되었다. 2009년 김 등에 의하면 국내에서 *Candida dubliniensis*를 동정하고자 호흡기 검체를 대상으로 총 434주의 효모형 곰팡이를 분리하여 *Candida dubliniensis* 분리 동정하고자 하였으나 실패하였다(Kim 등, 2009). 2012년 Yu 등이 국내에서 칸디다 혈증을 앓고 있는 환자의 혈액으로부터 *Candida dubliniensis*를 CHROM agar에서의 성장, VITEK 2 System, 그리고 multiplex PCR법을 이용하여 처음으로 분리하였다(Yu 등, 2012). 본 연구진은 칸디다 균 중 국내 처음으로 정상인의 구강에서 *Candida dubliniensis*가 분리동정되었으며 *Candida albicans*와 혼동을 막기 위해 1차적 동정법으로 후막포자 생성 개수, 42°C 발육능, 그리고 VITEK 2 system을 이용하였으며 그 결과 *Candida dubliniensis*는 후막포자를 2개 이상 형성하여 덩어리지만 *Candida albicans*는 후막포자를 1개 생성하였다. 또한, 42°C 발육능을 조사한 결과, *Candida dubliniensis*는 미발육이나 *Candida albicans*는 발육하였다. 그리고 최종 미생물 자동화 동정 기기인 VITEK 2 system에서도 *Candida dubliniensis*로 균명이 확인되었으며 향후 분자생물학적 방법을 이용하여 재동정하고자 한다. 본 연구는 정상인의 구강내 *Candida* spp.의 분포추이를 조사함으로써 향후 다양한 칸디다성 질환을 연구하는 기초자료가 될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Bang YJ, Lee LG, Kim SY, Roh PU, Kim BS. Study on the distribution of *Candida* species from oral cavity. *Korean J Clin Lab Sciences*. 1996, 28:62-67.
- Choi GW, Jang WY, Lee JW, Kim SJ. Microorganism contamination from wearing one-day disposable contact lenses according to wearing time. *Korean J Microbiol*. 2010, 46:152-156.
- Ells R, Kock JL, Pohl CH. *Candida albicans* or *Candida dubliniensis*? *Mycoses*. 2011, 54:1-16.
- Giammanco GM, Pizzo G, Pecorella S, Distefano S, Pecoraro V, Milici ME. Identification of *Candida dubliniensis* among oral yeast isolates from an Italian population of human immunodeficiency virus-infected (HIV+) subjects. *Oral Microbiol Immunol*. 2002, 17:89-94.
- Gutierrez J, Morales P, Gonzalez M A, Quindos G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol*. 2002, 42:207-227.
- Kim KH, Lee MK. Vaginal *Candida* and microorganisms related to sexual transmitted diseases in women with symptoms of vaginitis. *Korean J Clin Microbiol*. 2012, 15:49-53.
- Kim TH, Lee YS, Lee MK, Lee KM. Species distribution and susceptibilities to azoles of *Candida* species including *C. tropicalis* in a tertiary burn center. *Korean J Clin Microbiol*. 2010, 13:79-84.

- Kim TH, Yun SW, Lee MK, Ro BI. Screening of *Candida dubliniensis* from respiratory samples in Korea. *Korean J Med Mycol.* 2009, 14:171-176.
- Kwon JL, Park JS. Comparison of automated systems for identification of vibrio species. *Korean J Microbiol.* 2002, 38:62-66.
- Lee SH, Kim SW, Bang YJ. A study on the distribution of oral Candidal isolates in diabetics. *Korean J Med Mycol.* 2002, 7: 139-148.
- Oh BJ, Choi HW, Lee JS, Cho D, Kee SJ, Shin MG, *et al.* Clinical and laboratory features of candidemia caused by different *Candida* species. *Korean J Lab Med.* 2005, 25:317-323.
- Park BG, Lee MK. Appropriate condition of germ tube formation as presumptive identification test for *Candida albicans*. *Korean J Med Mycol.* 2008, 13:20-25.
- Sanguinetti M, Porta R, Sali M, La Sorda M, Pecorini G, Fadda G, *et al.* Evaluation of VITEK 2 and RapID yeast plus systems for yeast species identification: experience at a large clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2007, 45:1343-6.
- Shin JH, Kim HR, Lee JN. Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from clinical specimens during the past six years. *Korean J Clin Microbiol.* 2004, 7:164-170.
- Shin KS, Hong SB, Shin HS, Park BS, Son BR. 1999. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for the epidemiological study of an outbreak of *Candida albicans* septicemia in neonatal Intensive care units. *Korean J Clin Pathol.* 1999, 19:440- 445.
- Yoo KO, Lee SK, Lee CJ, Shin JH, Suh SP, Ryang DW. Clinical characteristics of pediatric patients with candidemia. *Korean J Clin Microbiol.* 2001, 4:122-128.
- Yu N, Kim HR, LeeMK. The first Korean case of candidemia due to *Candida dubliniensis*. *Ann Lab Med.* 2012, 32:225-228.