

Rapid Identification of *Candida albicans* Using Colorimetric Method

Shin Young Kim¹ and Hun-Hee Park²

¹Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

²Department of Clinical Laboratory Science, Ansan University, Ansan 426-701, Korea

Candidiasis is a fungal infection of the most common causes; generally, opportunistic infections occur often in patients with weakened immune systems. Because of high rates in fungal infection patients and increasing frequency of being isolated from clinical materials, quickly identifying of *Candida albicans* is critical. By identifying 404 yeast cell strains of referred samples via API 20C kits, NGL and PRO tests and Germ tube (GT) test were conducted and compared. In the 3.0 McFarland yeast cells, 0.1% p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-galactosaminide (NGL) and 0.04% L-proline β-naphthylamide (PRO) were each put in test tubes and incubated at 35°C for 15, 30, 60 and 90 minutes. Afterwards, 1 drop of 2% NaOH was applied, and if the color turned yellow; it was positive for NGL test. Afterwards, 1% p-dimethylaminocinnamaldehyde was applied, and if the upper layer turned pink or red, it was positive for PRO test. NGL and PRO tests were conducted for all *C. albicans* and identified accurately within 30 minutes. In NGL, PRO test, false-positive, negative were not seen, whereas, GT test showed false-positive in 1 strain and false-negative in 3 strains. Therefore, sensitivity and specificity of NGL, PRO tests were 100% and 99.5%, respectively, and positive and negative predictive rate were 99.5% and 100%, respectively. However, GT test sensitivity and specificity were 98.5% and 99.5%, respectively, and positive and negative predictive rates were 99.5% and 98.5%, respectively. In conclusion, NGL, PRO tests are better than GT tests for sensitivity and specificity, therefore, these reliable tests will be useful in clinical laboratories.

Keywords: *Candida albicans*, Candidiasis, NGL, PRO test, API 20C kit, GT test

Corresponding author: Hun-Hee Park
Department of Clinical Laboratory Science,
Ansan University, Ansan 426-701, Korea.
Tel: 82-31-400-7140
E-mail: hueheepark@ansan.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: August 19, 2013
Revised: October 31, 2013
Accepted: November 2, 2013

서론

*C. albicans*는 임상 검체에서 가장 흔히 분리되는 진균이면서 병원성이 강하고 또한 항진균제에 내성인 균주가 증가하고 있어 임상 검사실에서 신속한 분리 및 동정이 더 중요시 되고 있다 (Kauffman 등, 1986; Hunter 등, 1989; Odds, 1993; Russell 등, 1999; Cateau 등, 2012). *C. albicans*를 포함한 효모양 진균의 동정은 주로 자동화 장비나 동정용 키트를 많이 이용하고 있으나, 비용이 많이 들고 시간이 소요되는 등의 단점이 있어 임상적으로 중요한 *C. albicans*를 빠르게 동정하기 위한 여러 종류의 다른 방법들이 고안되어 있다 (Perry와 Miller, 1990; Rousselle 등, 1994; Simpanya 등, 1995; Campbell 등, 1998). 사람 혈청에 효모양 진균을 접종하고 37°C에서 2~4시간 동안 배양한 후 발아관의 형성

유무를 보는 발아관 시험(germ tube test, GT)은 *C. albicans*의 신속 예비동정법 중에서 가장 많이 이용되는 방법이나 *Candida dubliniensis*와는 구별되지 않으며 *C. albicans* 중음성으로 나오는 균주가 있고 (Salkin 등, 1987; Perry와 Miller, 1990), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus gastricus* 등의 균주 중 일부가 발아관 시험에 양성으로 나타나는 것으로 보고 되었으며 (Fell과 Meyer, 1967; Katsura와 Uesaka, 1974; Martin, 1979), 가균사나 분아포자와 발아관의 구별이 어려우며 사람 혈청의 사용으로 인한 감염의 위험성이 존재하는 등 (Berardinelli와 Opheim, 1985)의 여러 가지 단점으로 인해 더 빠르고 용이하게 예비 동정할 수 있는 방법이 요구된다.

Fung과 Liang (1998)은 0.01% aniline blue dye가 함유된 YB 배지를 이용하여 *C. albicans*를 신속히 동정하는 방법을 개발하였

고, Odds와 Bernaerts (1994)는 CHROMagar Candida (Hardy Diagnostics, U.S.A) 에서 임상적으로 중요한 효모양 진균인 *C. albicans*, *C. tropicalis* 및 *C. krusei*의 세 종류를 99% 이상 간편하게 동정할 수 있다고 하였다. Perry 등(1990)은 기질액 p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-galactosaminide (NGL)와 L-proline β-naphtylamide (PRO)를 이용하여 90분 만에 *C. albicans*를 신속히 예비 동정법할 수 있음을 보고하였다. 본 저자들은 NGL 및 PRO test 를 국내 임상검체에서 분리된 404주의 진균을 대상으로 반응시간의 차이를 비교하여 *C. albicans*의 보다 신속한 예비동정 방법을 찾고자 하였으며 시험의 예민도 및 특이도를 조사하여 신뢰할 수 있는 검사법임을 증명하였다.

재료 및 방법

1. 재료

2011년에서 4월부터 2012년 4월까지 경기도 소재 병원에 의뢰된 각종 임상 검체에서 분리된 진균 404 균주를 대상으로 실험을 하였으며, 균종의 동정은 API 20C kit (bioMerieux, France)를 이용하였고, 90% 이상의 신뢰도로 동정된 균주들을 실험 대상으로 하였다. 또한 동일 환자의 반복된 검체에서 같은 균이 계속 검출된 경우에는 실험에서 제외하였으며, 시험 균주는 Sabouraud dextrose agar (SDA, BBL Co, U.S.A)에 접종한 후 30°C에서 18-24시간 배양하여 집락이 명확히 형성된 후 실험을 하였다. 발아관 검사시 표현형이 같은 *Candida dubliniensis*가 *C. albicans*로 잘못 동정되는 것을 방지하기 위해 신선한 사람 혼주혈청(human pooled serum, HPS)을 사용하여 실험을 진행하였다(Park 등, 2008; Kim 등, 2009).

2. 방법

1) 발아관 시험(Germ tube test)

0.5 mL의 사람 혈청에 집락을 접종하여 37°C에서 2시간 및 4시간 동안 배양한 후 광학 현미경으로 400배에서 관찰하여 발아관이 형성되는 것을 양성으로 판정하였다. 발아관은 효모 세포에서 평형하게 자라면서, 격벽과 기시부에 협착이 없는 것을 양성으로 판정하였다(Terrence와 Ihrke, 1971; Berardinelli와 Opheim, 1985).

2) NGL와 PRO 시험

0.1% p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-galactosaminide (Sigma, U.S.A)와 0.04% L-proline β-naphtylamide (Sigma, U.S.A)를 시험관(110×12 mm)에 각각 0.15 mL를 분주한 다음 시험할 효모균을 진하게 접종(McFarland turbidimeter 3.0에 맞춘)하여 35°C에서 15분, 30분, 60분, 90분으로 시간별 배양하여 비교 하였다. 배양 후 시험관에 2% NaOH 1방울을 떨어뜨려 황색이 되면 NGL 시험 양성으로 판정하였고, 그 후 1% p-dimethylamino-cinnamaldehyde (cinnamaldehyde reagents; remel, U.S.A) 용액을 같은 시험관에 1방울을 떨어뜨린 후 혼합하지 않고 1분간 방치하였다가 상층이 분홍색 또는 적색으로 변하면 PRO 시험 양성으로 판정하였다. 또한 결과에 대한 예민도 및 특이도, 양성예측율 및 음성예측율을 조사하였다.

결 과

효모균 404주를 대상으로 NGL, PRO (Sigma, U.S.A) test를 시간별 배양한 결과 15분에서는 반응결과가 나오지 않았으며 30분, 60분, 90분 결과에서 모두 양성반응을 나타내 30분만으로도 정확한 반응 결과를 얻어낼 수 있었다(Table 1). 30분 반응으로 NGL 및 PRO 시험에서 *C. albicans*는 시험한 198주 모두가 NGL 및 PRO

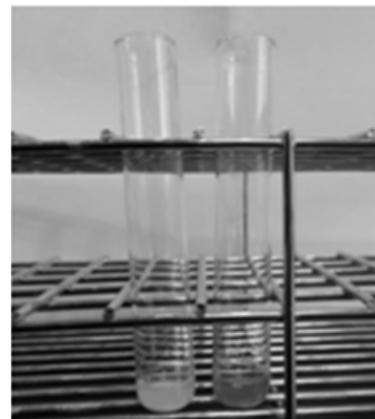


Fig. 1. NGL and PRO tests. Positive seen in NGL and PRO tests. With NGL positive (On the left in yellow) and PRO positive (On the right in red), positive results were seen in all 30-minute, 60-minute and 90-minute tests.

Table 1. Reaction results of NGL and PRO tests over time using commercialized reagents

Organism	NGL and PRO tests results over time			
	15'	30'	60'	90'
<i>Candida albicans</i> (198)	- (0/198)	+ (198/198)	+ (198/198)	+ (198/198)

’, mintues.

Table 2. Comparison of the NGL and PRO test with the GT test for the identification of 404 yeast isolates previously identified by API 20C kit

Organism	No. of isolates				GT		
	Total	NGL + PRO +	NGL + PRO -	NGL - PRO +	NGL - PRO -	+	-
<i>Blastoschizomyces capitatus</i>	2			1	1		2
<i>Candida albicans</i>	198	198				195	3
<i>Candida famata</i>	3				3		3
<i>Candida glabrata</i>	45				45		45
<i>Candida glutinis</i>	1			1			1
<i>Candida guillierceri</i>	1				1		1
<i>Candida guilliermondii</i>	2			2			2
<i>Candida humicola</i>	1		1				1
<i>Candida krusei</i>	3				3		3
<i>Candida lusitanae</i>	3			3			3
<i>Candida parapsilosis</i>	18			18			18
<i>Candida pseudotropicalis</i>	1				1		1
<i>Candida tropicalis</i>	92		72		20	1	91
<i>Cryptococcus albidus</i>	2				2		2
<i>Cryptococcus uniguttulatus</i>	2			2			2
<i>Pichia ohmeri</i>	5			4	1		5
<i>Prototheca wickerhami</i>	1			1			1
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1			1			1
<i>Rhodotorula pilimanae</i>	2			2			2
<i>Rhodotorula rubra</i>	1				1		1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2				2		2
<i>Trichosporon beigelli</i>	18	1	14	1	2		18

NGL, p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-galactosaminide; PRO, L-proline β-naphthylamide; GT, germ tube test.

시험에 양성(100%)이었으며, *C. albicans*를 제외한 효모 중 NGL 및 PRO시험에 동시 양성인 균은 *Trichosporon beigelli* 1주이었다. 따라서 NGL, PRO test의 예민도 및 특이도는 각각 100% 및 99.5%였으며, 양성 예측율과 음성 예측율은 각각 99.5% 및 100%였다(Fig. 1).

발아관 시험에서는 2시간에는 *C. albicans* 198주 중 191주가 양성(96.5%)으로 나왔으며, 4시간에는 195주가 양성(98.5%)이었고, *C. tropicalis*는 92주 중에서 1주(1.1%)가 위양성이었다. 따라서 발아관 시험의 예민도 및 특이도는 각각 98.5% 및 99.5%였으며, 양성 예측율 및 음성 예측율은 각각 99.5%와 98.5%였다(Table 2).

고찰

최근 효모양 진균을 신속히 동정하는 제품들이 널리 사용되고 있다. 이들 동정용 제품을 이용할 경우 대부분의 효모양 진균이 쉽게 동정될 수 있지만 때론 재검이 필요하고, 정확한 동정임을 확인하기 위해서는 corn meal agar에서 형태학적 검사를 하여야 한다 (Warren과 Hazen, 1999). Fenn 등(1994)은 Vitek YBC에서 24시간 만에 동정을 할 경우 *C. tropicalis* 59주 중 14주가 *C. parapsilosis*로 잘못 동정되었고, 몇 *C. krusei*도 다른 균으로 잘못

동정되었으며, API 20C를 이용할 경우 21.9%에서, Vitek YBC의 경우 12.6%에서 형태학적 확인이 필요하다고 하였다. 이와 같이 *C. albicans*를 동정하는데 있어서 Vitek YBC나 API 20C kit는 예민도와 특이도가 다소 낮으면서 최종 동정하는데 48시간이나 시간이 걸린다는 단점을 가지고 있다. Odds 등(1994)은 *C. albicans*는 CHROM agar candida에서 특징적인 초록색을 나타내므로 발아관 시험 등의 추가 동정검사가 필요 없다고 하였으며 동정율은 99%가 넘는다고 하였다. 이 방법도 CHROMagar에서 자란 집락의 색상으로 판독하기 때문에 색상 판독이 애매할 때가 있으며, 또한 최종 판정하기까지는 48시간이나 걸리기 때문에 *C. albicans*를 신속히 동정하는 데에는 적합하지 않다. 또한 Goldschmidt 등(1991)은 0.01% aniline blue dye가 함유된 YMAB 배지를 이용하여 형광을 띄는 것을 *C. albicans*로 동정하는 방법을 보고하면서, 이 배지의 예민도와 특이도를 각각 98%와 99.5%라고 하였으나 이 방법 또한 최종 판정하는 데는 24시간이 걸린다. Simpanya 등(1995)은 기질 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-galactosaminide (UAG)를 이용하여 30분 만에 형광 유무를 조사하여 효모양 진균들 중 *C. albicans*의 86.6%를 동정할 수 있음을 보고하였다.

Perry 등(1990)은 *C. albicans*가 두 가지 효소 β-galactosaminidase와 L-proline aminopeptidase를 가지고 있는 성질을 이용하여 90분

의 색상반응만으로 *C. albicans*를 신속하고 정확히 동정할 수 있는 ρ -nitrophenyl-N-acetyl- β -D-galactosaminide와 L-proline β -naphthylamide 시험의 예민도와 특이도를 모두 99% 이상으로 보고하여 저자들의 예민도 100%, 특이도 99.5%와 유사한 결과를 보였다. Perry 등(1990)의 실험에서는 *C. albicans* 422주 중 NGL, PRO 양성이 419주(99.3%)였으며, *C. parapsilosis* 및 *C. tropicalis* 각각 1주가 위양성으로 나온 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 국내에서 Perry 등(1990)의 방법으로 상품화된 cinnamaldehyde 시약을 사용하여 재연하여 시간별 반응시간을 비교한 결과 15분에서는 반응이 나타나지 않았지만 30분 이상의 시간에서 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 30분 반응으로도 *C. albicans*는 198주 모두가 NGL 및 PRO 시험 양성(100%)이었으며, 위양성은 *Trichosporon beigelli* 1주(0.49%)였다. 검사의 예민도 및 특이도 수준도 99.5% 이상이므로 기존의 GT시험은 2~4시간에 *C. albicans*를 예비동정하였으나 본 연구방법으로는 30분만에 *C. albicans*를 비색법으로 신속, 정확히 예비동정할 수 있어 의의가 크다고 할 수 있다. 또한 1995년 재발성 구강염을 가진 HIV (Human Immunodeficiency Virus) 감염환자의 구강에서 처음으로 분리보고된 *Candida dubliniensis*는 이후 꾸준히 임상검체 분리율이 증가하고 있고 국내에서는 2012년 처음으로 *Candida dubliniensis*에 의한 *Candida*증이 보고되었으나 국내 분리나 빈도에 관한 보고는 명확하지 않으며(Yu 등, 2012) 유의수준도 극히 낮다. 그러나 국내 분포가 증가하고 있는 *Candida dubliniensis*의 혼동을 배제하기 위해 신선한 사람의 혼주혈청(human pooled serum, HPS)을 사용하여 발아관 형성을 통해 *C. albicans*을 확인하였다. 또한 42°C 또는 45°C, 6.5% NaCl, xylose 또는 lactate에서 자라지 않은 점으로 구분하는 것으로 알려져 있으나 계대배양이나 보관 등에 의해 표현형이 불안정하므로 구분에 잘 이용되지 못하고 있다(Kim 등, 2009). 그러므로 아직까지 일반 병원 미생물 검사실에서 발아관 형성 및 비색법에 근거하여 동정된 *C. albicans*로부터 *C. dubliniensis*를 간편하며 신속한 경제적인 일상검사로 감별하기에는 어려운 실정이다. 앞으로 더 나아가 더 많은 균주를 확보하여 *Candida* 균종으로부터 *C. dubliniensis* 분리를 시도하여 확인하고 검사 방법을 모색할 필요가 있을 것으로 생각된다.

결론적으로 NGL 및 PRO 시험은 기존의 *C. albicans* 신속 예비동정법 보다 소요되는 시간이 짧고 조작법이 간단할 뿐만 아니라 현미경적 수준의 관찰 결과를 색상반응만으로 결과를 알 수 있으며 예민도와 특이도가 우수하므로 임상 검사실에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- Berardinelli S, Opheim DJ. New germ tube induction medium for the identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1985, 22:861-862.
- Campbell CK, Holmes AD, Davey KG, Szekely A, Warnock DW. Comparison of a new chromogenic agar with the germ tube method for presumptive identification of *Candida albicans*. *Euro J Clin Microbiol & Infect Dis* 1998, 17:367-368.
- Cateau E, Cognee AS, Tran TC, Vallade E, Garcia M, Belazs Kauffmann-Lacroix, et al. Impact of yeast bacteria coinfection on the detection of *Candida* sp. in an automated blood culture system. *Dign Microbiol Infect Dis* 2012, 72:328-331.
- Fell JW, Meyer SA. Systematics of yeasts species in the *Candida parapsilosis* group. *Mycopathol Mycol Appl* 1967, 32:177-193.
- Fenn JP, Segal H, Barland B, Denton D, Whisenant J, Chun H. Comparison of updated Vitek Yeast biochemical card and API20C yeast identification system. *J Clin Microbiol* 1994, 32:1184-1187.
- Fung DYC, Liang C. A new fluorescent agar for the isolation of *Candida albicans*. *Bull Infect Lab Serv Vet (France)*. 1998, 29/30: 1-2.
- Goldschmidt MC, Fung DYC, Grant R, White J, Brown T. New aniline blue dye medium for rapid identification and isolation of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1991, 29:1095-1099.
- Hunter PR, Cherry A, Fraser M, Mackenzie DWR. Morphotype markers of virulence in human candidal infections. *J Med Microbiol* 1989, 28:85-91.
- Katsura Y, Uesaka I. Assessment of germ tube dispersion activity of serum from experimental candidiasis: a new procedure for serodiagnosis. *Infect Immun* 1974, 9:788-793.
- Kauffman CA, Jones PG. Candidiasis. *Postgrad Med J* 1986, 25:129-134.
- Kim TH, Yun SW, Lee MK, Ro BI. Screening of *Candida dubliniensis* from respiratory samples in Korea. *Korean J Med Mycol* 2009, 14:171-175.
- Martin M. Germ tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. *J Med Microbiol* 1979, 12:187-193.
- Odds FC. Resistance of yeasts to azole derivative antifungals. *J Antimicrob Chemother* 1993, 31:463-471.
- Odds FC, Bernaerts R. CHROM agar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol* 1994, 32:1923-1929.
- 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.
- Perry JC, Miller GR, Carr DL. Rapid colorimetric identification of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 1990, 28:614-615.
- Rousselle P, Freydiere AM, Couillerot PJ, Montclos H, Gille Y. Rapid Identification of *Candida albicans* ID and Fluoroplate Agar Plates. *J Clin Microbiol* 1994, 32:3034-3036.
- Russell EL, Michael EK. The changing face of nosocomial candidemia: Epidemiology, resistance, and drug therapy. *Am J Health Syst Pharm* 1999, 56:525-531.
- Salkin IF, Land GA, Hurd NJ, Goldson RP, McGinnis MR. Evaluation of YeastIdent and Uni-Yeast-Tek yeast identification systems. *J Clin Microbiol* 1987, 25:624-627.
- Simpanya MF. Identification of *Candida albicans* and *C. tropicalis* with an umbelliferyl-labelled galactosaminide. *J Med Microbiol*

- 1995, 43:230-233.
- Terrence C, Ihrke DM. Further studies of the germ-tube test for *Candida albicans* identification. *Am J Clin Path* 1971, 55:733-734.
- Warren NG, Hazen KC. *Candida*, *Cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, et al. Manual of clinical microbiology. 7th ed, 1999, p723-737. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Yu N, Kim HR, Lee MK. The First Korean Case of Candidemia due to *Candida dubliniensis*. *Ann Lab Med* 2012, 32:225-228.