



ORIGINAL ARTICLE

Molecular Analysis of Pathogenic Molds Isolated from Clinical Specimen

Jang Ho Lee¹, Kye Chul Kwon², Sun Hoe Koo²¹Department of Clinical Laboratory Science, Semyung University, Jecheon, Korea²Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon, Korea

임상검체에서 분리된 병원성 사상균의 분자생물학적 분석

이장호¹, 권계철², 구선희²¹세명대학교 임상병리학과, ²충남대학교 의과대학 진단검사의학과

ARTICLE INFO

Received September 2, 2020

Revised September 6, 2020

Accepted September 6, 2020

Key words

Mold

Molecular identification

Morphological identification

Sequencing

ABSTRACT

Sixty-five molds isolated from clinical specimens were included in this study. All the isolates were molds that could be identified morphologically, strains that are difficult to identify because of morphological similarities, and strains that require species-level identification. PCR and direct sequencing were performed to target the internal transcribed spacer (ITS) region, the D1/D2 region, and the β -tubulin gene. Comparative sequence analysis using the GenBank database was performed using the basic local alignment search tool (BLAST) algorithm. The fungi identified morphologically to the genus level were 67%. Sequencing analysis was performed on 62 genera and species level of the 65 strains. Discrepancies were 14 (21.5%) of the 65 strains between the results of phenotypic and molecular identification. *B. dermatitidis*, *T. marneffeii*, and *G. argillacea* were identified for the first time in Korea using the DNA sequencing method. Morphological identification is a very useful method in terms of the reporting time and costs in cases of frequently isolated and rapid growth, such as *Aspergillus*. When molecular methods are employed, the cost and clinical significance should be considered. On the other hand, the molecular identification of molds can provide fast and accurate results.

Copyright © 2020 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서 론

사상형 진균에 의한 침습적 감염은 여전히 *Aspergillus*가 대부분을 차지하고 있지만, 장기이식이나 악성 종양환자의 항암 치료에 의한 면역저하 환자의 증가와 더불어 *Zygomycetes*, *Fusarium* 그리고 *Scedosporium* spp와 같은 다양한 사상형 진균에 의한 감염도 증가하고 있다[1, 2].

대부분의 사상균은 배양에서 자란 집락의 형태와 현미경적

특성으로 동정할 수 있는 표현형 기준으로 동정을 하지만, 집락의 특징적인 형태를 관찰하기 위해서는 균종에 따라 수일 또는 수 주일이 소요되고, 동정을 위해서는 매우 숙련된 전문가를 필요로 할 뿐만 아니라, 판독자의 주관적인 소견에 의존하기 때문에 잘못 동정하거나 동정을 하지 못하는 문제점이 있다[1].

최근에 진균의 형태학적인 동정의 문제점들을 극복하기 위하여 분자생물학적 검사 방법들이 활발하게 이용되고 있다[3]. 진균의 분자생물학적 동정 방법 가운데 염기서열분석법(sequencing)은 진균 검사의 전통적인 형태학적 검사의 문제점을 극복할 수 있는 검사 방법으로 간주되고 있다[4-6].

본 연구는 임상 검체에서 분리되는 진균의 형태학적 동정 결과를 기준으로, 염기서열 분석결과와 비교하여 보고하고자 한다.

Corresponding author: Sun Hoe Koo

Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Chungnam National University Hospital, 282 Munhwa-ro, Jung-gu, Daejeon 35015, Korea

E-mail: shkoo@cnu.ac.kr

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3715-7151>

재료 및 방법

1. 연구대상

2008년 1월 1일부터 2012년 12월까지 5년 동안 서울에 위치한 종합병원에서 임상검체로부터 분리된 효모균과 피부사상균을 제외한 사상형 진균을 대상으로 형태학적 분석 대상 균주 가운데 동정이 불가능한 진균, 형태학적으로 유사하여 동정이 까다로운 균주, 그리고 종(species) 수준까지 동정이 요구되는 65주를 대상으로 분자생물학적 염기서열 분석을 하였다(Table 1).

2. 연구방법

1) 배양과 형태학적 동정

진균배양은 검체가 검사실로 의뢰되면 Sabouraud dextrose agar (SDA, Hanil Komed Co., Korea)에 접종하여 30°C에서 3일간 배양하고 검체에 따라 무균검체는 실온(23~26°C)에서 3주간, 오염된 비뇨생식기, 호흡기, 그리고 소화기 검체는 실온에서 10일간, 피부과에서 의뢰되는 검체는 MYCO-B agar plate (SDA with chloramphenicol and cycloheximide, Hanil Komed Co., Korea)와 SDA에 접종하여 실온에서 3주 동안 배양하였다.

사상균의 형태학적인 동정은 증식 속도와 색깔, 질감, 그리고 형태 등을 관찰하고, 충분히 성숙된 것으로 확인되면 셀로판테이프를 이용하여 도말 슬라이드를 만들어 lactopheol cotton blue (LPCB)로 염색하여 광학현미경으로 균사(hyphae)와 분생포자(conidia)의 모양과 배열의 특성을 종합하여 참고 서적을 참고하여 동정하였다. 현미경적 소견에서 두형태 곰팡이(dimorphic fungus)가 의심이 되는 경우, 추가로 brain heart infusion (BHI) 배지에 접종하여 배양하였다.

2) 분자생물학적 동정

분자유전학적 검사는 서울 소재 S병원과 대전 소재 의진균자원은행 연구소(K연구소)에서 시행하였다. S병원에서 시행한 검사는 형태학적으로 동정이 불가능하거나 형태학적으로 유사하여 동정이 까다로운 균주를 대상으로 시행하였고, K연구소에서는 S병원에서 제공한 균주를 대상으로 형태학적으로 확인된 균주를 종(species) 수준까지 동정을 염기서열분석 방법으로 시행하였다.

S병원에서의 염기서열 분석을 위한 진균의 DNA 분리는 MagNA pure LC Total nucleic acid isolation kit로 전 처리한 검체를 magnetic-bead technology 원리를 이용한 MagNA pure LC 1.0 (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan)장

비를 이용하여 buffer에 반응시켜 용해시킨 후, magnetic glass particles 표면에 DNA를 부착시키고 세척 과정을 거쳐 순수 DNA를 분리하였다.

PCR은 thermal cycler (Model 9700; Applied Biosystem, California, USA)를 이용하였고, 증폭된 산물의 염기서열 분석은 BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystem)와 API Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems)을 이용하였다.

증폭의 표적부위는 진균의 염기서열 분석을 통한 동정에 가장 널리 이용되는 rRNA operon 내의 internal transcribed spacer (ITS) 부위와 28S rRNA 소단위 일부인 약 600 bp 크기의 D1/D2 부위, 그리고 단백질을 형성하는 기능적 유전자인 β -tubulin을 선택하였다[6]. 증폭된 염기서열은 상동성 분석을 위하여 GenBank 데이터베이스의 basic local alignment search tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 알고리즘을 이용하여 분석하였다.

종과 속의 동정에 관한 기준으로는 기존의 논문들에서 사용하였던 기준을 이용하였다[7, 8]. 한 종의 염기서열을 분석한 결과가 가장 높은 염기서열의 상동성이 98% 이상이고, 그 다음으로 일치하는 것과 0.8% 미만이면 해당 종으로 동정하고, 하나의 염기서열이 가장 높은 염기서열과 95~98%의 상동성을 보이거나 98% 이상에 해당하는 종이 둘 이상이면 상동성의 차이가 0.8% 미만일 때에는 같은 속으로 동정하였고, 상동성이 95% 미만이거나, 95% 이상이라도 여러 속들이 함께 나타나면 동정불가로 하였다.

K연구소에서의 DNA 분리는 I-genomic BYF DNA mini kit for fungi (iNtRON Inc., Seongnam, Korea)를 이용하였다. PCR은 thermal cycler (Model 9700; Applied Biosystem, USA)를 이용하였고, 증폭된 산물의 염기서열 분석은 BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystem)와 API Prism 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems)을 이용하였다.

Genomic DNA의 PCR과 염기서열 분석은 유전자 분석의 전문 기관(MacroGen Inc., Seoul, Korea)에 의뢰하였고, 염기서열 분석의 raw data를 받아 염기서열 상동성 분석을 위한 데이터베이스로는 GenBank의 BLAST 알고리즘을 이용하여 동정하였다.

Table 1. Results of morphological and molecular identification for 65 clinical isolates

No	Morphological ID	Molecular identification			Specimen	
		Sequencing ID	ITS	D1D2		β -tubulin
			Accession No. & Identity (%)	Accession No. & Identity (%)		Accession No. & Identity (%)
1	<i>Nocardia</i> spp.	<i>N. brasiliensis</i>	AY245543.1 (100)	DQ360269.1 (99)	ND	Pus
2	<i>Emmonsia</i> spp.	<i>A. dermatitidis</i>	U18364.1 (99.8)	EF592162.1 (100)	ND	BAL
3	<i>Penicillium</i> spp.	<i>T. marneffei</i>	FJ009566.1 (100)	AB362755.1 (100)	ND	urine
4	<i>S. schenckii</i>	<i>S. schenckii</i>	AB128006.1 (100)	AB363791.1 (99.4)	AM116967.1 (100)	Skin
5	<i>Acremonium</i> spp.	<i>S. schenckii</i>	AB122043.1 (100)	ND	ND	Skin
6	<i>C. brethollefae</i>	<i>C. brethollefae</i>	ND	FJ345351.1 (100)	ND	Endotracheal
7	<i>Lichtheimia</i> spp.	<i>L. corymbifera</i>	EU330179.1 (100)	FJ719444.1 (98)	ND	sputum
8	<i>Lichtheimia</i> spp.	<i>L. corymbifera</i>	HQ285610.1 (100)	ND	ND	Blood
9	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>L. ramosa</i>	JN315007.1 (99)	JN315038.1 (100)	ND	Sputum
10	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>L. corymbifera</i>	HQ285610.1 (100)	JN315035.1 (99)	ND	Urine
11	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>M. fragilis</i>	JF299225.1 (100)	ND	ND	Stool
12	<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>R. pusillus</i>	JN315022.1 (100)	ND	ND	Sputum
13	<i>Mucor</i> spp.	<i>R. pusillus</i>	AB369914.1 (100)	AF113475.1 (100)	ND	Transtracheal
14	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>R. microsporus</i>	JX120679.1 (100)	JQ313872.1 (100)	ND	Endotracheal
15	<i>Rhizopus</i> spp.	<i>R. microsporus</i>	AB381937.1 (99.9)	AB363776.1 (98.8)	ND	Endotracheal
16	<i>S. racemosum</i>	<i>S. racemosum</i>	HM999978.1 (99)	HM849721.1 (98)	ND	sputum
17	Unid. Zgomycetes	<i>R. microsporus</i> var. <i>chinensis</i>	AY243961.1 (100)	AB250181.1 (100)	ND	Nasal
18	<i>Alternaria</i> spp.	<i>A. alternata</i>	JX406501.1 (99)	JN938894 (100)	ND	Sputum
19	<i>Alternaria</i> spp.	<i>A. arborescens</i>	AB244779.1 (100)	AY154706.1 (100)	ND	Sputum
20	<i>Alternaria</i> spp.	<i>Alternaria</i> spp.	JX401973.1 (100)	ND	ND	Tissue
21	<i>Cladosporium</i> spp.	<i>C. sphaerospermum</i>	GU017501.1 (100)	AB100654.1 (100)	ND	Abscess
22	Unid black mold	<i>E. lecanii-corni</i>	JX681040.1 (100)	ND	ND	Skin
23	Unid block mold	<i>E. lecanii-corni</i>	JX681040.1 (100)	FJ358243.1 (99)	ND	Skin
24	<i>Exophiala</i> spp.	<i>E. pisciphila</i>	AF050273.1 (100)	AF050273.1 (100)	ND	pus
25	<i>Exophiala</i> spp.	<i>E. salmonis</i>	AY213652.1 (99.7)	ND	ND	pus
26	<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>E. spinifera</i>	FN428876.1 (93)	FN428876.1 (99)	ND	Skin
27	<i>D. constricta</i>	<i>O. humicola</i>	JX681053.1 (100)	AB600878.1 (100)	ND	Others
28	<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>P. europaea</i>	JQ766441.1 (99)	JQ766491.1 (100)	ND	Skin
29	Unid block mold	<i>P. europaea</i>	JQ766491.1 (93)	JQ766491.1 (99)	ND	Skin
30	Unid black mold	<i>P. olivacea</i>	AB190379.1 (100)	AB190412.1 (99)	ND	Skin
31	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>S. apiospermum</i>	ND	FJ345358.1 (100)	ND	Tissue
32	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>S. apiospermum</i>	GQ476985.1 (99.8)	B363764.1 (100)	ND	Eye
33	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>S. aurantiacum</i>	HQ231818.1 (100)	FJ345358.1 (99)	ND	Tissue
34	<i>Scedosporium</i> spp.	<i>P. boydii</i>	GU566237.1 (99)	AB158098.1 (100)	ND	Tissue
35	<i>Acremonium</i> spp.	<i>A. charticola</i>	AJ621774.1 (95)	ND	ND	Toenail
36	<i>Acremonium</i> spp.	<i>A. strictum</i>	GU595023.1 (100)	AB294802.1 (100)	ND	Skin
37	Unid mold	<i>A. strictum</i>	ND	AB501341.1 (100)	ND	sputum
38	<i>A. falvus</i>	<i>A. falvus</i>	JQ763433.1 (98)	ND	ND	Transtracheal
39	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. fumigatus</i>	JX231005.1 (100)	JX174044.1 (100)	ND	BAL
40	<i>Aspergillus</i> spp.	<i>A. lentulus</i>	JN943567.1 (100)	JX174044.1 (100)	ND	Endotracheal
41	<i>A. terreus</i>	<i>A. terreus</i>	EF567982.1 (99)	ND	ND	Ear
42	<i>Scopulariopsis</i> spp.	<i>A. versicolor</i>	AJ937750.1 (100)	AJ937751.1 (100)	ND	Tissue
43	Unid mold	<i>A. versicolor</i>	JX401544.1 (100)	HE820800.1 (100)	ND	Nail
44	Unid mold	<i>E. parvathecia</i>	GU594759.1 (100)	ND	AB243111.1 (99)	Skin
45	<i>Fusarium</i> spp.	<i>F. solani</i>	GQ365154.1 (100)	ND	ND	Eye
46	<i>Fusarium</i> spp.	<i>F. solani</i> complex	JX435219.1 (100)	ND	ND	Blood
47	<i>Fusarium</i> spp.	<i>F. dimerum</i>	EU926284.1 (100)	EU926284.1 (100)	EU926417.1 (100)	Urine
48	<i>Fusarium</i> spp.	<i>N. rigiduscula</i>	JX179200.1 (99)	HM042412.1 (99)	AB587066.1 (100)	Sputum
49	Unid mold	<i>G. pannorum</i>	EF540755.1 (100)	JQ768405.1 (100)	ND	Skin
50	Unid mold	<i>G. argillacea</i>	HQ246728.1 (100)	ND	GU968696.1 (99)	Lung tissue
51	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>G. argillacea</i>	GU165726.1 (99.3)	EU862338.1 (99.7)	ND	Sputum

Table 1. Continued

No	Morphological ID	Molecular identification				Specimen
		Sequencing ID	ITS	D1D2	β -tubulin	
			Accession No. & Identity (%)	Accession No. & Identity (%)	Accession No. & Identity (%)	
52	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>P. lilacinus</i>	JQ821350.1 (100)	HQ232163.1 (100)	ND	Fluid
53	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>P. lilacinus</i>	HM242264.1 (100)	AB363751.1 (100)	ND	Abscess
54	<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>P. lilacinus</i>	ND	JQ353487.1 (100)	ND	Tissue
55	<i>Penicillium</i> spp.	<i>P. agrillaceum</i>	FR670332.1 (98)	ND	JF910277.1 (92)	Transtracheal
56	<i>Penicillium</i> spp.	<i>P. expansum</i>	HM469423.1 (99)	ND	ND	BAL
57	<i>Penicillium</i> spp.	<i>P. citreonigrum</i>	EU729705.1 (99)	EU069419.1 (100)	EF198623.1 (97)	Fluid
58	<i>Penicillium</i> spp.	<i>P. glabrum</i>	JX421729.1 (99)	HE802528.1 (100)	ND	Sputum
59	<i>Penicillium</i> spp.	<i>P. glabrum</i>	EF592172.1 (100)	ND	ND	Sputum
60	<i>Geosmithia</i> spp.	<i>P. janthinellum</i>	HQ839780.1 (100)	ND	ND	BAL
61	<i>Penicillium</i> spp.	<i>P. ochrochloron</i>	HM469394.1 (99)	ND	GU981672.1 (99)	Sputum
62	<i>Penicillium</i> spp.	<i>P. purpurogenum</i>	DQ681328.1 (99.7)	ND	ND	Sputum
63	<i>Geosmithia</i> spp.	<i>P. raperi</i>	AF033433.1 (91)	AF033433.1 (100)	ND	BAL
64	Unid Black mold	<i>Microascus</i> spp.	AB566304.1 (99)	ND	ND	Others
65	<i>Scopulariopsis</i> spp.	<i>Microascus</i> spp.	AB566304.1 (99)	AB566305.1 (100)	ND	Foot skin

*Abbreviations: ID, identification; R/O, rule out; ND, not done; Unid, unidentified; BAL, Broncho Alveolar Lavage.

Table 2. Comparison of identification by morphological criteria with sequence analysis

Identification method	Number of isolates identified at taxonomic level				
	Species	Genus	Unidentified	Discrepancies	Total
Morphological ID	5 (7.7%)	35 (53.9%)	11 (16.9%)	14 (21.5%)	65 (100%)
Molecular ID	62 (95.4%)	3 (4.6%)	0	0	65 (100%)

*Abbreviation: ID, identification.

결 과

1. 형태학적 동정과 분자생물학적 동정 결과의 비교 분석

형태학적 동정과 분자생물학적 방법 가운데 염기서열분석으로 동정하여 비교한 결과는 Table 1과 2에 정리하였다.

1) 속과 종이 일치하는 결과

염기서열 분석과 형태학적인 동정한 결과가 일치하여 종과 속이 동일하게 동정된 것은 *Sporothrix schenckii*, *Cunninghamella brethollefae*, *Syncephalastrum racemosum*, *Aspergillus falvus*, 그리고 *Aspergillus terreus* 각각 1주씩으로 5주(7.7%)가 일치하였다.

2) 속 수준의 동정이 일치하는 결과

속 수준까지만 동정된 것은 *Acremonium* spp. 2주, *Alternaria* spp. 3주, *Aspergillus* spp. 2주, *Cladosporium* spp. 1주, *Exophiala* spp. 2주, *Fusarium* spp. 3주, *Lichtheimia*

spp. 2주, *Nocardia* spp. 1주, *Paecilomyces* spp. 3주, *Penicillium* spp. 8주, *Rhizomucor* spp. 1주, *Rhizopus* spp. 2주, *Scedosporium* spp. 4주, 그리고 *Scopulariopsis* spp. 1주를 포함하여 35주(53.9%)로 흔히 임상에서 많이 분리되는 균주들이었다.

3) 형태학적으로 동정이 불가능한 균종의 결과

형태학적으로 동정을 불가능 하였던 사례는 11주(16.9%)이었다. 분자생물학적 검사 결과, 흑색 진균이 4주로 *Exophiala lecanii-corni* 2주, *Phialophora olivacea* 1주, 그리고 *Phialophora europaea* 1주로 동정되었고, 유리질 사상균이 6주로 *Acremonium strictum* 1주, *Aspergillus versicolor* 1주, *Emericella parvathecica* 1주, *Geomyces pannorum* 1주, *Geosmithia argillacea* 1주, 그리고 *Microascus speicies* 1주가 동정되었으며, 털곰팡이 목인 *Rhizopus microsporus* var. *chinensis* 1주가 동정되었다.

4) 형태학적인 동정과 분자생물학적 동정의 불일치 결과

형태학적인 동정과 분자생물학적 동정 결과가 불일치 한 예는 14주(21.5%)주로, 균종별로는 mucorales 목이 4주, 두형태 진균이 2주, 흑색 진균이 3주, 그리고 유리질 진균이 5주이었다. mucorales 가운데 3주는 형태학적으로 *Rhizomucor* spp.로 동정하였던 예로 염기서열 분석에서 *Lichtheimia corymbifera*, *Lichtheimia ramosa*, 그리고 *Mucor fragilis*로 동정되었고, 1주의 *Mucor* spp.는 *Rhizomucor pusillus*로 동정되었다.

2주의 두형태 진균 가운데 1주는 *Sporothrix schenckii*로 형태학적으로는 *Acremonium* spp.로 동정하였던 예였고, *Ajellomyces dermatitidis* 1주는 *Emmonsia* spp.로 추정되었던 예이었다. *A. dermatitidis*는 *Blastomyces dermatitidis*의 유성생식 세대로 국내에서는 처음 분리된 사례였다[9].

흑색진균의 불일치 예로 2주의 *Fonsecaea* spp.는 염기서열 분석으로 *Phialophora europaea*와 *Exophiala spinifera*로 확인되었다. *Dactylaria constricta*는 SDA 배지에서 금속광택의 붉은 갈색 집락과, 현미경 관찰에서 가운데가 잘룩한 타원형의 갈색 분생포자가 관찰되어 형태학적으로 합당하였던 예로, 염기서열분석에서는 *Ochroconis humicola*로 확인되었다. *Ochroconis*는 *Dactylaria* spp.의 새롭게 제안된 이름으로, 속명은 일치하였으나 종 수준의 동정이 불일치하였던 예이었다.

*Geosmithia argillacea*는 형태학적으로 *Paecilomyces* spp.로 동정하였던 사례로 염기서열 분석으로 국내에서 처음 확인되었다. *G. argillacea*는 집락이 천천히 자라고 분생포자가 느리게 형성되며, 분생자병과 분생포자가 *Penicillium*과 유사한 형태적 특성을 가지고 있다.

*Nectria rigidiuscula*는 형태학적 동정에서는 *Fusarium* spp.와 유사하였다. *Fusarium* spp.는 현미경적으로 분생포자가 바나나 또는 카누 모양으로 쉽게 구분할 수 있는 진균이다. 염기서열 분석으로 확인된 *N. rigidiuscula*는 열대 과일나무의 잎마름병의 원인균으로 사람의 감염 사례 보고가 없는 진균이었다. *Aspergillus versicolor* 1주는 형태학적으로 *Scopulariopsis* spp.로 동정하였던 사례였다(Table 3).

고 찰

병원성 진균을 확인하기 위한 검사는 배양검사를 우선으로 한다[9]. 전통적으로 효모균을 제외한 사상형 진균의 배양검사는 성숙된 집락이 형성된 후에 이루어지기 때문에 결과가 보고되기까지 시간이 오래 소요되고, 종 수준의 동정이 제한적이거나 불가능할 뿐만 아니라, 정확한 검사결과를 담보할 수 없다.

사상형 진균의 형태학적 동정의 문제점들을 극복하기 위한 분자생물학적 검사방법들 가운데 염기서열분석이 여러 연구 보고서들에서 빠르고 정확한 방법으로 제안되고 있다[10-12]. 그러나 국내에서의 진균의 형태학적인 문제를 극복하기 위한 연구는 Jang 등과 Park 등의 진균의 분자생물학적 동정의 연구 보고 [12-14]에 불과한 실정이다.

Jang 등[12, 13]은 2008년 진균의 염기서열분석에 대한 CLSI 가이드라인 MM18-A가 2008년에 제시되자[6], 그 기준에 따라 염기서열분석 방법을 도입하여, 진균 동정 시 CLSI 가이드라인 MM18-A에서 제시하는 표적부위의 유용성에 대한 평가를 하였다. 이 연구에서는 오염과 감염을 고려하지 않고 무작위로 임상검체에서 분리된 40 균주를 대상으로 염기서열분석과 형태학적 동정 결과를 비교하여, 형태학적으로 종수준의 동정 가능한 균종은 37.5%, 염기서열분석으로는 75.0%의 속과 종수준의 동정이 가능하였다고 보고하고 있다[12, 13].

본 연구에서는 대상균주 65주의 염기서열 분석에서 증폭을 위한 표적부위로는 CLSI 가이드라인 MM18-A에서 1차적으로 제시하고 있는 ITS로 61주를 분석하였고, 추가동정을 위한 표

Table 3. Discrepant results between morphological and molecular method, and morphologically unidentified isolates results

Morphological identification	Molecular identification
<i>Acremonium</i> spp.	<i>S. schenckii</i>
<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>P. europaea</i>
<i>Paecilomyces</i> spp.	<i>G. argillacea</i>
<i>D. constricta</i>	<i>O. humicola</i>
R/O <i>Emmonsia</i> spp.	<i>A. dermatitidis</i>
R/O <i>Fonsecaea</i> spp.	<i>E. spinifera</i>
R/O <i>Fusarium</i> spp.	<i>N. rigidiuscula</i>
R/O <i>Geosmithia</i> spp.	<i>P. janthinellum</i>
R/O <i>Geosmithia</i> spp.	<i>P. raperi</i>
R/O <i>Mucor</i> spp.	<i>R. pusillus</i>
R/O <i>Rhizomucor</i> spp.	<i>M. fragilis</i>
<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>L. corymbifera</i>
<i>Rhizomucor</i> spp.	<i>L. ramosa</i>
<i>Scopulariopsis</i> spp.	<i>A. versicolor</i>
Unid black mold	<i>M. speicies</i>
Unid black mold	<i>E. lecanii-corni</i>
Unid black mold	<i>P. olivacea</i>
Unid block mold	<i>E. lecanii-corni</i>
Unid block mold	<i>P. europaea</i>
Unid mold	<i>A. strictum</i>
Unid mold	<i>A. versicolor</i>
Unid mold	<i>E. parvathecia</i>
Unid mold	<i>G. pannorum</i>
Unid mold	<i>G. argillacea</i>
Unidentified Zygomycetes	<i>R. microsporus var. chinensis</i>

Abbreviations: R/O, rule out; Unid, unidentified.

적으로 제시하고 있는 D1D2로 44주를 분석하였으며, β -tubulin 유전자는 8주에 사용한 결과 62주(95.4%)에서 종 수준까지의 동정이 가능하여 동정률이 향상된 결과를 보였으며, 국내에서 처음 확인된 임상적으로 유의성이 있는 균종은 *B. dermatitidis*와 *T. marneffeii*, 그리고 *G. argillacea* 등이었다[14].

*B. dermatitidis*는 미국의 특정지역의 토착 두형태 진균으로, 형태학적인 검사 결과 국내에서는 분리된 보고가 없어 *Emmonsia* spp.로 의심된다고 보고하였다. 정확한 균종을 감별하기 위하여 ITS와 D1/D2 rDNA에 대한 염기서열 분석을 하여 99%와 100%의 상동성을 보여 *B. dermatitidis*로 최종 확인하였고, 효모형을 확인하기 위하여 brain heart infusion (BHI) 배지에 35°C에서 배양하여 12일 만에 효모양 집락을 얻어, 분아하는 효모세포를 확인하였다[1, 15].

T. marneffeii (formerly *P. marneffeii*)는 동남아시아 일부 국가와 중국 남부에 분포하며 후천성면역결핍증후군 환자에서 세 번째로 흔한 기회 감염균이다[16]. 두형태 진균으로 주로 면역기능이 저하된 환자에서 치명적인 감염을 일으킨다. 염기서열 분석으로 최종 확인을 하였던 *T. marneffeii*는 혈액 배양검사에서 사상형 진균이 자랐고, SDA 배지 표면에서 포도주처럼 진한 적갈색을 보였고, 형태학적 관찰에서 *Penicillium* spp.로 동정되었다. 집락의 색과 형태를 기준으로 한 문헌고찰에서 *T. marneffeii*가 의심되어 염기서열분석을 시행한 결과 ITS와 D1D2에서 각각 100%의 일치도를 보여 최종 동정을 하였고, 국내에서는 처음으로 보고한 예이다[16, 17].

*G. argillacea*는 *Paecilomyces* spp. 4주 가운데 1주와 동정불가 1주에서 염기서열분석으로 규명된 사례이다. 이 균종은 형태학적 분석으로는 동정이 불가능하였고, 분자유전학적 검사의 유용성을 보여준 예이다.

Fungus ball 제거 수술을 받은 환자의 검체를 실온(25°C)에서 진균 배양을 시행하여 1주일 후부터 하얀 균사의 집락이 자라기 시작하였으며, 3주를 배양하였는데도 현미경 관찰에서 분생 포자를 발견하지 못해 형태학적 동정근거를 찾지 못해 '동정불가'로 보고하였고, 균 동정을 위하여 ITS rDNA와 β -tubulin에 대한 염기서열 분석을 시행하여 *G. argillacea*로 최종 확인된 균종이다.

흑색 진균은 균사의 세포벽에 멜라닌 색소가 있어 올리브, 갈색, 회색 또는 검은색 집락을 나타내는 진균들을 말하며[18], 형태학적 동정이 불가능하였거나, 결과의 불일치가 7주로 가장 많았다. 대부분 *Exophiala* spp.와 *Phialophora* spp.간 불일치이었으며, 형태가 매우 유사하다. *Phialophora* spp. 2주는 모

두 동정불가 흑색진균으로 보고하였던 균종으로 분자유전학적 동정 결과 *P. europaea*와 *P. olivacea*로 속과 종이 모두 밝혀졌다. 흑색 진균 가운데 *Exophiala* spp.와 *P. spp.* 그리고 *Fonsecaea* spp.는 형태학적 동정으로 종 수준의 동정이 불가능할 뿐만 아니라, 속 수준의 동정도 성장속도가 느리고 분생포자의 형성이 잘되지 않아 어렵다. 따라서 정확한 형태를 확인하기 위하여 슬라이드 배양을 시행하는 것을 제안하며, 신속한 동정을 위해서는 ITS와 D1D2 유전자를 이용한 염기서열분석이 유용할 것으로 사료된다.

Mucormycosis는 Mucorales order에 속하는 곰팡이들에 의해 발생하는 기회감염증을 말한다[19]. 최근에 Mucormycosis는 혈액종양 환자들의 침습성 감염에서 Aspergillosis 다음으로 많이 발생하는 것으로 보고되고 있다[20]. Mucorales는 대부분 배양에서 빠른 성장으로 회색의 솜털 모양의 균사체가 배지를 덮고 petri dish를 꽉 채우게 된다. 집락의 이런 특성 때문에 Mucorales목을 구분하는 데는 어렵지 않으나, 현미경 소견으로는 *Rhizopus* spp., *Cunninghamella* spp., 그리고 *Syncephalastrum* spp.의 속 동정은 어렵지 않으나, *Rhizopus* spp., *Rhizomucor* spp., 그리고 *Lichtheimia* spp.는 균사, 가근, 포자낭병, 그리고 축추의 형태가 비슷하여 속 수준의 동정이 매우 까다롭다[18-21].

본 연구에서도 형태학적 분석에서 12 균주 중 8주만이 일치하여 33.4%에 해당하는 4균주의 동정 불일치를 나타냈다. Kontoyiannis 등[19]은 20주의 Mucormycosis의 형태학적 동정과 분자생물학적 분석에서 20%의 불일치를 보였다고 보고하고 있다. *Rhizopus* spp., *Cunninghamella* spp., 그리고 *Syncephalastrum* spp.는 가근 또는 포자낭의 독특한 특징으로 DNA를 베이스로 한 염기서열분석 결과와 일치하는 결과를 보였으나, *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., 그리고 *Lichtheimia* spp.에서는 불일치를 보였다. 따라서 침습성 감염 등에서 분리된 Mucorales의 형태학적 동정의 문제들을 해결하기 위해서는 분자생물학적 방법들과 병행하는 것이 유용할 것으로 사료된다.

Aspergillus spp.는 진균배양검사에서 가장 많이 분리되는 균종 중의 하나이다. 본 연구에서 시행한 염기서열분석에서는 형태학적으로 종 수준의 동정이 불가능했던 *Aspergillus* spp. 8 균주와 미동정 2 균주, 그리고 *Scopulariopsis* spp.로 추정하였던 1주를 포함하여 11주이다. 염기서열분석 결과 10 주는 ITS에서 상동성이 98~100%를 나타냈고, 5주는 D1D2에서 99~100%의 상동성을 보였다. ITS 유전자에서 동정된 균주는 *A. fumigatus*가 5주로 가장 많았고, *A. falvus*, *A. terreus*, 그리고 *A. lentulus*가 각각 1주씩 종 수준까지 동정되었고, *A.*

*versicolor*는 2주 모두 ITS와 D1D2에서 100% 상동성을 나타냈다. 형태학적 검사에서 분생자가 생성되지 않아 동정이 불가능하였던 1주는 *E. parvathecia*로 ITS 100%, β -tubulin 99%의 일치도를 보였다. *E. parvathecia*는 *A. parvathecia*의 telemorph로 알려져 있다[14].

본 연구는 진균검사의 형태학적인 문제점들을 분석하고 해결하기 위하여 진균의 염기서열분석에 대한 CLSI 가이드라인 MM18-A가 2008년에 제시되어[6], 그 기준에 따라 염기서열 분석검사 방법을 도입하여, 전통적인 진균의 동정 방법인 형태학적 동정 결과와 사상균의 동정을 분자생물학적 방법인 염기서열 분석을 하여 비교하였다.

임상 검체에서 분리된 진균을 형태학적으로 동정하기는 매우 어려운 일이다. 첫째, 같은 속의 진균이라도 배지의 선택과 배양 온도에 따라 집락이 자라는 속도가 다르고, 집락의 색깔과 크기가 다르다. 둘째, 형태학적 동정의 근거가 되는 분생포자가 다양한 형태로 나타나고, 어떤 경우에는 수주가 지나도 분생포자가 형성되지 않아 동정의 근거를 찾을 수 없는 경우가 발생한다. 셋째, 형태학적 동정의 근거가 되는 균사와 분생포자를 찾았다 하더라도 형태학적 동정에 참고가 되는 서적들의 대부분은 한 종에서 대표적인 종 몇 개만 제시하고 있어 전형적인 형태가 아닌 비전형 형태의 분생포자들인 경우에는 진균검사에 오랜 경험을 가진 전문가라도 형태학적 동정의 오류를 피할 수가 없다.

전통적인 진균 동정법은 배양된 집락의 모양, 질감, 색깔과 분생자의 모양 등의 형태학적 특성에 의존하고 있다. 하지만 진균을 배양하고 특징적인 형태를 관찰하기 위해서는 적어도 수일 또는 수주가 소요되며, 동정을 위해서는 매우 숙련된 전문가가 필요하다. 또한 검사자의 주관적 소견에 의존하므로 잘못 동정하는 문제가 있어왔다. 최근의 보고들에 의하면 분자생물학적 방법이 빠르고 정확한 동정을 위한 유용한 도구로 확인되었다 [1, 18].

임상검사실에서 사상형 진균의 분자생물학적 동정을 시행하기 위해서는 시간과 정확성뿐만 아니라 비용적인 면에서 임상적 중요성 등을 함께 고려해야 한다[13]. Ciardo 등[8]은 무균적 부위에서 채취한 검체가 35°C에서 자라는 경우 등 5일 이내에 형태학적으로 종의 동정이 이루어지지 않으면서 임상적으로 중요한 사상형 진균에 한해서 분자생물학적 방법으로 동정을 시행한다고 하였다.

*A. fumigatus*와 같이 흔히 분리되고 성장이 빠르며, 집락의 형태와 현미경적 소견이 뚜렷한 경우 형태학적인 동정 방법이 보고시간과 비용 면에서는 아주 유용한 방법이다. 그러나 같은 속이라도 *A. versicolor*와 같이 집락의 특성과 현미경 소견으로

종 수준의 동정이 불가능한 경우 검체의 부위와 임상적 의의를 고려하여 종수준의 동정을 위하여 분자생물학적 검사를 선택하여야 한다.

A. dermatitidis, *T. marneffeii*, 그리고 *G. argillacea*처럼 병원성이 강하고 국내의 보고 사례가 없는 경우, *Exophiala* spp.와 *Phialophora* spp. 그리고 *Fonsecaea* spp.와 같이 성장이 느리고 분생포자의 형성이 잘 안 되는 흑색 진균의 경우, *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., 그리고 *Lichtheimia* spp. 등과 같이 형태가 비슷한 Mucorales의 경우에는 항진균제 선택과 임상적 의의를 고려하여 형태학적인 검사 결과를 바탕으로 분자생물학적 방법을 고려하여야 한다.

임상 검체에서 분리되는 진균의 동정은 전통적인 형태학적 검사와 분자생물학적 검사를 병행하면 신속하고 정확한 결과를 제공할 수 있지만, 분자생물학적인 검사방법은 비용과 임상적 중요성 등을 고려하여야 하므로, 첫째, 무균적 검체에서 지속적으로 분리되고 동정의 근거가 되는 분생포자가 형성되지 않거나, 분생포자가 관찰되는데도 동정이 불가능한 경우, 둘째, 피부 사상균 외의 진균이 10일 이상 배양하였는데도 분생포자가 생성되지 않는 경우, 셋째, 항진균제의 선택 등을 고려하여 종 동정이 요구되는 경우, 그리고 네 번째로 집락의 특성과 현미경적 형태의 특성이 불일치하거나, 비전형의 분생포자가 관찰되는 경우를 고려하여 염기서열분석 방법 등 분자생물학적 검사를 시행한다면 사상형 진균의 동정에 유용할 것으로 사료된다.

요 약

임상 검체에서 분리된 65개의 사상형 진균을 대상으로 연구하였다. 이 균주들은 형태학적으로 동정이 불가능한 진균, 형태학적으로 유사하여 동정이 까다로운 균주, 종(species) 수준의 동정이 요구되는 균주들이다. PCR과 염기서열분석은 ITS, DiD2, 그리고 β -tubulin 유전자를 표적 부위로 하였고, 증폭된 염기서열은 상동성 분석을 위하여 GenBank 데이터베이스의 알고리즘을 이용하여 분석하였다. 형태학적으로 속 수준의 동정이 가능한 진균은 61.5%이었고, 65주의 염기서열분석으로 62 균주는 속과 종의 동정이 가능하였다. 형태학적 검사와 염기서열분석의 결과, 속과 종이 불일치한 경우 14주(21.5%)이었고, 형태학적으로 동정이 불가능하였던 사례는 11 균주이었다. *B. dermatitidis*, *T. marneffeii*, 그리고 *G. argillacea* 등은 염기서열분석으로 국내에서 처음으로 확인하였다. *Aspergillus*와 같이 흔히 분리되고 성장이 빠른 진균들의 경우에는 형태학적인 검사가 보고시간과 비용 면에서는 매우 유용한 방법이다.

분자유전학적인 검사 방법은 비용과 임상적 중요성 등을 고려하여야 하지만 분자유전학적 검사를 병행하여 신속하고 정확한 결과를 제공할 수 있다.

Acknowledgements: This manuscript is a condensed form of the first author's doctoral dissertation from Chungnam National University.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Lee JH¹, Professor; Kwon KC², Professor; Koo SH², Professor.

REFERENCES

1. Lee NY, Heo HJ, et al. Clinical cases in medical mycology. Seoul: Panmun education; 2015.
2. Shoham S. Emerging fungal infections in solid organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am.* 2013;27:305-316. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.02.004>
3. Summerbell RC, Lévesque CA, Seifert KA, Bovers M, Fell JW, Diaz MR, et al. Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2005;29:1897-903. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1721>
4. Peter CI, Ishwor T, Dhundy B. Review of methods for the identification of zygomycetes with an emphasis on advances in molecular diagnostics. *Lab Med.* 2011;42:260-266. <https://doi.org/10.1309/LMJ8ZQJPJ8BFVMZF>
5. Landlinger C, Preuner S, Willinger B, Landlinger CI, Preuner S, Willinger B, et al. Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex xMAP technology. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1063-1073. <https://doi.org/10.1128/JCM.01558-08>
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing: approved guideline, CLSI document MM18-A, Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
7. Arvanitis M, Anagnostou T, Fuchs BB, Caliendo AM, Mylonakis E. Molecular and nonmolecular diagnostic methods for invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27:490-526. <https://doi.org/10.1128/CMR.00091-13>
8. Ciardo DE, Lucke K, Imhof A, Bloemberg GV, Bottger EC. Systematic internal transcribed spacer sequence analysis for identification of clinical mold isolates in diagnostic mycology: a 5-year study. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2809-2813. <https://doi.org/10.1128/JCM.00289-10>
9. Lee JH, Yu SR, Koo BK, Moon C. Study on imported case dimorphic fungi isolated from clinical specimen in Korea. *Korean J Clin Lab Sci.* 2018;50:29-36. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2018.50.1.29>
10. Seo JY, Ma YE, Lee JH, Lee ST, Ki CS, Lee NY. A case of disseminated *Penicillium marneffei* infection in a liver transplant recipient. *Korean J Lab Med.* 2010;30:400-405. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2010.30.4.400>
11. Sohn JY, Jang MA, Lee JH, Park KS, Ki CS, Lee NY. Isolation and identification of *Geosmithia argillacea* from a fungal ball in the lung of a tuberculosis patient. *Ann Lab Med.* 2013;33:136-140. <https://doi.org/10.3343/alm.2013.33.2.136>
12. Jang JH, Lee JH, Ki CS, Lee NY. Identification of clinical mold isolates by sequence analysis of the internal transcribed spacer region, ribosomal large-subunit D1/D2, and β -Tubulin. *Ann Lab Med.* 2012;32:126-132. <https://doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.126>
13. Jang JH. Usefulness of molecular identification of molds in clinical isolates. Seoul: Sungkyungkwan University; 2011.
14. Lee JH, Koo BK. Study of *Aspergillus* spp. from clinical specimen isolate. *Korean J Clin Lab Sci.* 2016;48:15-21. <https://doi.org/10.15324/kjcls.2016.48.1.15>
15. Park KS, Ki CS, Lee NY. Laboratory experience in phenotypic and molecular identification of *Blastomyces dermatitidis* first isolated in Korea. *Korean J Clin Microbiol.* 2012;15:114-116. <http://doi.org/10.5145/KJCM.2012.15.3.114>
16. Jung JY, Jo GH, Kim HS, Park MY, Shin JH, Chin BS, et al. Disseminated penicilliosis in a Korean human immunodeficiency virus infected patient from Laos. *J Korean Med Sci.* 2012;27:697-700. <http://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.6.697>
17. Supparatpinyo K, Khamwan C, Baosoung V, Nelson KE, Sirisanthana T. Disseminated *Penicillium marneffei* infection in Southeast Asia. *Lancet.* 1994;344:110-113. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(94\)91287-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(94)91287-4)
18. Larone DH. Medically important fungi: A guide to identification, 5th ed. Washington DC: ASM press; 2011.
19. Chayakulkeeree M, Ghannoum MA, Perfect JR. Zygomycosis: the re-emerging fungal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2006;25:215-229. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0107-1>
20. Robin C, Alanio A, Cordonnier C. Mucormycosis: a new concern in the transplant ward?. *Curr Opin Hematol.* 2014;21:482-490. <https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000082>
21. Joichi Y, Chijimatsu I, Yarita K, Kamei K, Miki M, Onodera M, et al. Detection of *Mucor velutinosus* in a blood culture after autologous peripheral blood stem cell transplantation: a pediatric case report. *Med Mycol J.* 2014;55:43-48. <https://doi.org/10.3314/mmj.55.e43>