

臨床檢體에서 分離된 酵母樣細胞의 同定

國立醫療院 細菌科

朴 承 咸

—Abstract—

The Identificantion of Yeast-like Cells Isolated from Clinical Specimens

Seung Hahm Park, M. D.

National Medical Center, Seoul, Korea

Mycotic infection seems to be increasing in importance as the causal agents of disease in man, especially invaders in already debilitated persons. This paper presents the identification of 39 stock strains of yeast like cells which were isolated from patients at National Medical Center.

It reveals 21 strains of *C. albicans*, 5 strains of *T. glabrata*, 4 strains of *C. tropicalis*, one strain of *T. mogii* & 8 strains of unidentified.

酵母 또는 酵母樣細胞가 人體에서 分離되나 그 病原性 與否에 關하여서는 여러가지 論議가 많다.

抗菌劑, 糞忌劑, 抗癆劑 및 經口避妊劑等이 廣範하게 使用된 以後로 特히 酵母 또는 酵母樣細胞가 臨床檢體에서 純培養으로 分離되거나 또는 다른 細菌과 함께 分離되는 症例가 增加됨을 經驗하고 있다.

大體로 酵母 또는 酵母樣細胞는 咽喉塗擦物이나 膾分泌物에서 分離되는 頻度가 높다.

大體로 眞菌은 一般細菌과는 달리 그 形態學的 觀察이 重要視되나 酵母 또는 酵母樣細胞는 그 形態學的 觀察 以外에 醱酵試驗과 同化作用(Assimilation) 試驗等 이 이러한 眞菌을 同定하는데 必須 不可缺한 것이다. 그러나 이 醱酵試驗等의 成績이 一般細菌의 그것과는 달리 陽性 또는 陰性 結果가 明瞭치 못한 例를 드물지 않게 볼 수 있다.

實驗材料 및 實驗方法

1. 實驗材料

實驗에 使用한 酵母樣細胞는 國立醫療院 細菌科에서 臨床檢體로 부터 分離 保存된 39株를 對象으로 하였다.

그 分離된 檢體別로 보면 第1表와 같다.

Table 1. Origin of Specimen

Throat swab	11
Vaginal secretion	7
Stool	4
Sputum	3
Pus	3
Skin lesion	2
Cervical discharge	1
Gastric juice	1
Urethral swab	1
Urine	1
Ulcerative lesion	1
Anal swab	1
Others(unknown)	3
Total	39

即 咽喉塗擦物 11例, 膾分泌物 7例, 糞便 4例, 咯痰 및 膿 各各 3例, 皮膚塗擦物 2例, 子宮頸部分泌物, 胃液, 尿道分泌物, 尿, 壞瘍病巢斗 肛門部塗擦物等 各各

1例이었고 其他 未詳이 3例이었다.

酵母樣細胞가 分離된 患者의 年齡과 性別은 第2表와 같다.

即 10~19歲群이 12例로서 第一 많았고 0~9歲 9例, 20~29歲 8例, 30~39歲 5例, 50~59歲 3例, 40~49歲 및 60歲 以上群이 各各 1例로서 第一 적었다. 性別은 男 20例, 女 19例로서 그 差를 볼수 없었다.

2. 實驗方法

基本培地로서는 血液寒天, Sabouraud's 葡萄糖寒天, corn meal 및 Corn meal+1% Tween 80 等을 使用하여 上記 培地 各各 2장씩 接種하여 25°C, 37°C에 72時間 培養하였다. 또 Maltose broth에 菌株를 浮遊시켜 培養 72時間後 그 沈渣를 觀察하였다.

醱酵試驗에는 Durham's tube가 들어 있는 試驗管에 葡萄糖, galactose, 麥芽糖, 乳糖, 蔗糖 등의 含水炭素가 各各 1% 들어 있는 1% carbohydrate broth에 接種

Table 2. Age & Sex Distribution

Age	Sex		Total No. of Patient
	M	F	
0~9	5	4	9
10~19	8	4	12
20~29	2	6	8
30~39	2	3	5
40~49	1		1
50~59	1	2	3
Over 60	1		1
Total	20	19	39

하여 25°C 72時間 培養시켜 그 結果를 判讀하였다.

同化試驗에는 Gorodkova 培地에 24 時間 培養한 集落을 0.9% saline 2ml에 平열게 混濁할 程度로 浮遊시켜 이 浮遊液을 0.05ml씩 葡萄糖, Galactose, 麥芽糖, 乳糖, 蔗糖, KNO₃ 等 6種에 添加하여 25°C에 24時間 두면서 그 結果를 判讀하였다.

實驗成績

Sabouraud's 葡萄糖寒天 培地에서는 大體로 直徑이 0.25~3 mm에 이르는 酵母 냄새가 나며 濕潤된 平滑粘稠한 '크림' 色의 集落이 境界가 明確하게 자랐으며 血液寒天 培地에서는 灰白色 및 '크림' 色의 境界가 뚜렷한 集落들이 0.25~1.5 mm 크기의 直徑으로 生長된

을 볼수 있었다.

Corn meal 培地에서는 cut streak culture 불하여 厚膜胞子 生成 與否를 觀察하였다.

corn meal에서의 顯微鏡所見은 第3表와 같다.

即 大體로 酵母狀細胞의 形態가 橢圓形, 圓形 및 圓椎形인것 等 21株는 各各 厚膜胞子, 菌絲體, 假菌絲體, 分芽胞子等을 볼수 있어 *Candida albicans*로 同定되었다.

酵母狀細胞의 크기가 매우 작은 5株는 모두 厚膜胞子, 菌絲體, 假菌絲體, 分芽胞子를 볼수 없어 이를 *Torulopsis glabrata*로 同定되었는데 한가지 特徵인 結果로는 酵母의 크기가 顯微鏡上에서 만 아니라 Sabouraud's 葡萄糖寒天 培地에서도 다른 酵母樣細胞에 比較하여 그 集落의 크기가 매우 작은 것을 볼수 있었다.

또 圓形 및 橢圓形의 酵母 4株에서는 厚膜胞子는 全히 찾아 볼수 없었고 菌絲體, 假菌絲體는 볼수 있어 *Candida tropicalis*로 同定되었다.

나머지 9株 全部에서는 厚膜胞子를 볼수 없었으며 菌絲體와 分芽胞子는 그 形態가 不規則하였다.

Tween 80이 含有된 corn meal 培地에서는 Tween 80이 含有되지 않은 corn meal 培地에 比하여 厚膜胞子 生成이 時間的으로나 크기에 있어서 더욱 優秀하였다.

39株 全部에 子囊胞子(Ascospore) 染色을 하였는데 全例에서 子囊胞子를 發見치 못하였다.

Oxidase 反應은 1% tetramethyl para-phenylene diamine dihydrochloride 水溶液을 使用하여 試驗하였는데 全菌株에서 Oxidase 陽性反應을 보였다.

maltose broth에 浮遊된 菌의 沈渣所見은 第4表와 같다.

即 酵母狀細胞의 여러 形態, 厚膜胞子, 菌絲體 假菌絲體, 分芽胞子의 生長發育이 corn meal에서의 成績과 잘 一致되었으며 *Torulopsis glabrata*로 分類된 것은 亦是 매우 적은 酵母만을 보여 주었다.

醱酵試驗 및 同化試驗 成績은 第5表와 같다.

即 第1菌株부터 第21菌株까지를 觀察하여 보면 醱酵試驗에 있어서 全菌株가 葡萄糖을 分解하여 '개스'를 生産하였으며 또 第10菌株를 除外하고는 20株에서 galactose 및 麥芽糖을 分解하고 乳糖을 分解치 못하였으며 蔗糖은 14株가 分解되고 나머지 7株는 分解치 못하였다.

이 21株의 同化試驗에 있어서는 第9菌株의 麥芽糖反應을 除外하고는 全菌株에 있어서 葡萄糖, galactose, 麥芽糖 및 蔗糖反應이 陽性이고 乳糖 및 KNO₃ 反應이 陰性이었다.

第22菌株부터 第26菌株까지를 觀察하였을 때 醱酵試

Table 3.

Microscopic Examination on Corn Meal Agar

No. of Strain	Shape of yeast cell & budding	Chlamy-dospore	Mycellum	Pseudo-mycellum	Blastospore	Duration
1	oval	+	+	+	+	after 3 days
2	"	+	+	+	+	"
3	"	+	+	+	+	"
4	"	+	+	+	+	"
5	"	+	+	+	+	"
6	"	+	+	+	+	"
7	"	+	+	+	+	"
8	"	+	+	+	+	"
9	"	+	+	+	+	"
10	"	+	+	+	+	"
11	"	+	+	+	+	"
12	round & spindle	+	+	+	+	"
13	"	+	+	+	+	"
14	"	+	+	+	+	"
15	"	+	+	+	+	"
16	"	+	+	+	+	"
17	"	+	+	+	+	"
18	"	+	+	+	+	"
19	"	+	+	+	+	"
20	"	+	+	+	+	"
21	"	+	+	+	+	"
22	small round &	-	-	-	-	"
23	small oval	-	-	-	-	"
24	small round	-	-	-	-	"
25	small round	-	-	-	-	"
26	small spindle	-	-	-	-	"
27	round & oval	-	+	+	+	"
28	oval	-	+	+	+	"
29	round	-	+	+	+	"
30	spindle	-	+	+	+	"
31	oval	-	+	+	+	"
32	round & oval	-	+	+	+	"
33	round	-	-	-	-	"
34	oval	-	+	+	+	"
35	spindle	-	+	+	+	"
36	round	-	+	-	+	"
37	spindle	-	+	-	+	"
38	spindle	-	+	-	-	"
39	oval	-	+	+	+	"

驗과 同化試驗에서 葡萄糖反應만이 陽性이고 나머지는 모두 陰性이었다.

第27菌株부터 第30菌株까지를 觀察하여 보면 醱酵試驗에서 乳糖만 陰性反應이고 나머지는 陽性反應이었으며 同化試驗에서는 乳糖 및 KNO_3 反應은 모두 陰性이고 나머지 反應은 모두 陽性이었다.

第31菌株부터 第39菌株까지를 觀察하여 보면 그 試驗成績이 各各 不規則한 것을 볼수 있다.

以上 培養成績과 混合感染된 例를 綜合整理하여 보면 第6表와 같다.

即 *C. albicans* 21株中에서 純培養된 것이 20例이고 1例는 *Shigella flexneri* 와 混合感染된 것이었다.

Table 4. Microscopic Examination of Sediment of Maltose Broth after 3 days

No. of Strain	Shape of cell	Budding	Division of cell	Pseudo-mycellium	Mycellium	Arthrospore	Chlamydo-spore	Blasto-spore	Arrangement of yeast cell
1	oval	multi	-	+	+	-	+	+	S. C.
2	oval	//	--	+	+	-	+	+	S. C.
3	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C. P.
4	round	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
5	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. P.
6	round	//	-	+	+	-	+	+	S. C. P.
7	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C. P.
8	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
9	round	//	-	+	+	-	+	-	S. C.
10	oval	//	-	+	+	-	+	-	S. C.
11	oval	//	-	+	+	-	+	-	S. C.
12	spindle	//	-	+	+	-	+	+	S. C. P.
13	round	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
14	round	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
15	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
16	spindle	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
17	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
18	round	//	-	+	+	-	+	+	S. C.
19	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C. P.
20	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C. P.
21	oval	//	-	+	+	-	+	+	S. C. P.
22	small r.	//	-	-	-	-	-	-	S. C.
23	oval (S)	//	-	-	-	-	-	-	S. C.
24	round (S)	//	-	-	-	-	-	-	S. C.
25	round (S)	//	-	-	-	-	-	-	S. C. P.
26	spindle (S)	//	-	-	-	-	-	-	S. C.
27	oval	//	-	+	+	-	-	-	S. C.
28	oval	//	-	+	+	-	-	-	S. C.
29	round	//	-	+	+	-	-	-	S. C.
30	spindle	//	-	+	+	-	-	-	S. C. P.
31	round	//	-	+	+	-	-	-	S. C.
32	oval	//	-	+	+	-	-	-	S. C.
33	spindle	//	-	-	-	-	-	-	S. C.
34	spindle	//	-	+	+	-	-	-	S. C.
35	spindle	//	-	+	+	-	-	-	S. C. P.
36	round	//	-	-	+	-	-	-	S. C.
37	round	//	-	-	+	-	-	-	S. C. P.
38	oval	//	-	-	-	-	-	-	S. C. P.
39	oval	//	-	+	-	-	-	-	S. C. P.

S; Single C; Cluster P; Pairs (S); Small r; round

C. tropicalis 4株中에서 3例가 純培養되고 1例는 腸球菌과 混合感染이었다.

T. glabrata 5株中에서 2例가 純培養되고 1例는 葡萄球菌, 1例는 未同定 Gram 陰性 雙球菌, 1例는 Gram 陽性 桿菌과의 混合感染이었다.

또 T. mogii 1株가 純培養되었다.

未同定 8株中에서 純培養된 것이 5例이고 2例는 葡萄球菌, 1例는 腸지프스菌 및 大腸菌, 1例는 大腸菌과의 混合感染이었다.

Table 5.

Fermentation & Assimilation Test

No. of Strain	Fermentation test					Assimilation test					
	Dex.	Gal.	Mal.	Lac.	Sac.	Dex.	Gal.	Mal.	Lac.	Sac.	KNO ₃
1	+G	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
2	+G	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
3	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
4	+G	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
5	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
6	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
7	+G	+	+G	-	-	+	+	+	-	+	-
8	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
9	+G	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
10	+G	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
11	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
12	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
13	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
14	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
15	+G	+	+G	-	-	+	+	+	-	+	-
16	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
17	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
18	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
19	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
20	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
21	+G	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-
22	+G	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
23	+G	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24	+G	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
25	+G	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
26	+G	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
27	+G	+	+	-	+G	+	+	+	-	+	-
28	+G	+	+	-	+G	+	+	+	-	+	-
29	+G	+	+	-	+G	+	+	+	-	+	-
30	+G	+	+	-	+G	+	+	+	-	+	-
31	+G	+	+G	-	+G	+	+	+	-	+	+
32	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
33	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-
34	+G	-	+G	-	-	+	+	+	-	-	-
35	+G	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
36	+G	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-
37	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
38	+G	+	+G	-	-	+	+	+	-	-	-
39	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

G; with gas

考 按

酵母 또는 酵母樣細胞를 同定하는데 여러가지 方法이 施行되고 있다.

그중에서 candida 와 cryptococcus 를 鑑別하는 데는

urea 試驗을 하게 되는데 이 反應은 cryptococcus 에서는 陽性이고 candida 에서는 陰性임으로 그 鑑別은 比較的 容易하다.

Candida albicans 를 다른 candida species 와 鑑別하는데 그 方法의 簡易성과 時間의 短縮性으로 因하여

Table 6. Summary of Identification & Mixed Infection

C. albicans	21	Pure	20		
		Mixed	1	Shig. flexneri	1
C. tropicalis	4	Pure	3		
		Mixed	1	Enterococci	1
T. glabrata	5	Pure	2		
		Mixed	3	Staph. aureus	1
				uniden. G-diplo	1
				G+ bacilli sp.	1
T. mogii	1	Pure	1		
Unidentified	8	Pure	4		
		Mixed	4	Staph. aureus	2
				E. coli & S. typhi	1
				E. coli	1
Total	39	Pure	30		
		Mixed	9		

germ tube 方法¹⁾이 病院檢査室에서 敏速한 診斷을 내리는데 愛用되기도 한다. 이것은 C. albicans가 蛋白質이 들어 있는 液體 例컨데 사람이나 動物의 血清, 血漿 脊髓液, 粗卵白 등의 存在下에서 2~3時間 37°C에 두면 germ tube를 生成하는 特徵이 있다는 事實에 起因하며 그 信賴度는 比較의 높으나 例外的인 것도 있으므로 이 方法만 가지고 C. albicans를 同定하는 것은 適合치 않다.

또 C. albicans와 다른 candida를 鑑別하는데 corn meal 寒天 培地를 使用하여 厚膜胞子 生成與否를 確認하는데 原則적으로 C. albicans만이 厚膜胞子를 生成하나 때로는 C. stellatoidea 中에서 厚膜胞子를 生成하는 菌株를 보는 수도 있다.

이 厚膜胞子 生成培地에 關하여서는 Tween 80이 含有된 corn meal 培地가 Tween 80이 含有되지 않은 것 보다는 더 優秀하였다. 또 corn meal 寒天培地 보다는 1% Taurocholate 寒天 培地가 時間적으로나 그 厚膜胞子の 크기面에 있어서나 더 優秀하다.

厚膜胞子 生成에 關해서 C. tropicalis에서 매우 드물게 生成한다²⁾고도 하며 C. claussenii에 關하여서는 成書³⁾에는 生成치 않는다고 하였으나 Brown-Thomsen⁴⁾은 이 C. claussenii에서 厚膜胞子が 生成된다고 하였다.

最近에 이르러 여러가지 새로운培地가 考案되어^{5) 6)}

C. albicans와 다른 candida species와의 鑑別에 利用되고 있다.

Tetrazolium (TTC) 培地上에서 C. albicans는 光澤이 있는 '크림'色을 물하고 C. stellatoidea는 紅橙色, C. tropicalis는 진한 새우茶赤色, C. pseudotropicalis는 연어紅色, C. krusei는 乾燥한 白色乃至 연한紅色, C. parapsilosis는 장미紅色, C. guilliermondii는 紅色을 물한 集落을 形成한다고 한다⁷⁾.

膿分泌物에서는 病原體로서 Candida와 Trichomonas 등이 分離培養됨으로 이 두 病原體를 同時에 培養할 수 있는 培地가 考案되었다⁸⁾.

醱酵試驗과 同化試驗에 있어서 乳糖과 KNO₃反應이 陰性이고 葡萄糖, galactose와 麥芽糖反應이 陽性이고 厚膜胞子를 形成하는 第1菌株부터 第21菌株까지를 C. albicans로 固定할 수 있었다.

Rimington⁹⁾은 C. albicans 61株를 數年間 保存한 後 厚膜胞子の 生成을 檢査하였는데 그중 7株에서 厚膜胞子를 生成치 무하였다고 報告하였다.

葡萄糖만이 陽性反應이고 '가스' 發生한 第22菌株~ 第26菌株를 Torulopsis glabrata로 分類하고 乳糖, 窒酸이 陰性反應이 있으나 C. albicans와는 달리 醱酵試驗에서 蔗糖反應에 '가스'를 發生한 第27菌株부터 第30菌株까지를 C. tropicalis로 同定하였다.

第31菌株는 醱酵試驗과 同化試驗 成績이 C. tropicalis와 類似하나 窒酸反應이 陽性이고 surface growth가 없는 것이 差異點이다. 이 結果를 中心으로 檢討하여 보면 第31菌株는 C. fabianii, C. gelida, C. pelliculosa, C. utilis, C. vartiovaarai 등과 類似하나 本實驗範圍內에서는 確實히 同定하지는 못하였다. 第32菌株는 C. aquatica와 類似하고 第33菌株는 菌絲體를 볼 수 없고 Torulopsis mogii로 同定되었다.

C. parapsilosis는 乳糖反應이 醱酵 및 同化試驗에서 다 같이 陰性이며 檢鏡에서 假菌絲體사이에 巨大細胞가 있는 것이 特徵이다. 第35菌株와 第36菌株는 醱酵 및 同化試驗 成績이 C. parapsilosis와 類似하나 本實驗範圍內에서는 確定할 수 없었다. 以上 第32, 35, 36, 37, 39菌株에서는 檢鏡에서 巨大細胞를 볼 수 없었다.

第34菌株 및 第38菌株는 實驗結果 C. stellatoidea와 類似하나 集落의 形態가 星狀이 아니므로 確定할 수 없었다. 더욱이 第38菌株는 broth 培養에서 surface growth가 있어 C. stellatoidea로 同定할 수 없었다.

第37菌株는 C. bimundalis와 C. pelliculosa var. cylindrica와 類似하나 確定할 수 없었고 第39菌株는 同定할 수 없었다.

崔¹⁰⁾는 candida sp.가 '아미노' 酸中 cystin이 菌絲體

形成에 促進作用이 있다고 하였다.

酵母狀菌中에서 人體에 病原性을 갖인 것은 *C. albicans* 이며 이 以外에 *C. stellatoidea*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *Geotrichum*, *Rhodotorula* 및 *Torulopsis glabrata* 등이 論議되고 있으나 特히 *Rhodotorula*, *Torulopsis*에 對하여서는 大體로 그 病原性을 否定하는 사람¹¹⁾도 있다.

總 括

臨床檢體에서 分離된 39株의 酵母狀保存菌株를 醱酵試驗, 同化試驗等을 包含한 各種實驗을 行하여 同定하였든마 *C. albicans* 21株, *T. glabrata* 5株, *C. tropicalis* 4株, *T. mogii* 1株를 分類할 수 있었으며 未同定菌株가 8株였다.

(이 實驗을 하는데 도와주신 李錫波, 全世玉 두분에게 感謝 드린다.)

REFERENCES

- 1) Conant, N. : *Manual of clinical mycology*. 2nd Edi., W. B. Saunders Co, Philadelphia & London, 1954.
- 2) *Laboratory procedures in clinical mycology*. Dept. of the army technical manual TM 8-227-8, HQ, Dept. of the army, Washington. D.C., 1964.
- 3) Lodder, J. : *The yeasts ataxonomic study*. North-Holland publishing Co., Amsterdam. 1970.
- 4) Brown-Thomsen, J. : *Production of chlamydospores by Candida clausenii*. *Acta path. et microbiol. Scandinav.*, 70:311, 1967.
- 5) Denny, M. J. & Partridge, B. M. : *Tetrazolium medium as an aid in the routine diagnosis of Candida*. *J. Clin. Path.*, 21:383, 1968.
- 6) Minsley, N. M. : *The use of a new color differential medium for yeast-like organisms*. *Am. Rev. Res. Dis.* 96:326, 1967.
- 7) Allison, R. T. : *An evaluation of Pagano-Levin Medium in a quantitative study of Candida albicans: preliminary communication*. *J. med. Lab. Tech.*, 24:199, 1967.
- 8) Feinberg, J. G. & Whittington, M. J. : *A culture medium for Trichomonas vaginalis Donne and species of Candida*. *J. Clin. Path.*, 10:327, 1957.
- 9) Rimington, W. E. : *An investigation into factors affecting chlamydospore production by Candida albicans*. *J. med. Lab. Technol.*, 26:362, 1969.
- 10) 崔湖德外 *Candida sp.*의 偽菌糸形成에 關하여. *綜合醫學*, 12:517, 1967.
- 11) Smith, J. M. B. : *Mycoses of the alimnetary tract*. *Gut* 10:1035, 1969.