

Rapid Identification of *Candida albicans* by 'Spiking' on Blood and Chocolate Agar Plates

Mi-Kyung Lee, Bo-Rae G. Park

Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Colonial morphology of *Candida albicans* known as 'spiking' on a primary isolation blood agar plate (BAP) allows rapid and presumptive identification of *C. albicans*. We evaluated the 'spiking' appearance to identify *C. albicans*.

Methods: A total of 144 fully identified clinical isolates of yeasts and 10 type strains of yeasts were tested. All isolates obtained from the 5% CO₂ incubation on BAP and chocolate agar plate (CHOC) were macroscopically examined for the presence of an irregular margin (spiking). The germ tube test was performed by incubating test organisms in 0.5 mL of

pooled human sera.

Results: The sensitivity for BAP-spiking, CHOC-spiking and germ tube test were 93.7%, 91.1%, and 98.7%, respectively. The specificity for three methods was 100%.

Conclusion: Use of the spiking identification on BAP can be useful for the economic and rapid presumptive identification of *C. albicans* in routine laboratories. (Korean J Clin Microbiol 2007;10:150-153)

Key Words: *Candida albicans*, Identification, Spiking, Germ tube test

서 론

사람에서 칸디다증을 일으키는 주요 균종은 *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* 등이며, 이 중 가장 중요하고 흔한 병원균은 *C. albicans*로 전체 칸디다증의 50~70% 정도를 차지하고 있으며 침습적 칸디다증에서는 더 많은 원인균으로 작용하고 있다[1]. 또한 *Candida*는 균종별로 azole 계 약제와 amphotericin B와 같이 현재 사용 중인 항진균제에 대해 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)가 다른 것으로 알려져 있으며[2], 특히 *C. albicans*는 fluconazole을 포함한 대부분의 항진균제에 감수성을 보이고 있어 항진균요법을 위한 *C. albicans*의 신속한 추정동정이 필요하다.

*C. albicans*의 추정 동정을 위한 신속검사법에는 발아관 검사, 효소활성을 이용한 Albistrip (Lab M. Ltd., Bury, UK)[3]과 Murex *C. albicans* CA50 (Murex Diagnostics, Norcross, GA, USA)[4,5], 단클론항체를 이용한 Bichro-latex albicans (Fumouze Diagnostics, Asnieres, France)[6] 등이 있다. 발아관 검사는 *C. albicans*의 신속동정을 위한 표준검사로 국내 임상미생물 검사실에서도 가장 많이 사용되고 있지만, 2~4시간이 소요되고

관독자의 숙련도, 배지 조성, 균액 농도 등에 따라 위양성과 위음성의 가능성이 있다[5]. 또한 효소활성이나 단클론 항체를 이용한 상품화된 방법은 발아관 시험에 비하여 신속하고 유사한 결과를 보여주지만, 추가적인 비용이 필요한 단점이 있다[3-6].

*C. albicans*는 혈액 한천배지에서 집락의 가장자리가 불규칙하게 돌기된 'spiking' 모양을 나타내는데, 혈액 한천배지를 사용한 일차 분리배지에서의 집락 관독 시 이 현상을 확인하는 것으로 추가적인 검사 없이 *C. albicans*를 신속하게 동정할 수 있음이 일부에서 보고되고 있다[7,8]. 이에 본 연구에서는 통상 일차 분리배지로 사용되고 있는 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서 'spiking' 모양 확인만으로 *C. albicans*의 신속동정이 가능한지를 평가하고자, *Candida* 균주의 'spiking' 모양 확인 결과를 발아관 검사 결과 및 확정된 동정 결과와 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

2007년 6월부터 7월까지 중앙대학교 용산병원을 내원한 환자의 각종 임상검체에서 분리된 효모양 진균 73균주, 2005~2006년도에 분리되어 -70°C에 보관 중인 임상분리균주 71균주(*C. albicans* 24균주, *C. tropicalis* 5균주, *C. parapsilosis* 14균주, *C. glabrata* 10균주, *C. lusitaniae* 4균주, *C. guilliermondii* 7균주, *C. krusei* 5균주, *Saccharomyces cerevisiae* 2균주) 및 8 종류의 표준균주(*C. albicans* ATCC 18804, *C. albicans* ATCC

Received 21 August, 2007, Accepted 20 September, 2007

Correspondence: Mi-Kyung Lee, Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, 65-207, Hangangno 3-ga, Yongsan-gu, Seoul 140-755, Korea. (Tel) 82-2-748-9837, (Fax) 82-2-797-3471, (E-mail) cpworld@cau.ac.kr

14053, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. guilliermondii* ATCC 6260, *C. lusitaniae* ATCC 34449, *C. dubliniensis* ATCC MYA-646, *C. dubliniensis* KCTC-17427) 10균주를 대상으로 하였다.

2. 방법

일반 세균배양 검사가 의뢰되어 혈액 한천배지에 일차 접종된 검체를 35°C, 5% CO₂ 배양기에서 하룻밤 배양한 후 집락 판독 시 효모양 진균 10 집락당 'spiking' 모양을 확인하였고, 집락을 초콜릿 한천배지에 계대 배양하여 다음날 'spiking' 모양을 재 판독하였다. 발아관 시험은 혼주 인 혈청 (pooled human serum) 500 µL에 Sabouraud dextrose agar (SDA)에 계



Fig. 1. Colonial morphology of *Candida albicans* known as 'spiking' on a blood agar plate in 5% CO₂ after 24 h incubation.

Table 1. Comparison of results by 'spiking' on blood agar plate (BAP) and chocolate agar plate (CHOC) and germ tube test using human serum for 144 yeast isolates

Organisms	No. of tested	No. of positive		
		BAP-spiking	CHOC-spiking	Germ tube
<i>Candida albicans</i>	79	74	72	78
<i>C. tropicalis</i>	17	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i>	16	0	0	0
<i>C. glabrata</i>	12	0	0	0
<i>C. guilliermondii</i>	7	0	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	5	0	0	0
<i>C. krusei</i>	5	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	0	0	0
<i>Trichosporon asahii</i>	1	0	0	0

대 배양한 효모양 진균을 잘 풀은 후 37°C에 2시간 배양하여 현미경(×400)으로 100개 세포당 발아관 형성을 관찰하였다[9]. -70°C에 보관 중인 임상분리균주는 SDA에 계대 배양 한 후 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지를 사용하여 35°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 2차 배양하여 'spiking' 모양을 확인하였다. 8종류의 표준균주 10균주도 동일한 방법으로 검사하였다.

정확한 균종 동정을 위하여 모든 균주는 SDA에 계대 배양한 후 VITEK 2 ID-YST system (bioMerieux Inc. Hazelwood, MO, USA)을 사용하여 제조사의 지침에 따라 검사하였다. VITEK 2 ID-YST system에서의 동정 결과 신뢰수준이 낮은 식별도를 보여 동정 정확률이 90% 이하이거나 동정이 되지 않은 균주와 *C. albicans*로 동정된 균주 중 'spiking' 음성이거나 발아관 형성을 하지 않은 균주는 lyticase (10,000 units/mL, Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 전처리 한 후 High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)로 DNA를 추출하여 다중 PCR로 동정하였다[10].

결 과

8종류의 표준균주 10균주 중 2균주의 *C. albicans*에서만 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서 'spiking' 모양(Figure)과 발아관 형성을 나타내었고, 나머지 7종류의 표준균주는 모두 'spiking' 모양과 발아관 형성을 보이지 않았다(Fig. 1).

2007년 6월과 7월 사이에 분리된 효모양 진균 73균주는 *C. albicans* 55균주, *C. tropicalis* 12균주, *C. parapsilosis* 2균주, *C. glabrata* 2균주, *C. lusitaniae* 1균주, *Trichosporon asahii* 1균주로 최종 동정되어, 2005~6년도에 분리된 71균주를 합하여 총 144 균주(*C. albicans* 79균주, *C. tropicalis* 17균주, *C. parapsilosis* 16균주, *C. glabrata* 12균주, *C. guilliermondii* 7균주, *C. lusitaniae* 5균주, *C. krusei* 5균주, *Saccharomyces cerevisiae* 2균주, *Trichosporon asahii* 1균주)를 대상으로 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서 집락 판독에 의한 'spiking' 확인과 발아

Table 2. Results of 'spiking' on BAP and CHOC (spiking/10 colonies) and germ tube test (positive/100 cells) using human serum for 79 *C. albicans* isolates

% positive per colonies or cells	No. of positive		
	BAP-spiking	CHOC-spiking	Germ tube
100%	36	31	8
50~99%	21	24	16
10~49%	16	16	46
<10%	1	1	8
0%	5	7	1
Total	79	79	79

관 검사를 시행하였다.

C. albicans 79균주는 혈액 한천배지에서 74균주, 초콜릿 한천배지에서 72균주가 'spiking' 모양을 나타내었고, 발아관 형성은 78균주에서 관찰되었으며, *C. albicans* 이외 8종류의 임상 분리 65균주는 모두 'spiking' 모양과 발아관 형성을 보이지 않았다(Table 1). 그러므로 본 연구에서 *C. albicans* 추정 동정을 위하여 시행한 신속검사의 민감도는 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서의 'spiking' 판독이 각각 93.7%와 91.1%였고 발아관 시험은 98.7%였으며, 특이도는 모두 100%였다.

*C. albicans*에서 'spiking' 모양이 관찰된 균주의 대부분은 10 집락당 1개 이상에서 확인할 수 있어 판독이 용이하였으며, 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서 유사한 양상이었다. 발아관 형성 역시 대부분의 *C. albicans* 균주에서 100 세포 당 10개 이상에서 관찰되었다(Table 2).

고 찰

본 연구에서 *C. albicans*의 신속한 추정 동정을 위하여 시행한 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서의 'spiking' 판독은 발아관 시험보다는 낮은 민감도를 보였으며, *C. albicans* 균주 중 'spiking' 모양은 초콜릿 한천배지보다 혈액 한천배지에서 더 많이 나타났다. 그러나 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지 모두 *C. albicans* 이외의 균주에서는 'spiking' 모양이 전혀 관찰되지 않아, 발아관 시험과 동일하게 특이도는 모두 100%였다.

*C. albicans*와 표현형적 성상이 매우 유사하다고 알려진 *C. dubliniensis*의 20%에서 'spiking' 모양을 보였다고 보고되었으나[8], 본 연구에 사용된 2균주의 *C. dubliniensis* 표준균주에서는 'spiking' 모양이 전혀 관찰되지 않았다. 또한 혈액 한천배지에서 'spiking' 모양을 보인 *C. albicans*의 약 99%는 10 집락당 1개 이상에서 나타나고 있어 판독이 용이하였다.

*C. albicans*는 높은 빈도의 가역적인 표현형 전환(phenotypic switching)이 가능하며, 이는 온도, pH, 배지 조성 및 산소 농도에 의해 영향을 받을 수 있다고 알려져 있다[8,11,12]. 이러한 특성은 혈액 한천배지에 집중하여 CO₂ 존재하에 배양하였을 때 'spiking' 형태의 집락모양을 나타내게 되어, 이를 이용한 *C. albicans*의 추정 동정이 가능하였다.

발아관 시험의 민감도와 특이도는 각각 88~100%, 90~100%로 보고 되고 있으며[5,13,14], 사용하는 배지의 종류에 따라 최대 40%의 예민도 차이를 보이기도 하였고[14] 이는 보고자에 따라 달랐다[5,14]. 또한 *C. dubliniensis*는 발아관 형성을 하여 이 시험에 의한 추정 동정 시 *C. albicans*로 동정될 수 있다고 알려져 있으나[8,15], 인 혈청을 사용한 본 실험에서는 2균주의 *C. dubliniensis* 표준균주 모두 발아관을 형성하지 않았다. 임상 분리 *C. dubliniensis* 균주에 대한 발아관 시험을 시행하지 않았지만, 2균주 *C. dubliniensis* 표준균주에서 모두 발아관 형성을

보이지 않아 대부분 인 혈청을 사용하여 *C. albicans*의 추정 진단을 시행하고 있는 국내에서는 *C. dubliniensis*가 *C. albicans*로 동정되었을 확률은 낮을 것으로 생각되었다. 또한 발아관 형성을 보인 *C. albicans*의 90%는 100 세포당 10개 이상에서 관찰되어 대부분 판독이 용이하였다.

Barnes와 Vale[8]은 'spiking' 판독의 민감도가 100%로 발아관 시험의 민감도 88%보다 더 예민하였다고 보고하였지만, 본 연구에서는 발아관 시험보다는 민감도가 낮은 것으로 평가되었다. 그러나 'spiking' 판독 검사는 첫째, 본 연구에 사용된 *C. albicans* 이외의 7종류의 표준균주와 8종류의 임상분리균주는 모두 'spiking' 모양을 나타내지 않아 위양성의 위험이 없었고, 둘째, 추가적인 검사 없이 일차 분리배지에서의 집락 판독 시 확인이 가능하므로 매우 신속하게 *C. albicans*를 추정 동정할 수 있으며, 셋째, 발아관 시험에 소요되는 최소한의 비용도 절감할 수 있어 경제적이었다. 그러므로 집락 판독 시 일차 분리배지인 혈액 한천배지에서 'spiking' 모양을 보이면 *C. albicans*로 추정 동정하고, 'spiking' 모양을 보이지 않는 균주는 발아관 시험을 시행하여 추가로 *C. albicans*를 선별함으로써 더욱 신속하고 경제적인 *C. albicans*의 추정 동정이 가능할 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 논문은 2007학년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

- Dignani MC, Solomkin JS, Anaissie EJ. *Candida*. In: Anaissie EJ, McGinnis MR, et al. eds. Clinical Mycology. 1st ed, Philadelphia; Churchill Livingstone, 2003:195-239.
- Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BS, Stephens DS, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. Clin Infect Dis 1999;29:1164-70.
- Dealler SF. *Candida albicans* colony identification in 5 minutes in a general microbiology laboratory. J Clin Microbiol 1991;29:1081-2.
- Fenn JP, Segal H, Blevins L, Fawson S, Newcomb-Gayman P, Carroll KC. Comparison of the Murex *Candida albicans* CA50 test with germ tube production for identification of *C. albicans*. Diagn Microbiol Infect Dis 1996;24:31-5.
- Lee SH, Park SH, Park JS, Kim MN, Pai CH. Comparison of Murex *Candida albicans* CA50 with germ tube test for presumptive identification of *Candida albicans*. Korean J Clin Pathol 2000;20:76-80.
- Freydiere AM, Buchaille L, Guinet R, Gille Y. Evaluation of latex reagents for rapid identification of *Candida albicans* and *C. krusei* colonies. J Clin Microbiol 1997;35:877-80.
- Del Castillo L, Bikandi J, Nieto A, Quindós G, Sentandreu R, Pontón J. Comparison of morphotypic and genotypic methods for

- strain delineation in *Candida*. *Mycoses* 1997;40:445-50.
8. Barnes RA, Vale L. 'Spiking' as a rapid method for differentiation of *Candida albicans* from other yeast species. *J Hosp Infect* 2005;60:78-80.
 9. Winn WC, Koneman EW, et al. Koneman's color atlas textbook of diagnostic microbiology. 6th ed, Philadelphia; Lippincott Williams & Wilkins, 2006:1216-8.
 10. Lee MK, Kim HR, Lee YJ. Identification of *Candida* Species by multiplex polymerase chain reaction. *Korean J Clin Microbiol* 2006;9:119-24.
 11. Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:183-203.
 12. Vargas K, Messer SA, Pfaller M, Lockhart SR, Stapleton JT, Hellstein J, et al. Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode. *J Clin Microbiol* 2000;38:3595-607.
 13. Carrillo-Muñoz AJ, Quindós G, Cárdenes CD, Alónso-Vargas R, Brió S, Arévalo P, et al. Performance of Bactocard *Candida* compared with the germ tube test for the presumptive identification of *Candida albicans*. *Mycoses* 2003;46:467-70.
 14. Hilmioglu S, Ilkit M, Badak Z. Comparison of 12 liquid media for germ tube production of *Candida albicans* and *C. tropicalis*. *Mycoses* 2007;50:282-5.
 15. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon E, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2004;4:369-76.

=국문초록=

혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서 'Spiking' 판독에 의한 *Candida albicans*의 신속동정

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실

이미경, 박금보래

배경: *Candida albicans*는 혈액 한천배지에서 'spiking' 모양을 나타내는데, 혈액 한천배지를 사용한 일차 분리배지에서의 집락 판독 시 이 현상을 확인하는 것으로 *C. albicans*를 신속하게 동정할 수 있어, 본 연구에서는 'spiking' 모양 판독에 의한 *C. albicans*의 동정 결과를 평가하였다.

방법: 임상분리 균주 144균주와 표준균주 10균주를 대상으로 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지를 사용하여 5% CO₂ 배양기에서 배양하여 'spiking' 모양을 확인하였고, 혼주 인 혈청을 사용하여 발아판 시험을 시행하였다.

결과: 본 연구에서 *C. albicans* 추정 동정을 위하여 시행한 신속검사의 민감도는 혈액 한천배지와 초콜릿 한천배지에서의 'spiking' 판독이 각각 93.7%와 91.1%였고 발아판 시험은 98.7%였으며, 특이도는 모두 100%였다.

결론: 집락 판독 시 일차 분리배지인 혈액 한천배지에서 'spiking' 모양 판독은 일반 검사실에서 경제적이고 신속한 *C. albicans*의 추정 동정에 유용할 것으로 사료되었다. [대한임상미생물학회지 2007;10:150-153]

교신저자 : 이미경, 140-755, 서울시 용산구 한강로 3가 65-207
중앙대학교 용산병원 진단검사의학과
Tel: 02-748-9837, Fax: 02-797-3471
E-mail: cpworld@cau.ac.kr