

Laboratory Experience in Phenotypic and Molecular Identification of *Blastomyces dermatitidis* First Isolated in Korea

Kyung Sun Park, Chang-Seok Ki, Nam Yong Lee

Department of Laboratory Medicine and Genetics, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Blastomycosis, endemic in North America, has been hardly reported in Korea. We describe laboratory experience in phenotypic and molecular identification of *Blastomyces dermatitidis* first isolated in Korea. The patient was a 45-year-old male with pulmonary blastomycosis mimicking pulmonary tuberculosis. Diagnosis was based on culture and dimorphism combined

with DNA target sequencing of internal transcribed spacers (ITS) and D1/D2 regions. (Korean J Clin Microbiol 2012;15:114-116)

Key Words: *Blastomyces dermatitidis*, Blastomycosis, D1/D2, Internal transcribed spacers (ITS), Molecular identification

분야균증(Blastomycosis)은 *Blastomyces dermatitidis*에 의한 진균성 감염으로, 미국 남동부와 중서부 지역의 풍토병으로 잘 알려져 있다[1]. *B. dermatitidis*은 두형태곰팡이(dimorphic fungus) 중의 하나로, 실온(25-30°C)에서는 균사체의 형태로 있다가 체온(35-37°C)에서는 효모형태로 변환하여 증식하는 특징을 가진다. 특히, 분야균증은 histoplasmosis, coccidioidomycosis 등의 감염, 종양, 및 결핵 등과 비슷한 임상 양상 및 방사선학적 소견을 보인다. 또한 병리학적으로는 periodic acid-Schiff (PAS) 염색, Gomori methenamine silver (GMS) 염색 등을 통해 체내에서 변환된 분야균의 효모 형태를 관찰하고, mucicarmine 염색 등을 통해 가장 대표적인 효모형 진균인 *Cryptococcus*와 감별진단 하는 방법이 있지만, 비전형적인 형태의 *B. dermatitidis*일 경우 이러한 진단 및 감별이 어려우므로, 감염이 의심되는 부위의 검체를 각기 다른 온도에서 배양을 하여 두형태곰팡이의 형태학적 특성을 확인하는 것이 가장 정확하고 예민한 진단방법으로 알려져 있다[1]. 국내에서 이미 몇몇의 분야균증에 의한 증례보고가 있지만 모두 임상 소견 및 병리조직학적 특성을 기반으로 분야균증이 추정되었던 경우이며 실제 균주가 분리된 적은 없었다[2,3]. 저자들은 전 등에 의해 폐결핵으로 오인된 폐분야균증이라는 내용으로 이미 증례는 보고되었지만 [4], 국내 검사실에서는 처음으로 균주를 분리하여 분야균증을 확진하였기에 이에 대해 자세히 소개하고자 한다. 따라서 저자들은 이전에 발표된 증례에서는 기술되지 못하였던 균주의 배

양과 분리, 미생물학적인 동정 과정, 염기서열결과 분석에 초점을 맞추어 *B. dermatitidis*에 대한 동정 경험을 기술하고자 한다.

23년 전 폐결핵 치료를 받는 과거력이 있고 증상 및 흉부 전산화 단층촬영, 경피적 세침흡인술의 병리학적 소견에서 폐결핵이 의심되는 45세 남자 환자의 bronchoalveolar lavage (BAL) 체액에서 세균 및 진균 배양검사가 의뢰되었다. 결핵을 비롯한 다른 세균 배양에서는 음성이었으나, 30°C의 배양 10일째 Sabouraud's dextrose 배지에서 진균이 의심되는 집락이 관찰되었다. 배지 앞면의 집락은 희고 무르며 솜털 같은 양상을 보이고 있었고(Fig. 1A), 배지 뒷면의 집락은 황갈색의 주름진 양상을 보였다(Fig. 1B). 집락을 lactophenol cotton blue (LPCB)로 염색하여 현미경으로 관찰한 결과, 균사가 격벽을 가지고 짧거나 긴 분생자 자루(conidiophores) 끝에 둥근 알사탕(lolliop-like appearance) 같은 모양의 분생자(conidiophores)가 관찰되었다(Fig. 1C). 그러나 *B. dermatitidis*, *Emmonsia* species, *Chyso-sporium* species, 및 *Scedosporium boydii* 등이 현미경 소견에서 모두 비슷한 양상으로 관찰될 수 있으므로 이를 감별하기 위해 시험 균주에서 internal transcribed spacers (ITS), D1/D2 유전자의 염기서열분석을 시행하였다.

576 bp의 ITS 유전자의 염기서열을 GenBank 데이터베이스의 basic local alignment search tool (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하여 분석한 결과, 가장 높은 염기서열의 상동성을 보이는 균주는 *Ajellomyces dermatitidis* (accession no. U18364, 99.8%, 575/576)이었고, 두 번째로 높은 염기서열의 상동성(96.5%, 544/564)을 가지는 균주는 *Emmonsia parva* (accession no. AF038327.1)이었다. 또한 CBS 데이터베이스 (<http://www.cbs.knaw.nl/>)를 이용하여 같은 염기서열을 분석한 결과, *A. dermatitidis*의 표준 균주(CBS 673.68)의 염기서열과

Correspondence: Nam Yong Lee, Department of Laboratory Medicine and Genetics, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 50, Irwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea. (Tel) 82-2-3410-2706, (Fax) 82-2-3410-2719, (E-mail) micro.lee@samsung.com

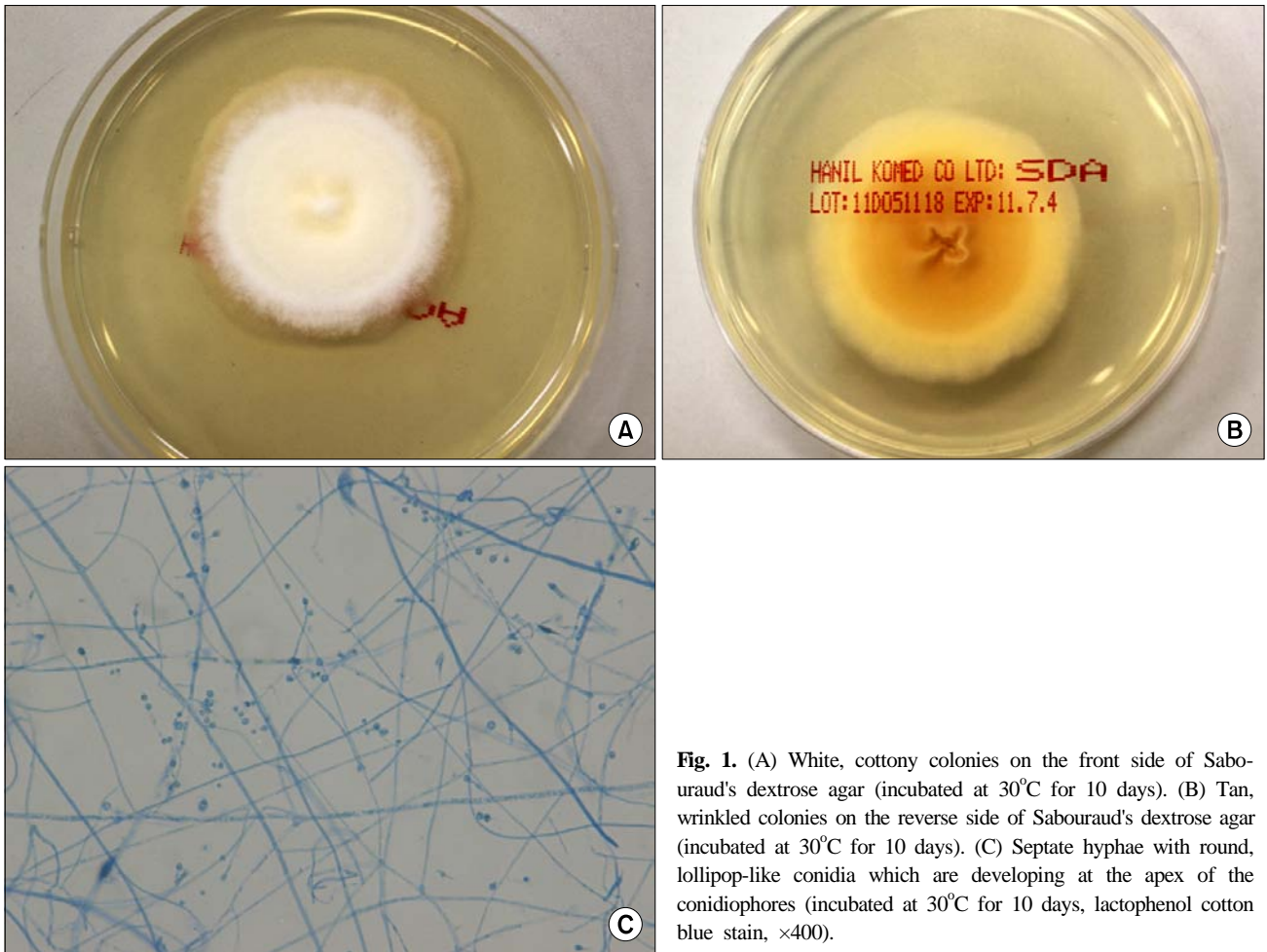


Fig. 1. (A) White, cottony colonies on the front side of Sabouraud's dextrose agar (incubated at 30°C for 10 days). (B) Tan, wrinkled colonies on the reverse side of Sabouraud's dextrose agar (incubated at 30°C for 10 days). (C) Septate hyphae with round, lollipop-like conidia which are developing at the apex of the conidiophores (incubated at 30°C for 10 days, lactophenol cotton blue stain, $\times 400$).

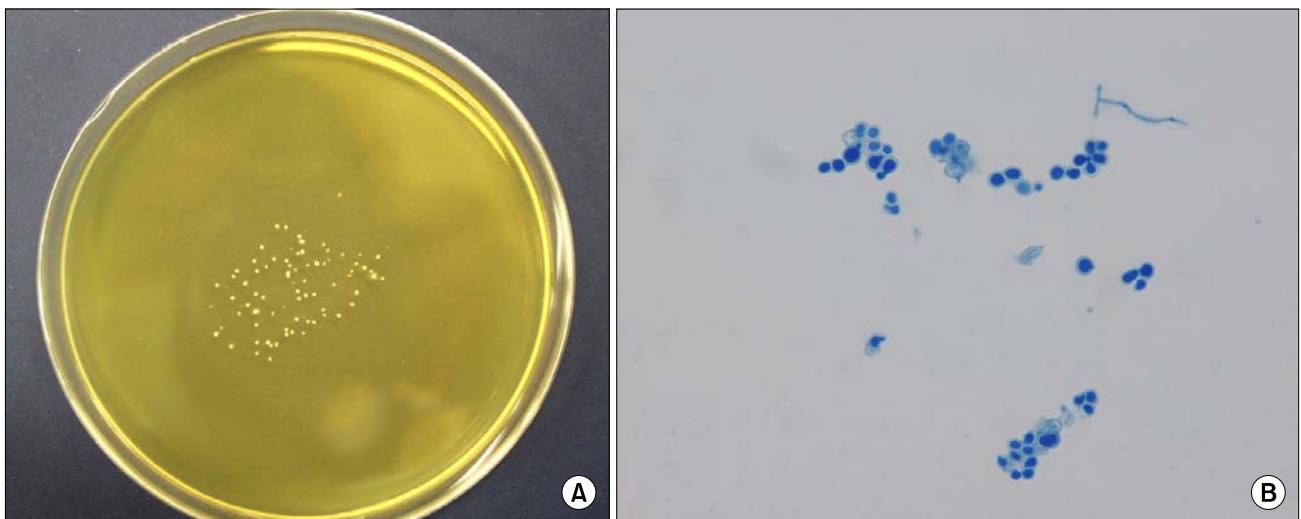


Fig. 2. (A) Cream-colored colonies on brain heart infusion (BHI) agar (incubated at 35°C for 12 days). (B) Yeastlike cells with characteristic thick, double contoured walls and broad-based buds (incubated at 35°C for 12 days, lactophenol cotton blue stain, $\times 400$).

99.8% 상동성을 가지고 그외 균주들의 염기서열과는 모두 95% 이하의 상동성을 보이고 있음을 확인하였다.

GenBank 데이터베이스를 이용하여 시험 균주의 D1/D2 유전자(529 bp) 염기서열을 분석하였을 때, *A. dermatitidis* ATCC 18187 균주의 염기서열(accession no. AY176704)과 100% (529/529) 상동성을 가지고 있음을 확인하였다. 그러나 *E. parva* (accession no. AF038333), *E. pasteuriana* (accession no. EF592152), *E. crescens* (accession no. AF038340) 및 *Paracoccidioides brasiliensis* (accession no. DQ361104)의 염기서열과도 각각 99.1% (524/529), 98.1% (519/529), 97.9% (519/530), 97.3% (500/514)의 상동성을 가지고 있었고 그 외 다른 균주들과는 96% 이하의 상동성을 보이고 있음을 확인하였다. 또한 같은 염기서열을 CBS 데이터베이스를 이용해 분석을 시행하였을 때, *A. dermatitidis*의 표준 균주(ATCC 18187, CBS 673)의 염기서열(accession no. AY176704)과 100% 상동성을 가지고 있었고 *A. crescens*의 표준 균주(CBS 100376) 및 *P. brasiliensis*의 표준 균주(CBS 372.73, ATCC 32069)의 염기서열과는 각각 97.9% (518/529), 97.4% (515/529)의 상동성을 보이고 있음을 확인하였다. 그러나 그 외의 다른 균주와는 96% 이하의 상동성을 보였다. 결론적으로, GenBank와 CBS 데이터베이스를 이용해 ITS와 D1/D2 유전자의 염기서열을 종합적으로 분석한 결과, 저자들은 시험 균주의 염기서열이 *A. dermatitidis*와 가장 일치하는 것으로 판정할 수 있었다.

*A. dermatitidis*는 *B. dermatitidis*의 유성 생식(sexual reproductive state) 때의 명칭으로, 저자들은 *B. dermatitidis*의 효모형을 확인하기 위해 35-37°C 배양을 시행하였다. 시험 균주를 36°C 및 37°C, SDA 배지에 약 3주 동안 배양을 시도해 보았으나 집락이 관찰되지 않았다. 그래서 35°C, brain heart infusion (BHI) 배지에서 다시 시험 균주를 배양하였고 12일만에 배양된 집락을 확인할 수 있었다(Fig. 2A). 또한 배양된 집락을 LPCB로 염색하여 현미경으로 관찰한 결과, 이중 윤곽의 막이 두꺼운 효모형의 세포들과 모세포에 붙어있는 분아 포자들을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B).

분아균증은 폐, 피부, 중추신경계, 및 요로생식기 등의 전신

감염을 유발하나 임상 증상이 비특이적이며, 진단 후 적극적인 항진균제 치료로 대부분 회복이 되지만 적절한 치료가 시행되지 않으면 사망에까지 이르게 할 수 있다[5]. 따라서 검사실의 신속하고 정확한 진단이 환자의 치료 및 예후에 매우 중요한 영향을 미친다. 그러나 분아균증은 그 동안 북미의 풍토병으로 알려져 있었으므로, 국내 검사실에서 집락 및 현미경 소견으로 진균을 감별 진단하는 과정 중에 *B. dermatitidis*이 대부분 고려되지 못했을 가능성이 높다. 본 증례에서도 *B. dermatitidis*으로 최종 진단이 되고 난 후에 환자의 거주력을 확인한 결과 환자가 내원 4년 전부터 약 2년 동안 미국 Tennessee주에 거주하였다는 것을 확인할 수 있었다[4]. 검사실에서는 환자의 특정 지역에서의 거주력, 폐결핵으로 의심되는 임상 증상 및 호흡기 검체의 진균 배양 후 현미경 소견에서 격벽을 가진 균사와 함께 분생자 자루 끝에 둥근 알사탕 모양의 분생자가 관찰될 때 *B. dermatitidis*에 의한 폐분아균증을 의심해 보아야 하며, 보다 확실한 진단을 위해 ITS나 D1/D2 같은 리보솜 DNA의 염기서열 분석을 하거나 체온(35-37°C) 배양을 실시해 효모형태로의 변환을 확인해 봐야 한다. 따라서 저자들이 이번에 소개하는 검사실에서 경험한 *B. dermatitidis* 동정 과정은 국내 타 검사실의 분아균증 진단에 중요한 기본 자료가 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Saccente M and Woods GL. Clinical and laboratory update on blastomycosis. Clin Microbiol Rev 2010;23:367-81.
2. Cho JH, Suh JS, Kim JH. Systemic blastomycosis with osseous involvement of the foot: a case report. J Korean Foot Ankle Soc 2005;9:216-9.
3. Seo CG, Seo YW, Park HP, Choi WI, Beom HS, Kwon KY, et al. A case of blastomycosis after traveling around non-endemic area. Tuberc Respir Dis 2005;58:619-23.
4. Jhun BW, Kim DM, Park JH, Yoo HS, Shim H, Kim JG, et al. A case of pulmonary blastomycosis mimicking pulmonary tuberculosis. Tuberc Respir Dis 2012;72:77-81.
5. Pappas PG. Blastomycosis in the immunocompromised patient. Semin Respir Infect 1997;12:243-51.