

지속적 배양결과 감시를 통한 *Cladosporium* Species 가유행 검출

유수현 · 김명숙 · 정혜선 · 이양순 · 용동은 · 정석훈 · 이경원 · 정윤섭

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소

Recognition of a Pseudo-Outbreak of *Cladosporium* Species by Continuous Monitoring of Culture Results

Soohun Yoo, Myung Sook Kim, Hae-Sun Chung, Yangsoon Lee,
Dongeon Yong, Seok Hoon Jeong, Kyungwon Lee, and Yunsop Chong

Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: *Cladosporium* spp. are dematiaceous fungi that are commonly isolated from indoor and outdoor environments, including hospital air. This fungus is rarely pathogenic to humans, but has been reported to cause infections of the skin and toenails, as well as sinusitis and pulmonary infections. The monitoring of culture results was conducted to identify the outbreak of an unknown black fungal infection between January and March 2006 in a University hospital, and infection control activity was performed to identify the cause of the outbreak.

Methods: An epidemiological investigation of 22 patients with infections caused by an unknown black fungus was conducted. Microscopic examination and molecular analysis on the internal transcript spacer (ITS) region was performed to identify the black fungus. To detect the source of contamination, a culture of environmental specimens was performed, and then, disinfection of the laboratory was implemented.

Results: The patients with black fungi belonged to various departments and wards. No symptoms of fungal infection were recognized on the basis of the survey. The black fungus was identified as *Cladosporium* spp. on the basis of morphological features and ITS region sequencing. Culturing of environmental specimens was performed in the laboratory. Black fungi were isolated from a specimen from a rack and had the same morphological features with *Cladosporium* spp. from clinical specimens. After the rack was autoclaved, *Cladosporium* spp. from clinical specimens was no longer isolated.

Conclusion: Epidemiological investigation, microscopic examination, and molecular analysis revealed that the sudden increase in the isolation rate of *Cladosporium* spp. from clinical specimens was the result of a pseudo-outbreak caused by the contamination of a rack. To our knowledge, this is the first report of a pseudo-outbreak of *Cladosporium* spp. Continuous monitoring of culture results is important to avoid unnecessary labor for nosocomial infection control.

Keywords: Pseudo-outbreak, *Cladosporium* spp., Contamination

서론

접수일: 2010년 5월 4일
수정일: 2010년 5월 25일
게재승인일: 2010년 5월 28일
교신저자: 용동은, 120-752 서울시 서대문구 성산로 250
연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소
Tel: 02-2228-2442, Fax: 02-364-1583
E-mail: deyong@yuhs.ac

Cladosporium spp.는 원내외 환경에서 흔하게 분리되는 사상형 흑색진균(dematiaceous fungus)으로 공기 중 진균 포자의 53%가 *Cladosporium*이며[1], 온도 20°C와 습도 80%만 넘는 경우면 증식이 가능하다[2]. *Cladosporium* spp.은 토마토 잎

곰팡이병의 원인균이며 사람에서는 드물게 피부, 손발톱 및 호흡기 감염을 일으킨다고 보고되었다[3,4]. *Cladosporium* spp.는 Sabouraud dextrose agar (SDA)에서 흑색 혹은 검정색 집락을 형성하며, 경검시 사슬 모양의 분생자를 관찰할 수 있다.

2006년 1월에서 3월 사이 본원에서 시행한 진균배양에서 흑색진균의 검출빈도가 갑작스럽게 증가하였다. 분리된 흑색진균은 *Cladosporium* spp.로 동정되었다. 이에 역학조사와 감염관리활동을 실시하여 가성 돌발유행(pseudo-outbreak)의 여부를 확인하였고 환경배양을 통하여 오염원을 규명하고 문제를 해결하였음을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 진균 배양 및 경검

진균 배양이 의뢰되었던 임상 검체를 나사마개 시험관(12×125 mm)에 분주한 gentamicin 함유 SDA 사면 배지에 접종하였다. 검체 접종 후 30°C 배양기에서 5일 마다 진균 증식을 관찰하였고 총 3주간 배양하였다. 진균 증식시 lactophenol cotton blue를 이용하여 고정 염색한 후 경검하여 균사와 분생자의 모양 등 형태학적 특징을 관찰하였다.

2. 역학 조사

임상미생물 검사실에서 흑색진균 증식이 현저히 증가하였던 2006년 1-3월 사이 상기 흑색진균이 분리된 검체의 종류, 환자의 진단명, 성별, 연령, 병동 및 진료과를 조사하였다.

분리된 흑색진균의 출처를 파악하기 위해 세계의 시험관대(rack), 배양기를 포함한 검사실 환경배양을 실시하였다. 진균 배양은 gentamicin을 포함한 SDA 사면 배지로 시행하였다. 환경 배양 실시 후 시험관대는 습열고압멸균기(autoclave)로 멸균하였고 배양기를 5% Tego액과 60% Alcohol을 사용해 소독하였다.

3. 종합효소연쇄 반응을 이용한 유전자 증폭과 염기서열 분석

임상검체에서 분리된 흑색진균의 유전자 염기

서열을 분석하기 위해 해당 균주와 표준균주 *Candida albicans* ATCC 18804, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923을 부유시킨 증류수 100 μ L를 각각 100°C에서 10분간 중탕 후 4°C에서 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 불순물을 침전시켰다. 상청액 1 μ L를 DNA template로 사용하여 종합효소연쇄반응을 시행하였다. 한쌍의 시발체(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' 및 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하여 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)로 ITS 부위 유전자를 증폭하였다[5]. 증폭 조건은 95°C에서 5분간 열 변성 후 95°C 30초, 55°C 1분, 72°C 1분의 과정을 35회 반복 후 72°C에서 6분간 연장반응을 실시하였다. 증폭된 각 균주의 DNA는 전기영동을 통해 band를 확인한 후 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)를 이용하여 증폭산물을 정제하였다. 정제된 DNA는 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 사용하여 양방향으로 염기서열을 분석하였다. 이 염기서열을 EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>)에서 일치도가 가장 높은 균종과 비교하였다.

결 과

1. 진균 배양 및 경검

SDA에서 증식된 진균 집락은 공기면과 배지면 모두 짙은 흑색이었으며, 부드러운 벨벳 같은 표면이었다(Fig. 1A). Lactophenol cotton blue 경검상 갈색격벽이 뚜렷한 사상형 진균이 관찰되었다(Fig. 1B). 흑색사상균은 분생 포자의 형태에 따라 *Phialophora*형, *Cladosporium*형, *Acrotheca*형으로 나뉘지는데[6], 분리된 흑색진균은 분생자 가지 끝에 난원형의 분생포자가 긴 사슬을 이루고 있는 *Cladosporium*형이었다.

2. 역학 조사

2006년 1월에서 3월 사이에 진균 배양이 의뢰된 554 검체 중 22 검체에서 동일한 형태의 집락과 현미경 소견을 보이는 흑색진균이 증식하였다. 최초 분리는 2006년 1월 27일 의뢰된 복수 검

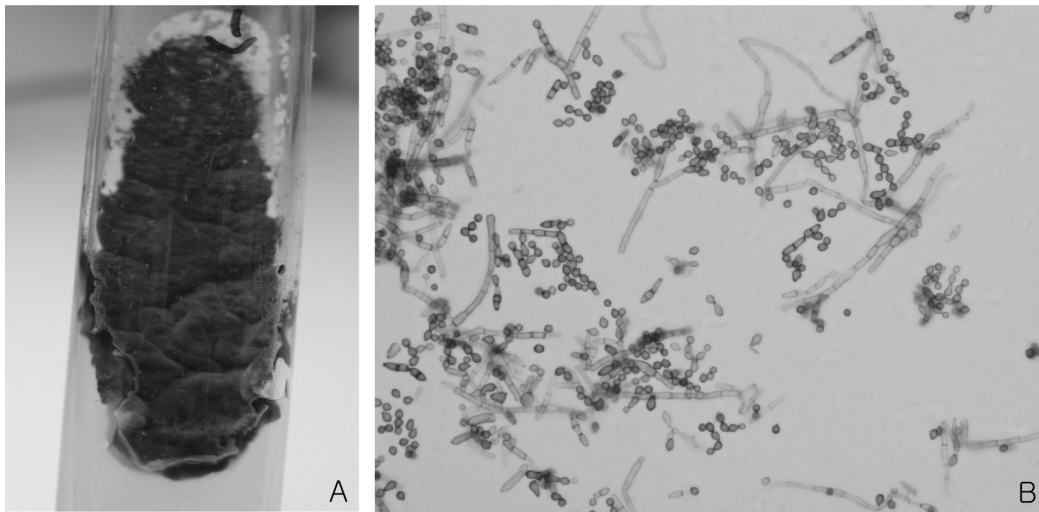


Fig. 1. (A) Dematiaceous fungi after growth on Sabouraud dextrose agar at 30°C for 2 weeks. (B) Microscopic finding of lactophenol cotton blue mounting ($\times 1,000$).

Table 1. Patient's demographic and clinical data with dematiaceous fungi by service and source

Patient	Sex/Age	Culture date	Department	Ward	Specimen	Diagnosis
A	M/46	06/01/27	KD	OPD	Peritoneal fluid	Hepatitis B
B	F/62	06/01/31	CV	CCU	Sputum	Pneumonia
C	M/49	06/01/31	GI	ICU	Peritoneal fluid	Post-op liver transplantation
D	F/67	06/02/01	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
E	F/70	06/02/01	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
F	M/61	06/02/03	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, hip
G	M/57	06/02/03	OS	GW	Synovial fluid	Post-op total hip replacement
H	M/55	06/02/04	TS	ICU	Sputum	Liver cirrhosis
I	F/60	06/02/06	OS	GW	Synovial fluid	Dislocation of patella
J	F/65	06/02/06	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
K	F/68	06/02/06	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
L	M/65	06/02/10	NR	ER	CSF	Bacterial meningitis
M	M/91	06/02/11	CV	ER	CSF	Encephalitis
N	F/49	06/02/11	EM	ER	CSF	Meningitis
O	M/80	06/02/13	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
P	F/70	06/02/13	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
Q	M/37	06/02/14	DM	OPD	Tissue	Dermatofibrosarcoma protuberans
R	F/49	06/02/16	ED	GW	Sputum	Aspergilloma
S	F/67	06/02/17	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
T	F/65	06/02/17	OS	GW	Other	Osteoarthritis
U	F/74	06/03/03	OS	GW	Synovial fluid	Osteoarthritis, knee
V	F/75	06/03/15	OS	GW	Synovial fluid	Degenerative osteoarthritis

Abbreviations: KD, nephrology; CV, cardiovascular medicine; GI, gastrointestinal medicine; TS, division of transplantation; OS, orthopedic surgery; NR, neurology; EM, emergency medicine; ED, endocrinology; DM, dermatology.

제이었고, 2월에 16건으로 가장 많이 분리되었다. 3월 17일 검사실 환경 소독이 이루어진 후에는 더 이상 분리되지 않았다.

흑색진균이 분리된 환자는 정형외과 환자가 13명, 심장내과 환자가 2명, 내분비내과, 소화기내과, 신경과, 신장내과, 이식외과, 응급의학과,

피부과 환자가 각각 1명이었다. 병동 별로도 일반병동, 응급실, 중환자집중치료실 및 외래 등 규칙성을 찾을 수 없었다. 검체 별로는 관절 천자액이 13건, 객담이 3건, 뇌척수액이 3건, 복수액이 2건, 피부조직이 1건, 기타 검체가 1건이었다 (Table 1). 본 환자들에게서 *Cladosporium* spp. 감

염으로 인해 발생할 수 있는 피부 및 피하조직 이상증상 보이는 환자는 없었으며, 모든 환자는 본 흑색진균이 단 한 번씩만 분리되었다.

검사실 환경 배양 결과, 시험관대 1개에서 임상검체에서 분리된 흑색진균과 동일한 진균의 오염이 발견되었다. 배양 후 경검상 임상검체에서 분리된 진균과 동일한 흑색의 격벽과, 사슬 모양의 분생자가 관찰되어 *Cladosporium* spp.로 동정할 수 있었다.

검사실 환경 배양 시행 후, 0.5% TEGO와 60% Alcohol로 진균 배양기를 소독하였으며, *Cladosporium* spp.가 분리된 시험관대를 포함해 모든 시험관대를 습열멸균하였다. 이후 임상 검체에서 더 이상의 흑색진균 분리는 관찰되지 않았다.

3. 중합효소연쇄 반응을 이용한 유전자 증폭과 염기서열 분석

분리된 흑색진균과 표준균주 *C. albicans* ATCC 18804, *S. aureus* ATCC 25923로 중합효소연쇄 반

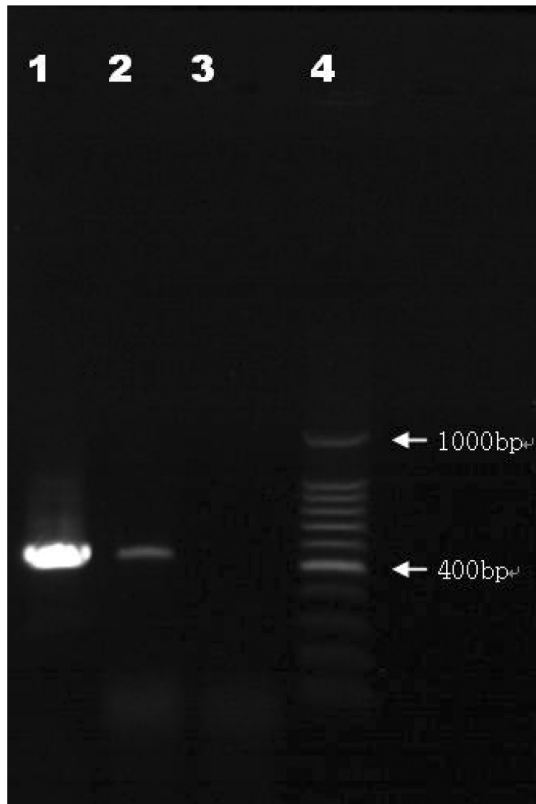


Fig. 2. Analysis of ITS PCR. Lane 1, dematiaceous fungi; lane 2, *C. albicans* ATCC 18804; lane 3, *S. aureus* ATCC 25923; lane 4, size marker.

응(PCR)을 이용해 ITS 부위의 염기서열을 증폭한 후 전기영동을 실시하였다. 전기영동 결과 흑색진균과 표준균주 *C. albicans*에서만 500 bp 정도의 DNA band가 관찰되었다(Fig. 2). 산물을 QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)로 추출하여 ABI Prism 3100 Genetic Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>)과 비교하여 *Cladosporium* spp. CMSF-2006a와 99.4%로 가장 높은 일치도를 보였으며, 다음은 *Cladosporium* spp. F42 18S rib과 98.6%, *Cladosporium sphaerospermum* Type strain (ATCC 11289)과는 96%의 일치도를 보였다. 따라서 임상검체에서 분리된 흑색진균은 속(genus) 수준 동정상 *Cladosporium* spp.로 판단하였다[7].

고 찰

원내 감염은 질병 이환과 사망의 주요 원인으로 미국에서는 매년 2백만 건 이상의 사례가 발생한다. 이로 인한 의료비 지출은 4억 5천만 불, 사망자는 매년 88,000명에 달하며, 따라서 원내 감염 관리는 매우 중요하다[8]. 평상시 기본적으로 있는 수준의 감염을 토착성 감염이라 하며 병원에서 얻은 특정한 감염이 통상적인 발생수보다 더 흔히 발생했을 때 돌발감염(outbreak)이라고 한다[9]. 돌발유행이 발생 시 원인균주와 원인, 전파과정, 발병 위험인자를 신속히 파악하고 대처할 수 있어야만 한다. 그러나 검체 오염이나, 검사실 오차에 의해 발생한 경우 이를 가유행(pseudo-outbreak)이라 한다. 가유행은 진성 돌발유행과 구분이 어려워 원내 감염관리에 혼란을 초래하며, 이로 인해 의료자원의 낭비와 불필요한 치료를 초래하고 검사실의 신뢰도를 떨어뜨릴 수 있기에 이를 감별할 수 있는 전문가의 지속적인 관리, 감시가 필요하다[10]. 원내 가유행의 원인으로 *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella oxytoca*, *Candida versatilities*, *Cryptococcus neoformans* 등이 있다고 알려져 있으나 본 논문에서와 같은 *Cladosporium* spp.에 의한 원내 가유행은 보고된 바가 없다.

2006년 1월에서 3월 사이에 관절천자액, 객담

등 다양한 임상 검체에서 *Cladosporium* spp.이 분리되었다(Table 1). 본원에서는 임상 검체에서 희귀한 균주가 분리되었을 시 자동으로 병원 전산망을 통해 임상미생물학 전문의에게 보고되는 체계가 존재하며 보고 받은 전문의는 오염균일 가능성과 실제 병원균일 가능성을 판단하여 다음 행동을 결정한다. *Cladosporium* spp.의 검출은 전문의에게 보고되었고 통상적으로 분리되는 수보다 더 많이 분리되었기에 돌발감염을 의심하였다. 감염원을 찾기 위한 역학조사결과 흑색진균이 분리된 환자들에게서 공통된 임상 증상이 발견되지 않았고, 입원 병실도 특정 지역에 편중되지 않았기 때문에 진성돌발유행보다는 가유행을 의심하였다. 가유행 원인을 찾기 위한 검사실 환경 배양을 시행하였으며, 그 중 한 시험관대에서 환자에서 분리된 *Cladosporium* spp.와 동일한 집락과 현미경 소견을 가진 진균 집락이 증식하였다. 시험관대 소독 후 더 이상 임상 검체에서 *Cladosporium* spp.이 증식되지 않았기 때문에 검사실 시험관대가 *Cladosporium* spp. 가유행의 원인으로 판단할 수 있었다. 그러나 임상 검체에서 분리된 *Cladosporium* spp.과 실험실 환경 배양에서 분리된 *Cladosporium* spp.의 유전자 형질분석 실험의 부제로 분자 역학적으로 동일한 균주 인지 확인 할 수 없었다는 점이 본 가유행 보고의 한계점으로 남는다.

시험관대는 생물학적 안전상자 안에서 검체 접종시 SDA 배지를 거치하는데 사용된다. 따라서 시험관대가 오염된 경우 본원에서의 가유행 사례와 같이 검체 접종 과정에서 가유행을 일으킬 가능성이 높은 것으로 판단된다. 본래 안전상자 자체와 그 안의 검체 접종용 기구들은 매일 약품과 자외선을 이용한 소독을 실시한다. 하지만 약품과 자외선을 이용한 소독은 다소 한계가 있으며, 검체 접종용 기구 중에서 시험관대와 같이 안전상자 내부에 고정된 것이 아니라 상자 내부와 외부로 오고 갈 수 있는 기구들이 존재한다. 환경 소독과 안전상자 자체의 환기 체계에도 불구하고 안전 상자 내부가 오염으로부터 자유롭다고 할 수 없다. 그러므로 검사실에서 사용되는 기구들 중 특히 생물학적 안전상자 안에서 사용하는 기구들에 대한 체계적인 관리와 정기적

인 멸균소독이 필요하다고 판단된다.

진균감염이 의심될 경우 전통적인 방법으로는 동정이 어려운 경우도 있으나 최근 도입된 분자생물학적 방법은 이를 해결할 수 있는 유용한 도구를 제공한다. Fell 등은 26S rDNA 아단위인 D1/D2 부위의 염기서열 분석을 이용한 방법으로 basidiomycetous yeast를 동정할 수 있음을 보고하였고[11], Wang는 D1/D2 부위와 internal transcribed spacer (ITS)의 염기서열 분석이 *Pseudozyma* 분류에 유용함을 보고하였다[12]. 또한 본 검사실에서도 D1/D2의 염기서열 분석을 이용한 방법이 임상검체 중 전통적인 방법으로 동정이 어려웠던 진균의 동정에 유용함을 보고한 바 있다(내부자료). 본 논문에서도 ITS 염기서열 분석을 이용해 전통적인 흑색진균 동정을 재확인 할 수 있었다. ITS는 rRNA 유전자 중 단백질이 부호화되어 있지 않은 부위로 진균에서 각각의 종마다 고유한 염기서열을 가지고 있어 비전형적인 진균 감별 시 가장 신뢰도가 높다고[13] 알려져 있다. ITS 염기서열은 진핵 생물만이 가지고 있으므로, 본 연구의 실험에서도 ITS 유전자 증폭 후 시행한 전기영동 실험에서 진균인 *Cladosporium* spp.와 *C. albicans* ATCC 18804에서만 ITS가 증폭되었다.

결론적으로 본 저자들은 지속적인 배양 결과 감시와 역학 조사를 통해 과거에 매우 드물었던 *Cladosporium* 분리 증가를 인지하였고, 환경 배양과 소독을 통하여 가유행의 원인을 검출, 제거하였다. 이로써 임상에서의 혼란과 불필요한 진료를 방지하여 의료자원 낭비를 막을 수 있었다. 저자들은 *Cladosporium* spp.도 원내 가유행의 원인이 될 수 있음과, 불필요한 병원감염관리 업무를 막기 위해 임상미생물 검사실에서 지속적으로 결과를 감시하는 것이 중요함을 보고하는 바이다.

요 약

배경: *Cladosporium* spp.는 실내외 환경에서 흔하게 분리되는 사상형 진균으로 형태학적으로 흑색진균(dematiaceous fungus)에 속한다. *Cladosporium* spp.은 사람에서는 매우 드물게 피부, 손

발톱 및 호흡기 감염을 일으킨다고 보고되었다. 본원에서 2006년 1월에서 3월 중 지속적 배양결과 감시를 통해 임상 검체에서 미상의 흑색의 진균 분리가 증가함을 인지하여, 돌발 유행의 원인 규명을 위한 감염관리 활동을 시행하였다.

방법: 미상의 흑색진균이 분리된 22 명의 환자를 대상으로 역학조사를 실시하였다. 균주 동정을 위해 경검과 분자생물학적 방법을 이용한 internal transcribed spacer (ITS) 부위의 염기서열 비교 분석을 실시하였다. 오염원을 찾기 위해 검사실 환경배양을 시행하였으며, 환경 배양 후 검사실 소독을 실시하였다.

결과: 흑색진균이 분리된 22검체는 여러 병동, 다양한 임상과에서 의뢰되었으며, 환자 임상양상에서 *Cladosporium* spp. 감염을 의심할 수 있는 소견은 없었다. 분리된 진균은 형태학적 특징과 염기서열 분석결과 *Cladosporium* spp.로 동정되었다. 검사실 환경배양상 시험관대에서 임상검체로부터 분리된 흑색진균과 동일한 형태의 진균을 검출하였고, 이를 소독한 후 흑색진균의 유행은 소멸되었다.

결론: 역학조사, 경검 그리고 분자생물학적 분석상 임상 검체에서 *Cladosporium* spp.의 갑작스러운 분리 빈도 증가는 검사실의 시험관대에서 유래한 *Cladosporium* spp. 오염으로 인한 가유행으로 결론 내려졌다. *Cladosporium* spp.에 의한 원내 가유행은 과거에 보고된 바 없다. 불필요한 병원감염관리 업무를 막기 위해 드문 분리 균주에 대한 지속적인 감시가 중요한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 논문은 연세대학교 의과대학 2008년 교내 연구비 지원(6-2008-0267)으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- Gent JF, Ren P, Belanger K, Triche E, Bracken MB, Holford TR, et al. Levels of household mold associated with respiratory symptoms in the first year of life in a cohort at risk for asthma. *Environ Health Perspect* 2002;110:A781-6.
- Hamada N and Fujita T. Effect of air-conditioner on fungal contamination. *Atmos Environ* 2002;36:5443-8.
- Hong W, Shin J, Shin D, Sul Y, Lee C, Suh S, et al. Filamentous fungi isolated from hospital air and from clinical specimens. *Korean J Nosocomial Infect Control* 1999;4:17-25.
- Lee DK, Moon KC, Koh JK. Clinical and mycological studies on superficial fungal infection. *Korean J Med Mycol* 2006;11:54-63.
- Ferrer C, Colom F, Frases S, Mulet E, Abad J, Alio J. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8 S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 2001;39:2873.
- Chong Y and Lee K, eds. *Diagnostic microbiology*. 4th ed, Seoul; Seo Heung Publisher, 2009:453-62.
- Moricca S, Ragazzi A, Mitchelson K. Molecular and conventional detection and identification of *Cladosporium tenuissimum* on two-needle pine rust aeciospores. *Can J Bot* 1999;77:339-47.
- Emori TG and Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993;6:428-42.
- Jang SJ. Nosocomial infection control epidemiology. *Korean J Clin Microbiol* 2003;6:97-102.
- Shears P. Pseudo-outbreaks. *Lancet* 1996;347:138.
- Fell JW, Boekhout T, Fonseca A, Scorzetti G, Stazzell-Tallman A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000;50:1351-71.
- Wang QM, Jia JH, Bai FY. *Pseudozyma hu-beiensis* sp. nov. and *Pseudozyma shanxiensis* sp. nov., novel ustilaginomycetous anamorphic yeast species from plant leaves. *Int J Syst Evol*

- Microbiol 2006;56:289-93.
13. Borman AM, Linton CJ, Miles SJ, Johnson EM. Molecular identification of pathogenic fungi. J Antimicrob Chemother 2008;61(Suppl 1):i7-12.