

유전자염기서열 분석에 의해 확진된 뷰베리아 바시아나 각막염

A Case of *Beauveria Bassiana* Keratitis Confirmed by Gene Sequencing

전종화¹ · 류남희² · 김의종³ · 장성동¹

Jong Hwa Jun, MD¹, Nam Hee Ryoo, MD, PhD², Eui Chong Kim, MD, PhD³, Sung Dong Chang, MD, PhD¹

계명대학교 의과대학 안과학교실¹, 계명대학교 의과대학 진단검사의학교실², 서울대학교 의과대학 진단검사의학교실³

Department of Ophthalmology, Keimyung University School of Medicine¹, Daegu, Korea

Department of Laboratory Medicine, Keimyung University School of Medicine², Daegu, Korea

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University College of Medicine³, Seoul, Korea

Purpose: To report a case of *Beauveria bassiana* keratitis that was confirmed by gene sequencing.

Case summary: A 70-year-old man presented to our hospital with complaints of ocular pain and deterioration of the visual acuity in his left eye after injury caused by a wood branch one week previously. Visual acuity in the left eye was 20/400 at the time of the first visit. Slit lamp examination showed a central 0.7 × 2.5-mm-sized epithelial defect surrounded by cellular infiltration in the stroma. Scraping of the corneal lesion for microbiological examinations was performed. Initial Gram stain, potassium hydroxide (KOH) mount, and culture were negative. However, fungal hyphae were observed on a KOH mount of the repeated corneal scraping specimen, and a *Beauveria* species was suspected based on the culture. *Beauveria bassiana* was confirmed using a MicroSEQ[®] D2 large-subunit ribosomal DNA fungal sequencing kit. Natamycin eye solution was initially instilled bihourly (every two hours), but the persistent epithelial defect and progressive stromal melting finally resulted in a descemetocoele. Temporary and permanent amniotic membrane transplantations were performed, and amphotericin B eye solution was administered bi-hourly (every two hours). The ulcerous lesion gradually improved with no evidence of recurrence.

Conclusions: Recently, cases of fungal keratitis have been increasing. Therefore, molecular diagnosis methods such as gene sequencing can be helpful in diagnosis and in improving the prognosis of fungal keratitis caused by rare fungi, as we found in this case. J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(6):923-927

Key Words: *Beauveria bassiana*, Gene sequencing, Keratitis

*Beauveria bassiana*는 매우 흔한 토양진균이며 전세계적으로 분포하고 있어 흔히 임상검체의 오염균으로 확인되며 *Beauveria*종은 beauvericin과 같은 강력한 진균독소를 함유

하여 항균, 항 바이러스 및 세포독성의 특성을 가진다.¹ 특히, 곤충의 병원균으로 잘 알려졌으며 옥수수 해충인 조명충 나방의 방제에 사용되는 대표적인 생물방제제(Biological Control Agents)로 미국 환경 보호국(Environmental Protection Agency)에 등록되어 있는 균종이다.² 전세계적으로 9종 18 균주가 11개사에서 생산하는 18종의 생물방제제로 실용화되어 있지만 국내에서는 실험적으로만 연구되고 있으며 농산물의 해충방제에 실제로 사용되고 있지는 않다.

*Beauveria*에 의한 안감염은 전세계적으로 8예의 각막염³⁻⁹과 1예의 공막염 및 안내염¹⁰이 보고되어 있으며 국내에서는 각막염 단 1예¹¹만이 보고되어 있을 정도로 매우 드문 원인균종이다. *Beauveria* 각막염의 경우 Pariseau 등이 보고

■ Received: 2013. 5. 31. ■ Revised: 2013. 12. 30.

■ Accepted: 2014. 5. 15.

■ Address reprint requests to **Sung Dong Chang, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Keimyung University Dongsan Medical Center, #56 Dalseong-ro, Jung-gu, Daegu 700-712, Korea
Tel: 82-53-250-7702, 7708, Fax: 82-53-250-7705
E-mail: changsd@dsmc.or.kr

* A summary of this paper was presented as a poster at the American Society of Cataract and Refractive Surgery in April 2008 held in Chicago, IL, USA.

한 가벼운 임상양상의 각막염 2예⁸를 제외하고는 대개 난치성 감염을 유발하고, 보고된 증례의 반수에서 각막의 층판 박리, 전층각막이식과 같은 감염된 각막조직의 수술적 제거가 필요하였다.^{4,6,9-11} 이는 대개 초기 균동정에 실패하는 빈도가 높아 각막찰과 검체의 배양이 반복되어 시행된 경우가 많았다. 또한, 재차 시행된 검사에서도 균동정에 실패하고 수술적으로 얻어진 생검조직의 배양에서 균이 동정되는 경우가 많아 적절한 항진균제의 투여가 지연된다. 또한 균동정에 성공하여 항진균제의 사용이 이루어지더라도 진균이 분비하는 독소들이 지속적으로 기질파괴를 유발하며 국내에서 보고된 각막염 및 공막각막염 모두 각막이식이나 안구내용물 적출술과 같은 감염조직의 제거가 필요하였다.

이에 저자들은 감염된 각막조직을 제거하지 않고 보존적 처치로 성공적으로 치료한 증례를 보고하면서 또한 희귀 균종에 의해 발생하는 각막염의 진단에 대한 분자생물학적 진단방법의 유용성에 대해 함께 보고하고자 한다.

증례보고

70세 남자환자가 1주일 전 나뭇가지에 좌안을 수상한 후 점차 심해지는 시력저하와 안구통을 주소로 본원에 내원하였다. 안과거력상 타 병원에서 진료를 받았거나 안약을 점안하고 있지는 않았다. 세극등현미경 검사에서 각막중심의 비측부위에 0.7×2.5 mm 크기의 선상 상피결손과 주변부 기질 침윤이 관찰되었고 이에 감염성각막염을 일차적으로 의심하였다(Fig. 1). 즉각적으로 각막 찰과표본의 그람 염색과 KOH 도말 검사 및 배양검사를 시행하고 Moxifloxacin 0.5%안약(Vigamox[®], Alcon, USA)을 두 시간마다 점안하였으나 초기 균동정에서 특정 균의 확인에는 실패하였다.

2주까지는 상피결손의 크기가 2.7×3.7 mm로 증가되었고 전방 내 염증소견도 관찰되었으나 이후 상피결손이 다소 감소되는 양상을 보여 Moxifloxacin에 감수성이 있는 것으로 생각하고 지속하였다. 병변의 크기는 3주경 1.0×2.0 mm로 감소되었으나 4주 후 2.5×2.5 mm로 다시 증가하는 소견을 보였다. 이에 진균각막염을 의심하고 재차 각막찰과표본의 균동정을 시도하였다. 반복된 각막 찰과표본의 KOH 도말 검사에서 유격균사가 관찰되었고 Sabouraud dextrose agar에서 4일간 배양한 결과 *Beauveria* 균종이 의심되어 5% Natamycin (Natacyn[®], Alcon, Purrs, Belgium)안약의 점안을 시작하였다(Fig. 2). 빠르고 정확한 균종의 최종 확인을 위해 MicroSEQ[®] (Applied biosystems, Foster City, CA, USA) D2 large-subunit ribosomal DNA 진균 염기서열분석키트(Fungal sequenc-

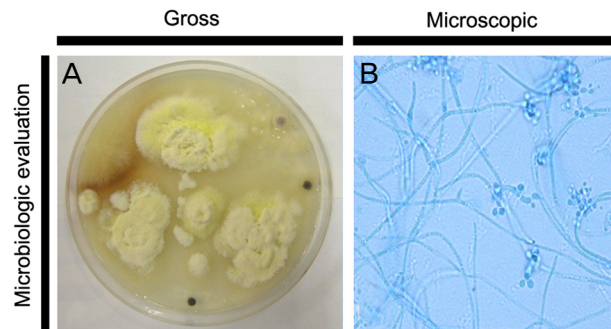


Figure 2. (A) Direct inoculation of corneal scraping specimen shows white to cream color and powdery surface after 8 days of incubation at 25°C on Sabouraud dextrose agar. (B) Microscopic findings of *B. bassiana* (latiphenol cotton blue stain, ×1000). Narrow, delicate and septated hyphae and numerous microconidia are observed. The flask-shaped conidiophores with a narrow zigzag terminal extension bearing a single conidium at each bent point.

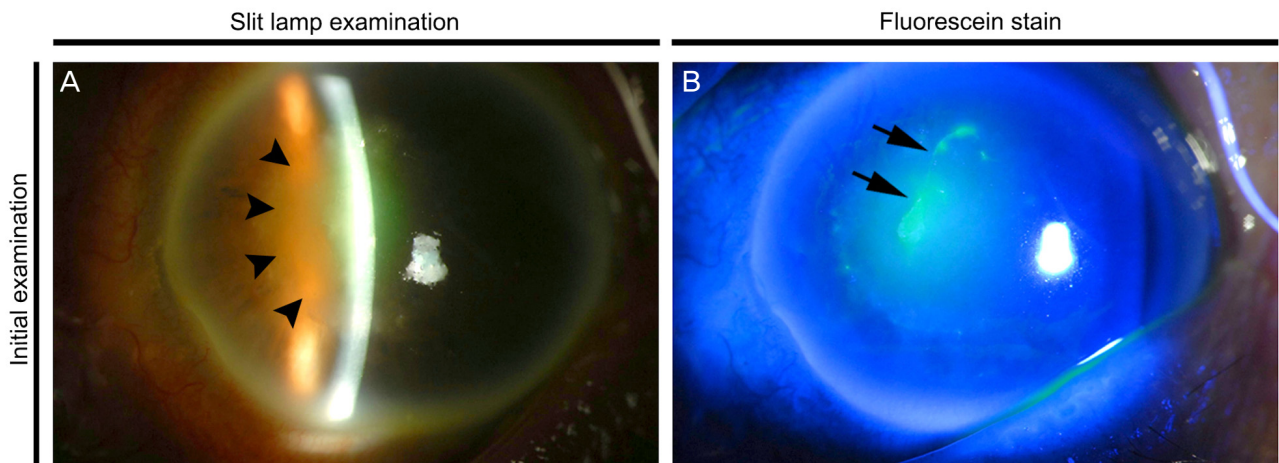


Figure 1. Initial photographs of patient's cornea. (A) On slit lamp examination, vertical linear epithelial defect surrounded by sub-epithelial and stromal infiltration with immune ring is seen at the nasal paracentral area (arrow heads). (B) Fluorescein stain reveals 0.7 × 2.5-mm- sized linear epithelial defect (arrows).

ing kit, Part number 4347482)를 이용하여 배양 중인 균종에 대한 유전자염기서열 분석을 시행하였다. 제조사의 protocol과 Hall et al¹²이 보고한 바에 따라 배양 중인 진균집락에서 DNA를 추출하여 증합효소 연쇄반응을 일으켜 증폭시켰다. 정제된 DNA를 이용하여 대상진균의 DNA 중 D2 부위의 염기서열을 MicroSEQ[®] D2 fungal library와 대조하여 가능성이 높은 진균들 중, 99% 이상의 염기서열 일치율을 보이며 다음으로 일치율이 높은 진균과 일치율이 1% 이상 차이 나는 진균을 선별하였고 집락확인 4일 후 *Beauveria bassiana*로 최종 확인되었다(Fig. 3). 이후 문헌검색을 통해 5% Natamycin (Natacyn[®], Alcon, Purrs, Belgium)이 사상진균에 살균효과가 있음을 최종적으로 확인하여 점안을 지속하였고 병변은 호전양상을 보였으나 7주 후 지속되는 기질과

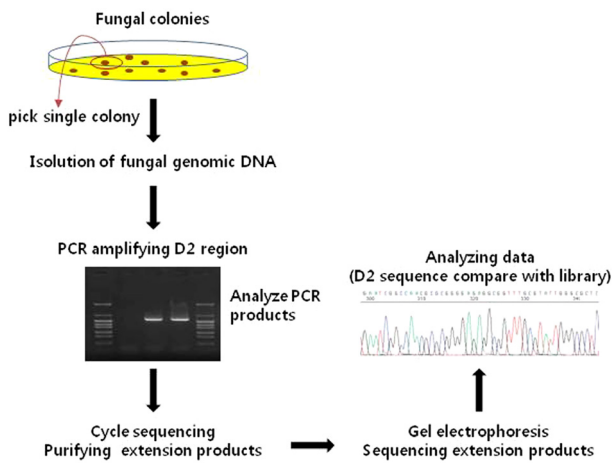


Figure 3. Schematic diagram of fungal gene sequencing procedures. Initially, genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was isolated from single colony, and then polymerase chain reaction (PCR) was performed for amplifying the D2 region of fungal DNA. Cycle sequencing and purifying the extension products were performed and sequencing of the extension products after gel electrophoresis were also performed. Finally, sequencing data was compared with kit libraries for identifying specific pathogen.

괴에 의해 데스메막류가 발생하였다(Fig. 4A). 영구 및 일시양막이식술을 시행하였고(Fig. 4B) 항진균효과의 상승작용을 위해 amphotericin B (Fungizone[®] BMS, NY, USA) 조제안약을 2시간마다 추가로 점안하였다. 치료 4개월째에 상피결손은 모두 치료되었으며 전방 내 염증은 더 이상 관찰되지 않았다(Fig. 4C).

고 찰

임상적으로 감염성 각막염 중 진균 각막염의 비중은 최근 급격히 증가추세에 있으며 이는 광범위 항생제 및 스테로이드 점안제제의 사용에 기인한 것으로 생각한다.¹³ 대개의 경우 초기 자극증상이 심하지 않고 점진적인 진행양상을 보인다. 스테로이드 점안제제에 다소간 반응을 보이거나 오히려 점차로 각막감염이 악화되며 중단 시 급작스러운 임상경과의 악화를 경험하기도 한다. 임상적으로 세균성 각막염에 준해 치료하다가 지속된 상피결손 및 면역환양상을 보이는 경우 2차적으로 의심하게 되며 이 경우 최소 1-2주 가량 적절한 항진균제 점안이 지연되고 각막찰과 표본의 균 동정을 시도하더라도 5.5 ± 8.2 일(1-35일)의 많은 시간이 소요된다.¹⁴ 또한 각막찰과 표본의 검사 시 민감도는 최근 국내의 보고에 의하면 KOH 양성률은 60세 이상에서 47.2, 60세 이하에서 27.3%였고 배양 양성률은 60세 이상에서 27.8, 60세 이하에서 18.2%로 매우 낮고 국외의 보고에 의하면 도말 표본 염색 시 66.7% (49.0-84.4%, 95% Confidence interval, CI), 배양 시 59.3% (40.4-78%, 95% CI)로 균 동정률이 낮고 균 동정에 실패할 경우 적절한 치료가 매우 어려워진다.^{14,15} 특히 균 동정 후 감수성 있는 약제를 점안하더라도 진균에서 분비되어 각막 상피 및 기질에 축적된 cyclohexadepsipesticide, beauvericin, tenellin, bassianin의 독소에 의해 균의 활동성이 소실된 이후에도 각막기질의 지속적 용해가 일어나는 것으로 알려졌다.¹⁶ 이

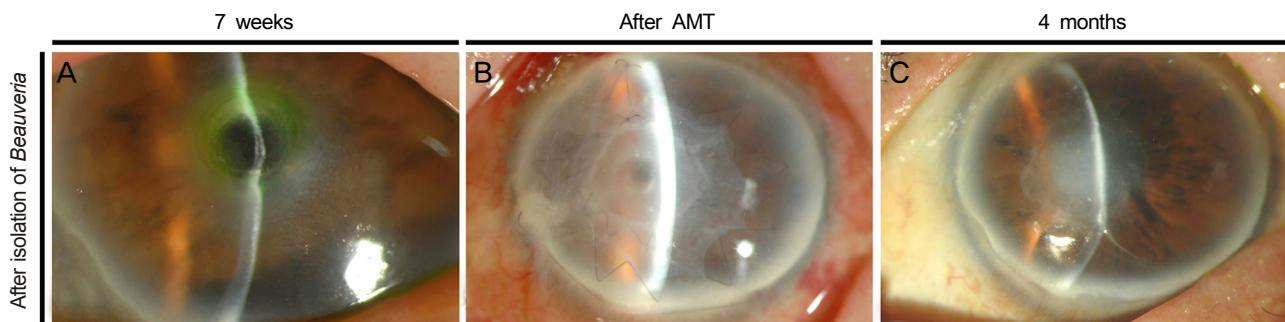


Figure 4. (A) At 7 weeks after treatment, descematocele occurred by progressive stromal melting. (B) Descematocele was covered after performing permanent and temporary amniotic membrane transplantation. (C) At 4 months after treatment, epithelial defect healed completely without recurrence of fungal infection. AMT = amniotic membrane transplantation.

는 본 증례뿐만 아니라 이전에 보고된 증례에서도 임상양상을 통해 확인된다.^{4,6,9-11} 보고된 10예의 *Beauveria bassiana* 각막염 증례를 살펴보면 콘택트렌즈 사용자에서 발생한 각막염의 경우는 초기 균 동정에 모두 성공하였고(3예 중 3예 배양양성) 콘택트렌즈의 사용과 관련되지 않은 7예는 다수가 초기 균 동정에 실패하거나(7예 중 2예 배양양성) 감염각막의 생검조직배양에서만 양성을 보였다.^{3-11,14} 따라서 신속한 진단 후 빠르고 적절한 항진균제의 점안을 통해 진균유리독소를 최대한 억제하는 것이 임상적으로 진균 각막염의 치료에 가장 중요하며 균 동정의 방법 중 가장 신속하며 정확성이 높은 분자생물학적 방법이 추천된다. 이전 문헌들을 살펴보면 Guarro and Gené¹⁷은 유전자 염기서열분석이 임상적으로 진균감염이 의심될 경우 균 동정에 적절하다고 하였고 Thomas¹⁸는 균 배양이 어려운 경우 즉각적인 진단이 가능하며 포자변태를 하지 않는 균종의 동정에 큰 이점이 있다고 하였다. Ferrer and Alió¹⁴도 안 진균증의 진단의 경우 유전자 염기서열분석이 고식적 균배양보다 민감도가 높다고 하였다(고식적 균 배양: 59.3%, 염기서열분석: 92.6%, polymerase chain reaction (PCR): 82.7-100%). 또한 검사소요시간도 획기적으로 단축되어 4-8 시간 안에 결과를 확인할 수 있으며 도말 검사법과 배양법을 병행한 균동정과 중합효소연쇄반응을 기초로 한 염기서열분석법(PCR-based DNA sequencing)의 결과를 비교했을 경우에도 각각 77.7%와 92.6%의 배양양성을 보여 중합효소연쇄반응을 기초로 한 염기서열분석법이 의심되는 균종의 즉각적이고 정확한 진단에 적합하다고 할 수 있다.¹³

본 증례는 초기 균 배양에서 음성을 보였고 moxifloxacin 안약을 사용 후 다소 호전양상을 보여 진균감염을 의심하지 못하였고 초기 치료에는 실패하였다. 하지만 유전자 염기서열분석에 의해 최종적으로 *Beauveria bassiana*가 확진된 후 문헌검색을 통해 이전 국내외에 보고된 증례에서 amphotericin B와 fluconazole제제가 일차적인 효과가 없었음을 확인하였다. 또한 Thomas¹⁸의 연구를 통해 사상진균의 감염에 있어 amphotericin B는 정균 제제로 유효한 치료가 힘들며 natamycin제제가 살균효과가 있음을 확인하고 기존 점안치료전략을 지속하여 적절하게 투여할 수 있었다. 다만 본 증례에서는 natamycin 안약을 점안한 이후에 amphotericin B를 병합하여 점안함으로써 두 약제에 의한 항진균효과의 상승을 기대하여 조제안약을 추가로 점안하여 치료하였다. 비록 항진균제의 투여 이후에도 진행되는 기질 용해에 의해 데스메락류가 발생하였으나 이전 국내의 보고에서와 같이 전층각막이식이나 안구내용물제거술 같은 감염조직의 제거를 시행하지 않고 영구양막이식술과 같은 보존적 술식에 의해 각막 구조를 유지할 수 있었던 점은

이러한 점에 기인한다고 할 수 있겠다.

진균 각막염의 경우 같은 균종의 경우에도 적게는 수종, 많게는 수백 종까지도 다양한 아형이 존재하며 이의 임상양상과 균독성은 다르게 나타난다. 또한 진균감염에 사용 가능한 항진균제는 매우 제한적이며 부작용이 많고 약리학적 효과 또한 균종의 아형에 따라서 다르게 나타난다.¹⁸ 하지만 고식적인 균배양에서 집락의 형태와 양상을 통한 균종의 확인만으로는 희귀 균종의 빠르고 정확한 확인이 어려울 수 있으며 이 경우 유전자염기서열분석법은 고식적 균배양에 의한 균의 진단에 있어 보조적인 수단이 될 수 있을 것이다. 정확한 균종이 파악된다면 문헌검색을 통해 이전에 보고되었던 증례의 임상양상과 약리학적 감수성을 파악하고 이에 따라 적절한 항진균제의 선택과 치료의 전략이 수립될 수 있으며 이에 본 증례보고의 궁극적인 의의가 있다 하겠다. 다만 유전자염기서열분석법의 경우 현재까지 보고된 바는 진균배양에서 균의 집락이 확인된 경우 균종의 아형 분석을 위해서만 사용되어왔고 이를 진균각막염이 임상적으로 의심되는 경우 각막병변에서 일차적으로 검체를 얻어 분석하였던 보고는 없었다. 따라서 차후의 연구에서는 이를 각막병변의 검체에서도 사용가능한지 여부와 적용방법에 대해서 분석함도 의미가 있을 것으로 생각한다.

최근, 진균감염뿐만 아니라 다양한 감염성 질환에 중합효소연쇄반응을 기초로 한 염기서열분석법이 적극적으로 이용되고 있으며 이는 상용화된 키트로서 이용이 가능하다. 이는 지속적으로 발전하고 있는 진단법으로 감수성과 특이성이 모두 향상되고 있으며 감수성이 매우 높고 일반적인 균동정법이 5.5 ± 8.2 일이 소요되는데 비해 24시간 내 진단이 가능함으로 빠른 원인균 확인에 유용하다. 다만 이러한 진단법은 기존의 고식적 방법에 비해 검사자의 높은 숙련도가 요구되며 결과의 정확도에 차이를 보일 수 있고 검사 키트의 높은 비용 또한 걸림돌이 될 수 있다. 그러므로 본 증례와 같이 초기 도말 검사에서 음성을 보이는 경우 균동정 결과를 기다리지 않고 임상적 판단에 따라 선택적이고 보조적으로 시도될 수 있겠다.

결론적으로 외안부의 진균 감염성 질환을 진단, 치료함에 있어 고식적인 도말 및 배양검사에만 의존할 것이 아니라 임상적으로 진균각막염이 의심될 경우 적극적으로 진단법을 고려하여, 이를 고식적 미생물검사 결과와 비교하여 진단검사의학분과와 논의할 수 있어야겠다. 이로써 희귀 진균각막염을 조기에 진단하고 분비된 독소에 의한 지속적인 각막용해 및 혼탁을 막고 치료 후 최종시력의 향상을 가져올 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

- 1) Wang Q, Xu L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules* 2012;17:2367-77.
- 2) Wagner BL, Lewis LC. Colonization of corn, *Zea mays*, by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:3468-73.
- 3) Ishibashi Y, Matsumoto Y, Takei K. The effects of intravenous miconazole on fungal keratitis. *Am J Ophthalmol* 1984;98:433-7.
- 4) Sachs SW, Baum J, Mies C. *Beauveria bassiana* keratitis. *Br J Ophthalmol* 1985;69:548-50.
- 5) Low CD, Badenoch PR, Coster DJ. *Beauveria bassiana* keratitis cured by deep lamellar dissection. *Cornea* 1997;16:698-9.
- 6) Kisla TA, Cu-Unjieng A, Sigler L, Sugar J. Medical management of *Beauveria bassiana* keratitis. *Cornea* 2000;19:405-6.
- 7) Tu EY, Park AJ. Recalcitrant *Beauveria bassiana* keratitis: confocal microscopy findings and treatment with posaconazole (Noxafil). *Cornea* 2007;26:1008-10.
- 8) Pariseau B, Nehls S, Ogawa GS, et al. *Beauveria* keratitis and biopesticides: case histories and a random amplification of polymorphic DNA comparison. *Cornea* 2010;29:152-8.
- 9) Figueira L, Pinheiro D, Moreira R, et al. *Beauveria bassiana* keratitis in bullous keratopathy: antifungal sensitivity testing and management. *Eur J Ophthalmol* 2012;22:814-8.
- 10) Oh JY, Lee MJ, Wee WR, Heo JW. A case of necrotizing sclerokeratitis and endophthalmitis caused by *Beauveria bassiana*. *Jpn J Ophthalmol* 2009;53:551-3.
- 11) Jun KR, Jang MS, Park SJ, et al. A case of *Beauveria bassiana* keratitis. *Korean J Clin Microbiol* 2007;10:73-6.
- 12) Hall L, Wohlfiel S, Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2004;42:622-6.
- 13) Thomas PA, Kaliyamurthy J. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:210-20.
- 14) Ferrer C, Alió JL. Evaluation of molecular diagnosis in fungal keratitis. Ten years of experience. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2011;1:15-22.
- 15) Kim SJ, Lee SB. Analysis on elderly inpatients with infectious keratitis: causative organisms, clinical aspects, and risk factors. *J Korean Ophthalmol Soc* 2010;51:1554-67.
- 16) Valencia JW, Gaitán Bustamante AL, Jiménez AV, Grossi-de-Sá MF. Cytotoxic activity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: an intraspecific evaluation of beauvericin production. *Curr Microbiol* 2011;63:306-12.
- 17) Guarro J, Gené J. *Acrophialophora fusispora* misidentified as *Scedosporium prolificans*. *J Clin Microbiol* 2002;40:3544; author reply 3545.
- 18) Thomas PA. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:730-97.

= 국문초록 =

유전자염기서열 분석에 의해 확진된 뷰베리아 바시아나 각막염

목적: 유전자염기서열분석을 통해 확진된 *Beauveria bassiana* 각막염 1예를 보고하고자 한다.

증례요약: 70세 남자환자가 1주일 전 나뭇가지에 수상한 이후 발생한 좌안의 안통과 시력저하를 주소로 내원하였다. 내원 시 좌안시력은 20/400이었고 세극등현미경검사상 각막 중심부 비측에 0.7×2.5 mm 크기의 선상상피 결손과 결손주변부 기질의 세포침윤이 관찰되었다. 미생물학적 검사를 위해 각막찰과를 시행하였고 초기 그람 염색, KOH 도말 검사 및 배양검사는 음성이었으나 반복된 각막찰과표본의 도말 검사에서 균사가 관찰되었다. 이후 진균 배양에서 *Beauveria* 균종이 의심되었으며 MicroSEQ[®] D2 large-subunit ribosomal DNA 진균 염기서열분석 키트에 의해 *Beauveria bassiana*가 최종 확진되었다. Natamycin 안약을 2시간마다 점안하였으나 지속된 상피결손과 기질 용해에 의한 데스메막류가 발생하여 영구 및 일시양막이식술을 동시에 시행하였고 amphotericin B 조제안약을 2시간마다 추가하여 점안하였다. 이후 재발의 양상이 없이 점진적인 호전을 보였다.

결론: 최근 진균 각막염의 빈도가 증가하고 있으며 유전자염기서열분석과 같은 분자생물학적 진단이 본 증례와 같이 드물게 발생하는 균종에 의한 진균 각막염의 진단과 예후의 향상에 도움이 될 수 있을 것이다.

〈대한안과학회지 2014;55(6):923-927〉