

분자생물학적 방법에 의한 *Trichophyton rubrum*의 동정 및 형별 판정

서울대학교 의과대학 피부과학교실

김정애 · 허창훈 · 문상은

=Abstract=

Identification and Subtyping of *Trichophyton rubrum* by Molecular Biological Methods

Jeong Aee Kim, Chang Hun Huh and Sang Eun Moon

Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: *Trichophyton rubrum* is one of the major pathogens causing dermatophytoses on human. The identification of this species by mycological methods are sometimes difficult and time-consuming. Moreover, suitable methods for subtyping of this species are not established yet.

Objective: This study was performed to identify and subtype *T. rubrum* by molecular biological methods.

Methods: Total 65 clinical isolates of *T. rubrum* were included and classified according to the results of 8 mycological tests. Their identification were done by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Subtyping of this species was performed by analyzing the DNA band patterns produced by amplifying the non-transcribed spacer (NTS) area of ribosomal DNA.

Results: The 65 strains of *T. rubrum* could be classified into 5 phenotypic varieties according to the results of mycological tests. All clinical isolates produced identical band pattern with those of standard strains of *T. rubrum* by RAPD analysis. Amplification of NTS area produced 13 PCR patterns.

Conclusion: The confirmative identification of *T. rubrum* could be done by RAPD analysis regardless of their phenotypic variations. Subtyping of *T. rubrum* was successfully performed by amplifying NTS area but these PCR patterns were not correlated with their phenotypic characteristics.

[Kor J Med Mycol 6(4): 219-228]

Key Words: *Trichophyton rubrum*, Identification, Subtyping, RAPD, Non-transcribed spacer

서 론

피부사상균은 사람과 동물의 피부, 모발 및 조각

†별책 요청 저자: 김정애, 156-707 서울시 동작구 신대방 2동 395번지, 보라매병원 피부과
전화: (02) 840-2190, Fax: (02) 831-0714
e-mail: jakim@snu.ac.kr

*본 논문은 2000년도 대한의진균학회 안센연구비의 보조를 받아 이루어졌음.

**본 논문의 요지는 2001년 6월 대한의진균학회 학술대회에서 발표되었음.

에 표제성 진균감염증을 일으키는 원인균이다. 이중 *Trichophyton (T.) rubrum*은 대표적인 인간친화성 피부사상균으로서 현재 우리나라를 포함하여 전 세계적으로 가장 만연하고 있고 있는 균종이다^{1,2}. 따라서 *T. rubrum*을 신속, 정확하게 동정하고, 더 나아가 *T. rubrum*으로 동정된 균주들을 서로 구별하기 위한 형별 판정법 (subtyping)을 개발하는 것은 피부사상균증의 역학 및 발병 기전에 대한 연구와 항진균제 내성 균주의 발견 등을 위하여 매우 중요하다고 할 수 있다^{3,4}.

피부사상균의 동정은 육안 및 현미경 하에서의 형태학적 관찰과 여러 가지 생리학적 실험을 통하여 쉽게 할 수 있다. 그러나 때로 이러한 진균학적 방법으로 동정이 어려운 경우가 있으며 특히 형별 판정을 하기 위한 적합한 진균학적 방법은 아직 개발되어 있지 않은 실정이다³. 이와 같은 문제점들을 해결하기 위하여 1990년대 초부터 피부사상균의 연구에 있어서도 분자생물학적인 연구 기법이 시도되고 있다. 그 결과 *T. rubrum*을 포함한 여러 피부사상균들의 균종 단계의 동정은 여러 방법에 의하여 성공되었으며, 계통 및 분류 분야에서도 많은 성과를 거두고 있다³⁻⁵. 그러나 피부사상균의 형별 판정은 일부의 연구에서만 성공을 하였으며³⁻⁷ 특히 *T. rubrum*의 경우는 대부분에 있어서 실패를 하였다³⁻⁵. 이는 *T. rubrum*이 인체 감염에 적합하게 진화가 되었으며 유전학적으로 매우 동질하기 때문으로 설명되고 있다⁸. 한편 최근 *T. rubrum* ribosomal DNA의 nontranscribed spacer (NTS) 부분에 반복적인 서열을 가지는 2개의 subunit 즉 TRS-1 (*T. rubrum* repeat subunit-1) 및 TRS-2가 있으며, 이 부분에서 다양한 유전형질을 관찰할 수 있었다는 보고가 있었다⁹⁻¹¹. 그러나 이러한 다양한 유전형이 어떤 임상적 또는 진균학적 의미가 있는지는 아직 밝혀지지 않았다.

본 연구는 *T. rubrum* 임상 분리주들의 특징을 진균학적으로 자세하게 검사하여 이들을 여러 아형으로 분류한 후, 분자생물학적 방법인 random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis^{7,12-14}를 이용하여 확정 동정을 하고 NTS 부분을 증폭하여^{10,11} 다양한 유전형이 관찰되는지를 알아보고자 시행하였다. 또한 연구 결과 관찰된 다양한 유전형을 진균학적으로 분류된 아형과 연관성을 지을 수 있는지 분석하여 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 균주

1) *T. rubrum* 임상 분리주

서울대병원 및 보라매병원 피부과의 환자로부터 분리, 배양하여 *T. rubrum*으로 동정된 65주 (TR1~TR65)를 대상으로 하였다.

2) 표준 균주

피부사상균 14종 17주를 대상으로 하였다. 특히 *T. rubrum*과 진균학적으로 밀접한 관계가 있어서 감염이 어려운 것으로 알려진 *T. raubitschekii*, *T. megninii*, *T. kanei* 및 *T. fischeri*를 포함하였다 (Table 1).

2. 임상 분리주의 진균학적 검사

임상 분리주 65주를 대상으로 다음의 8가지 진균학적 검사를 실시하여 표현형에 따른 아형의 분류를 실시하였다¹³.

1) Sabouraud dextrose agar (SDA)에서의 배양
SDA (Difco, USA)에 진균을 접종하여 25°C에서 3주간 배양하여 관찰하였다.

2) Potato dextrose agar (PDA)에서의 배양
PDA (Difco, USA)에 진균을 접종하여 25°C에서 3주간 배양하였으며, 특히 배지의 이면에서 *T. rubrum*에서 관찰할 수 있는 적색소의 유무를 살펴보았다.

3) 비타민 요구성 검사

비타민이 첨가되지 않은 Casamino acids agar (Trichophyton agar 1, Difco, USA)에 진균을 접종한 후 25°C에서 2주간 배양하여 균의 성장 여부를 관찰하였다. 성장이 될 경우는 비타민 요구성이 없는 것으로 판정하였다.

4) Urease 생성 검사

Urease 배지 (Christensen Urea agar, Difco, USA)에 진균을 접종한 후 25°C에서 1주 및 2주간 배양하여 관찰하였다. 배지의 색깔이 황색에서 분홍색으로 변하면 양성으로 하였다.

5) 온도에 대한 감수성 검사

Chloramphenicol 및 cycloheximide가 포함된 SDA (Mycobiotic agar, Difco, USA)에 진균을 접종하여 25°C와 37°C에서 2주간 배양을 한 후, 2가지 온도에서의 성장 속도를 비교하였다.

6) 모발 천공 검사

0.05% yeast extract 용액에 소독된 모발을 넣고 진균을 접종하여 25°C에서 배양하였다. 배양 1주와 2주 후에 모발을 꺼내어 췌기 모양의 perforating organ이 관찰되는 경우 이를 양성으로 하였다.

7) 현미경 하에서의 형태학적 관찰

PDA에 접종하여 25°C에서 2주간 배양한 후 lactophenol cotton blue로 염색하여 균사의 형태, 소분생자

Table 1. Reference strains of dermatophytes and their DNA bands (kbp) produced by RAPD analysis with primer OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3')

Species	Source	DNA bands (kbp)
<i>Trichophyton rubrum</i> 1	IFM 48102	1.50, 1.04, 0.74
<i>Trichophyton rubrum</i> 2	Clinical isolate*	1.54, 1.06, 0.75
<i>Trichophyton rubrum</i> 3	Clinical isolate*	1.54, 1.07, 0.76
<i>Trichophyton raubitschekii</i>	IFM 45577	1.52, 1.06, 0.76
<i>Trichophyton raubitschekii</i>	IFM 45579	1.52, 1.06, 0.76
<i>Trichophyton megninii</i>	CBS 551.86	1.50, 1.04, 0.74
<i>Trichophyton kanei</i>	CBS 289.86	1.50, 1.04, 0.74
<i>Trichophyton fischeri</i>	CBS 288.86	1.50, 1.04, 0.74
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	IFM 47707	1.49, 1.33, 0.87
<i>Trichophyton tonsurans</i>	IFM 47710	1.35, 0.98, 0.90
<i>Trichophyton equinum</i>	HMC 9014	1.47, 1.33, 0.95
<i>Trichophyton violaceum</i>	IFM 41075	1.86, 1.54, 1.09
<i>Trichophyton terrestre</i>	IFM 45102	1.82, 1.34, 1.27, 1.08, 0.63
<i>Microsporum canis</i>	IFM 48118	1.61, 0.82, 0.56
<i>Microsporum gypseum</i>	IFM 48117	1.52, 1.28, 1.19, 0.97
<i>Microsporum persicolor</i>	IFM 5319	1.07, 0.80
<i>Epidermophyton floccosum</i>	IFM 48119	1.86, 1.61, 1.44, 1.09, 0.87, 0.72, 0.54

IFM: Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan

CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

HMC: Hygiene & Microbiological Test and Research Center, Tokyo, Japan

*Isolates from skin lesions of patients in Taegu, Korea and identified by Prof. SB Suh

와 대분생자의 유무 및 형태를 관찰하였다.

8) Brain heart infusion agar (BHIA)에서의 배양
BHIA (Difco, USA)에 접종한 후 25°C에서 2주간 배양하여 균 집락이 반구형인지 또는 편평한 형태인지 관찰하였다. 또한 세균의 성장 여부를 관찰하여 적색소가 나타나지 않는 *T. rubrum* 균주가 세균의 오염에 의한 것인지 여부를 확인하였다.

3. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis

표준 균주 및 임상 분리주를 대상으로 저자들의 이전 논문에 기술된 방법^{7,12,13}을 다소 변형하여 시행하였다.

- 1) 균주의 순수 배양과 harvest
SDA 평판배지 위에 소독된 투석용 막을 놓고 진

균을 도말 접종하여 25°C에서 1~2주간 배양한 후 균 집락을 채취하였다.

2) 진균 DNA의 추출

채취한 진균에 600 µl의 lysis buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 w/v% SDS, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl)를 첨가하고 Pellet pestle (Kontes, New Jersey, USA)로 분쇄하였다. 이 혼합액에 300 µl의 3 M sodium acetate 용액을 첨가하여 100°C에서 15분간 증탕한 뒤 -20°C에서 60분간 보관하였다. 12,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상청액을 취하여 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 용액으로 처리하고 isopropanol로 DNA를 침전시켰다.

3) PCR

반응액은 주형 DNA 5 µl (50 ng), 10 mM dNTP mix (Perkin Elmer, USA) 4 µl, primer (20 pmol/µl) 1.25 µl,

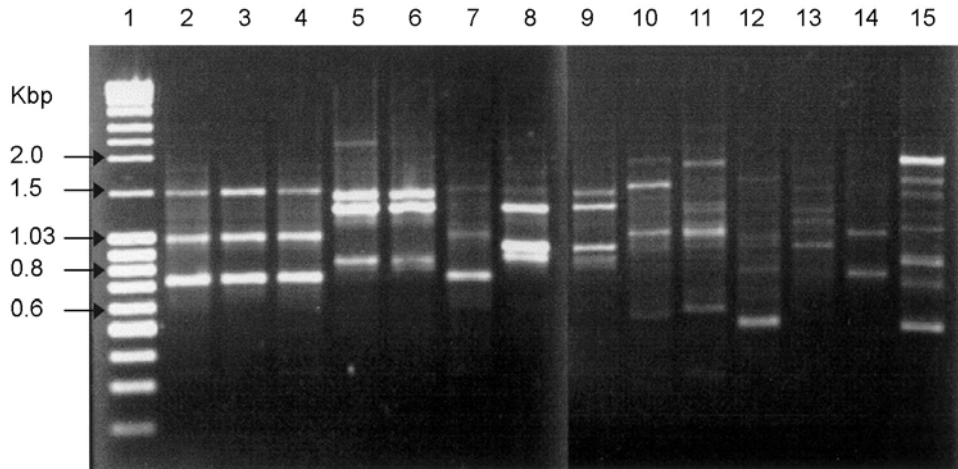


Fig. 1. DNA band patterns of reference strains of dermatophytes produced by RAPD analysis with primer OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3'). Lane 1, size marker; 2 to 4, *Trichophyton rubrum*; 5 & 6, *T. mentagrophytes*; 7, *T. raubitschekii*; 8, *T. tonsurans*; 9, *T. equinum*; 10, *T. violaceum*; 11, *T. terrestre*; 12, *Microsporum canis*; 13, *M. gypseum*; 14, *M. persicolor*; 15, *Epidermophyton floccosum*

10X PCR buffer 5 μ l, *Taq.* DNA polymerase (5 Unit/ μ l, Perkin Elmer, USA) 0.25 μ l 및 증류수 34.5 μ l를 포함하여 총 50 μ l로 하였다. PCR은 미국 MJ Research Inc.사의 thermal cycler를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성 후, 94 $^{\circ}$ C 1분, 34 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 2분을 1회로 하여 40회 시행한 뒤 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 적합한 random primer를 선정하기 위한 예비 실험에서는 OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3'), ATGS (5'-ATGGATC(GC)(GC)C-3') 및 ATG (5'-ATGGATCGGC-3'), 이상 Operon Technologies, USA)를 사용하여 PCR을 하였으며, 이중 OPAO-15를 사용할 때 모든 표준 균주에서 한 균주 당 2개 내지 7개 정도의 명확한 band가 생산되어 분석이 가장 용이하였으므로 이를 임상 분리주의 동정을 위한 primer로 선정하였다.

4) PCR 반응 산물의 분석

PCR 산물을 1.2% agarose gel에 분주하여 80 volt에서 80분간 전기 영동한 후 ethidium bromide로 염색하였다. Size marker로는 MassRulerTM DNA Ladder Mix (MBI Fermentas, U.S.A)를 사용하였고 image analyser (Vilber Lourmat, USA)로 DNA 절편의 크기를 측정하였다. 임상 분리주의 DNA band의 크기와 pattern을 표준 균주의 결과와 비교하여 균종을 동정하였다.

4. Ribosomal DNA nontranscribed spacer (NTS) 부위의 증폭

NTS 부분의 반복적인 서열을 가지는 2개의 sub-unit인 TRS-1과 TRS-2 부분을 증폭하기 위하여 Jackson 등이 제시한 방법을 다소 변형하여 실험하였다¹⁰. 진균의 DNA는 RAPD analysis를 위하여 추출한 DNA를 사용하였다.

1) TRS-1 부위의 증폭

TRS-1 부위를 증폭하기 위하여 다음의 2개의 primer pair를 사용하였다.

TrNTSF-2 (5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3')

TrNTSR-4 (5'-TGCCACTTCGAT TAGGAGGC-3')

반응액은 주형 DNA 3 μ l (30 ng), 10 mM dNTP mix (promega, USA) 1 μ l, 두가지 primer (20 pmol/ μ l) 각각 2 μ l, 10X PCR buffer 5 μ l, *Taq.* DNA polymerase (5 Unit/ μ l, Promega, USA) 0.25 μ l, bovine serum albumin 1 μ l 및 증류수 35.75 μ l를 포함하여 총 50 μ l로 하였다. PCR은 미국 MJ Research Inc.사의 thermal cycler를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 2분간 변성 후, 94 $^{\circ}$ C 0.5분, 55 $^{\circ}$ C 0.5분, 72 $^{\circ}$ C 3분을 1회로 하여 30회 시행한 뒤 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다.

2) TRS-2 부위의 증폭

TRS-2 부위를 증폭하기 위하여 다음의 2개의 pri-

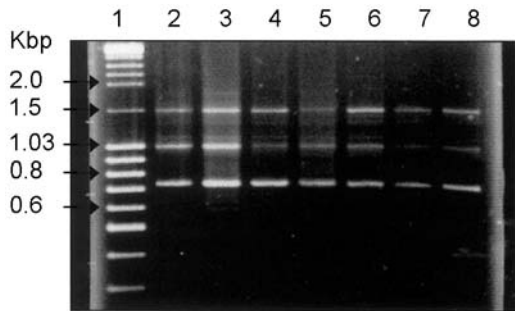


Fig. 2. DNA band patterns of reference strains of *T. rubrum* and related species produced by RAPD analysis with primer OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3'). Lane 1, size marker; 2 & 3, *Trichophyton rubrum*; 4 & 5, *T. raubitschekii*; 6, *T. megninii*; 7, *T. kanei*; 8, *T. fischerii*

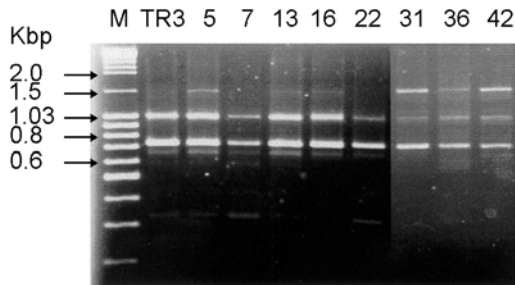


Fig. 3. DNA band patterns of clinical isolates *Trichophyton rubrum* with atypical phenotypes. Bands were produced by RAPD analysis with primer OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3'). TR7 & 13, *T. rubrum* var. colorless; TR5, 22 & 42, *T. rubrum* with diffusible pigment; TR3 & 16, *T. rubrum* with positive urease test; TR31 & 36, *T. rubrum* with granular surface.

mer pair를 사용하였다.

TrNTSR-1 (5'-CTCAGTC GAACCGTGAGGC-3')

TrNTSC-1 (5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3')

반응액은 bovine serum albumin을 첨가하지 않는 것을 제외하고는 TRS-1 부분을 증폭할 때와 동일하였으며, PCR은 94°C에서 1분간 변성 후, 94°C 0.5분, 55°C 0.5분, 72°C 2분을 1회로 하여 30회 시행한 뒤 72°C에서 10분간 반응시켰다.

3) PCR 반응 산물의 분석

PCR 반응 산물의 분석은 RAPD analysis의 경우와 동일한 방법으로 시행하였다. *T. rubrum* 임상 분리주 및 표준 균주의 TRS-1 부위와 TRS-2 부위의 증폭 결과를 DNA band pattern에 따라 분류하였으며, 다

Table 2. Classification of 65 clinical isolates of *Trichophyton rubrum* according to the results of 8 mycological tests

Subtypes	Number of strains
<i>T. rubrum</i> (typical)	56 (86.2%)
<i>T. rubrum</i> (var. colorless)	2 (3.1%)
<i>T. rubrum</i> with diffusible pigment	3 (4.6%)
<i>T. rubrum</i> with positive urease test	2 (3.1%)
<i>T. rubrum</i> with granular surface	2 (3.1%)
Total	65

시 이 두가지 분류를 조합하여 PCR 유형을 결정하였다.

결 과

1. 진균학적 검사 결과

T. rubrum 임상 분리주에 대한 진균학적 검사 결과를 종합하여 이들을 5개의 형태학적 아형으로 나눌 수 있었다 (Table 2). 전형적인 *T. rubrum*으로 동정된 56주는 cottony 내지 velvety한 표면을 가지고 있었으며 배지 뒷면에서 적색소가 관찰되었다. 또한 비타민 요구성이 없었고, urease 생성 검사 음성, 37°C에서 성장 가능, 모발 천공 검사 음성이었고 현미경 하에서는 구형 내지 난구형의 소분생자가 소수 관찰되었으며 BHIA에서는 반구형으로 성장하였다. 한편 *T. rubrum*의 아형으로 생각되는 균주가 9주 있었는데, 이들은 다른 진균학적 검사 결과는 전형적인 *T. rubrum*과 동일하였으나 2주 (TR7, TR13)는 배지의 뒷면에서 적색소가 관찰되지 않아 *T. rubrum* var. colorless로, 3주 (TR5, TR22, TR42)는 배지를 갈색으로 착색시키고 있어서 배지착색형 *T. rubrum* (*T. rubrum* with diffusible pigment)로 분류하였다. 한편 다른 2주 (TR3, TR16)은 urease 검사상 양성이었으며 또 다른 2주 (TR31, TR36)는 표면에서 분말이 관찰되어서 *T. rubrum*의 비전형적인 아형으로 분류하였다.

2. RAPD analysis에 의한 동정 결과

Primer OPAO-15을 이용하여 증폭한 결과 모든 표준 균주에서 특이한 DNA band pattern이 관찰되어

Table 3. PCR types of TRS-1 subrepeat of nontranscribed spacer area of *Trichophyton rubrum*. DNA bands were produced by amplification with primers TrNTSF-2 (5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3') and TrNTSR-4 (5'-TGCCACTTCGAT TAGGAGGC-3') in 65 clinical isolates of *T. rubrum*

TRS-1 types	Band size (bp)	No. of strains
Single band		
Type 1	434	30 (46.2%)
Type 2	634	17 (26.2%)
Type 3	834	5 (7.7%)
Type 4	1034	2 (3.1%)
Type 5	1234	3 (4.6%)
Multiple bands		
Type 6 (Type 1+2)	434, 634	2 (3.1%)
Type 7 (Type 1+3)	434, 834	1 (1.5%)
Type 8 (Type 1+2+3+4)	434, 634, 834, 1034	1 (1.5%)
Type 9 (Type 2+5)	634, 1234	1 (1.5%)
No band (Type 10)		3 (4.6%)
Total		65 (100%)

Table 4. PCR types of TRS-2 subrepeat of nontranscribed spacer area of *Trichophyton rubrum*. DNA bands were produced by amplification with primers TrNTSR-1 (5'-CTCAGTC GAACCGTGAGGC-3') and TrNTSC-1 (5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3') in 65 clinical isolates of *T. rubrum*

TRS-2 types	Band size (bp)	No. of strains
Type I	425	3 (4.6%)
Type II	502	59 (90.8%)
Type III	577	2 (3.1%)
Type IV	671	1 (1.5%)
Total		65 (100%)

이를 이용하여 각 균종을 동정할 수 있었다 (Table

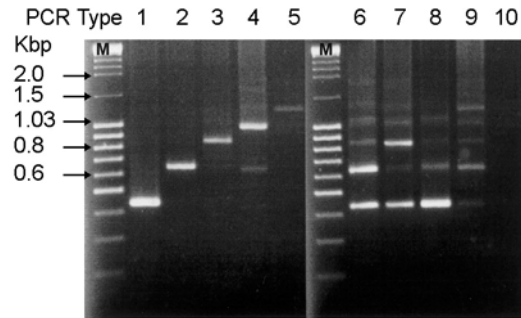


Fig. 4. PCR types of TRS-1 subrepeat of nontranscribed spacer area of *Trichophyton rubrum*. DNA bands were produced by amplification with primers TrNTSF-2 (5'-ACCGTATTAAGCTAGCGCTGC-3') and TrNTSR-4 (5'-TGCCACTTCGAT TAGGAGGC-3'). M; size marker.

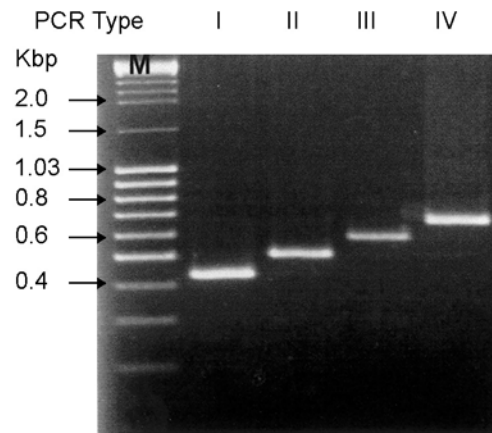


Fig. 5. PCR types of TRS-2 subrepeat of nontranscribed spacer area of *Trichophyton rubrum*. DNA bands were produced by amplification with primers TrNTSR-1 (5'-CTCAGTC GAACCGTGAGGC-3') and TrNTSC-1 (5'-CGAGACCACGTGATACATGCG-3'). M; size marker.

1, Fig. 1). 그러나 *T. raubitschekii*, *T. megninii*, *T. kanei* 및 *T. fischeri*는 모두 *T. rubrum*과 동일한 DNA band pattern이 관찰되어 이들을 구별할 수 없었다 (Fig. 1, 2). 임상 분리주에 대한 실험에서는 진균학적 표현형에 관계없이 65주 모두 *T. rubrum*의 표준 균주와 동일한 DNA band pattern을 보였다 (Fig. 3).

3. Ribosomal DNA NTS 부위의 증폭 결과

1) *T. rubrum* 임상 분리주의 TRS-1 부분 증폭

Table 5. PCR patterns of 65 clinical isolates of *Trichophyton rubrum* assigned by combination of PCR types of TRS-1 and TRS-2 subrepeats of ribosomal DNA nontranscribed spacer area

PCR pattern	TRS-1 type	TRS-2 type	No. of strains
A	1	II	29 (44.6%)
B	1	III	1 (1.5%)
C	2	II	13 (20%)
D	2	I	3 (4.6%)
E	2	III	1 (1.5%)
F	3	II	5 (7.7%)
G	4	II	2 (3.1%)
H	5	II	3 (4.6%)
I	6	II	2 (3.1%)
J	7	II	1 (1.5%)
K	8	II	1 (1.5%)
L	9	IV	1 (1.5%)
M	10	II	3 (4.6%)
Total			65 (100%)

TRS-1 부위의 증폭 결과 65주의 임상 분리주를 10개의 PCR type로 분류할 수 있었다 (Table 3, Fig. 4). 대부분의 임상 분리주 (57주, 87.7%)에서 1개의 DNA band가 증폭이 되었는데 증폭된 DNA band는 1개의 TRS-1 단위에 해당하는 크기인 약 200 bp의 차이를 두고 분포하고 있었다. 한편 5주의 임상 분리주에서는 2개 이상의 DNA band가 증폭이 되었고, 또 다른 3주에서는 PCR을 반복적으로 시행하여도 증폭이 전혀 되지 않았다.

2) *T. rubrum* 임상 분리주의 TRS-2 부분 증폭

TRS-2 부위의 증폭 결과 65주의 임상 분리주를 4개의 PCR type으로 분류할 수 있었다 (Table 4, Fig. 5). 모든 임상 분리주에서 1개의 DNA band만이 증폭이 되었으며 대부분의 균주에서 (90.8%) 502 bp 크기의 DNA band가 증폭이 되었다. 증폭된 DNA band는 1개의 TRS-2 단위에 해당하는 크기인 약 77 bp의 차이를 두고 분포하고 있었다.

3) TRS-1 및 TRS-2 부위의 PCR type을 조합하여 얻은 PCR 유형

Table 6. PCR patterns of standard strains of *Trichophyton rubrum* and related species assigned by combination of PCR types of TRS-1 and TRS-2 subrepeats of ribosomal DNA nontranscribed spacer area

Species and strain No.	PCR pattern	TRS-1	TRS-2
<i>T. rubrum</i> 1 (IFM 48102)	A	1	II
<i>T. rubrum</i> 2 (Clinical isolate*)	A	1	II
<i>T. rubrum</i> 3 (Clinical isolate*)	A	1	II
<i>T. raubitschekii</i> (IFM 45577)	C	2	II
<i>T. raubitschekii</i> (IFM 45579)	C	2	II
<i>T. megninii</i> (CBS 551.86)	C	2	II
<i>T. kanei</i> (CBS 289.86)	C	2	II
<i>T. fischeri</i> (CBS 288.86)	A	1	II

IFM: Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, Japan
 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands

*Isolates from skin lesions of patients in Taegu, Korea and identified by Prof. SB Suh

TRS-1 및 TRS-2 부위의 PCR type을 조합하여 *T. rubrum* 임상 분리주 65주를 13개의 PCR 유형으로 분류할 수 있었다 (Table 5). 이러한 PCR 유형은 *T. rubrum* 균주의 진균학적 특징에 따른 아형 분류와 연관성이 관찰되지 않았다.

4) *T. rubrum*의 표준 균주 및 유사 균종들의 NTS 부위 증폭 결과

*T. rubrum*의 표준 균주 및 *T. raubitschekii*, *T. megninii*, *T. kanei* 및 *T. fischeri*는 모두 *T. rubrum* 임상 분리주에서 관찰할 수 있는 PCR 유형을 가지고 있었으며 이를 Table 6에 요약하였다.

고 찰

피부사상균의 형태는 한가지 균종 내에서도 다양하며 배양 조건에 따라 달라질 수가 있고, 특히 계대 배양을 오래 할 경우는 용모 변성을 일으켜서 전형적인 모습을 상실하게 된다^{1,15,16}. 이와 같이 형태학적인 특징의 관찰만으로는 동정이 어려운 경우가 있으므로 urease 생성 검사, 모발 천공 검사 및 교배 실험과 같은 진균학적 검사를 시행하게 되는데 이러한 검사들은 시간이 오래 걸리며, 때로 검사를 실시한 후에도 동정이 확실하지 않을 수 있다¹⁴. 따라서 1990년대 초부터 피부사상균의 동정을 위하여 여러가지 분자생물학적 방법이 시도되어 왔으며 균종 단계 (species level)의 동정까지 이미 확립이 되어 있다. 이중 RAPD analysis 방법은 원인 진균의 염기서열을 모를 경우에도 적용할 수 있으므로 매우 편리하며, 2~3일 정도의 짧은 시간 내에 약 25종 정도의 피부사상균을 동정할 수 있다^{3-6,12-14,17}. 그러나 RAPD법은 random primer를 사용하고 annealing 온도를 40℃ 이하로 낮게 설정하여야 하므로 재현성의 확립이 중요하며, 다른 실험실간의 data를 서로 비교할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 근래에는 ITS1 (internal transcribed spacer 1) 부분의 염기서열 정보를 진균의 동정에 많이 이용하고 있다^{3-6,18-20}. 본 연구에서는 다양한 진균학적 특성을 가진 *T. rubrum* 임상 분리주에 대하여 RAPD analysis를 시행하여 본 결과, 이들의 DNA band pattern이 모두 *T. rubrum*의 표준 균주와 동일하였으므로 이들을 *T. rubrum*으로 확정 동정할 수 있었다. 이와 같이 분자생물학적인 방법은 비전형적인 소견을 나타내거나 특징적인 모습을 소실한 피부사상균의 동정에 특히 유용하다고 할 수 있다^{14,18}.

한편 피부사상균에 대한 분자생물학적인 방법에 의한 연구 결과가 축적되어 가면서 기존의 진균학

적인 방법에 의한 피부사상균의 계통 및 분류에 대하여도 재검토가 시도되었다^{3,21}. 본 연구에서 *T. raubitschekii*, *T. megninii*, *T. kanei* 및 *T. fischeri* 표준 균주들의 RAPD band pattern은 *T. rubrum*과 동일하였으며, NTS 부분의 증폭 결과도 이들 모두 *T. rubrum* 임상 분리주에서 관찰되는 PCR 유형 중 하나를 가지고 있었다. 즉 본 연구의 결과로는 *T. rubrum*과 그 유사 균종인 *T. raubitschekii*, *T. megninii*, *T. kanei* 및 *T. fischeri*의 유전형질 RAPD analysis 및 NTS 부분의 증폭을 통하여 구별할 수가 없었다. Gräser 등은 최근 *T. rubrum*, *T. violaceum* 및 이들의 유사 균종 (*T. raubitschekii*, *T. fischerii*, *T. kanei*)를 포함하여 총 15균종 및 변종)에 대하여 ITS 부분의 염기서열을 분석한 결과 이들을 모두 *T. rubrum*이나 *T. violaceum*에 포함시킬 수 있었다고 보고하였다²². 그러나 Summerbell 등은 *T. rubrum*과 유사 균종들의 ITS 부분의 염기서열을 분석하여 본 결과, *T. rubrum*의 염기서열은 *T. raubitschekii*, *T. fischeri* 및 *T. kanei*의 염기서열과 동일하였고, *T. soudanense* 및 *T. megninii*의 염기서열과는 거의 동일함을 발견하였지만 이들 균종들의 생태학적인 특징이 서로 매우 다르기 때문에 이들을 계속하여 독립된 균종으로 유지시켜야 한다고 주장하였다²³. 이와 같이 형태학적 또는 생태학적으로 뚜렷한 차이점이 있는 균종들의 유전형질이 동일하다고 밝혀진 경우 이들을 하나의 균종으로 통합하여야 할지, 아니면 서로 다른 균종으로 유지시켜야 할지는 아직 확실하지 않으며 이에 대하여 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다³.

어떤 원인균에 대하여 역학적 연구를 수행하기 위한 전제 조건은 같은 균종 내에 속하는 서로 다른 균주를 감별할 수 있는 방법이 확립되어 있어야 한다는 것이다. 따라서 많은 연구자들이 피부사상균의 형별 판정법을 개발하기 위하여 노력하여 왔으며 최근 피부사상균 중 유전형질이 가장 동질한 것으로 알려진 *T. rubrum* 및 *T. mentagropytes* var. *interdigitale*에서도 형별 판정에 성공하였다는 보고가 있다^{3-5,11}. 특히 Jackson 등은 *T. rubrum*의 NTS 부분을 증폭한 후 RFLP (restriction fragment length polymorphism)를 실시하여 14개의 서로 다른 DNA band pattern을 관찰할 수 있었으며⁹ *T. rubrum*의 NTS 부분에서 증폭하여 나타나는 염기서열, 즉 TRS-1 및 TRS-2 부

위를 증폭하여 101개의 *T. rubrum* 임상 검체에서 23개의 DNA pattern을 관찰할 수 있었다¹⁰. 또한 DNA pattern 별로 검출 빈도가 달랐다고 하는데 검출 빈도가 높은 균주들은 숙주에 대한 적응력이 높고 이는 균주의 독성이나 감염력과 관계가 있을 것으로 추측하여 볼 수 있으나 이러한 연관성을 확인하지는 못하였다. 본 연구에서도 *T. rubrum*의 NTS 부분을 증폭하여 13개의 PCR band pattern을 관찰할 수 있었는데 이러한 band pattern은 *T. rubrum* 균주의 진균학적 특징에 의하여 분류한 아형과는 연관성이 관찰되지 않았다. Ribosomal DNA의 NTS 부분의 기능에 대하여는 아직 알려진 바가 없으나 NTS 부분이 진균의 표현형에는 관여하지 않을 것으로 생각이 된다. 향후 *T. rubrum*의 NTS 부분에서 유전적인 다양성이 나타나는 기전에 대하여는 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

결 론

본 연구에서는 환자에서 분리된 65주의 *T. rubrum*에 대하여 8가지의 진균학적인 검사를 실시하여 이들의 표현형을 5가지의 아형으로 나누었다. 이 균주들은 표현형에 관계없이 RAPD analysis에 의하여 *T. rubrum*의 표준 균주와 동일한 DNA band pattern을 나타내어 *T. rubrum*으로 확정 동정을 할 수 있었다. 한편 *T. rubrum*의 ribosomal DNA의 NTS 부분을 증폭하여 13가지의 PCR band pattern을 관찰하여 이 균의 형별 판정에 성공하였다. 그러나 이러한 PCR band pattern은 대상 균주의 표현형과는 어떤 유의한 관계가 관찰되지 않았으며 이는 NTS 부분이 진균의 표현형에는 관여하지 않는 부분이기 때문으로 생각되었다. 또한 본 연구에서는 *T. rubrum*과 매우 유사한 균종으로 알려진 *T. raubitschekii*, *T. megninii*, *T. kanei* 및 *T. fischeri*에 대하여 RAPD analysis 및 NTS 부분의 증폭을 실시하여 보았다. 이들의 RAPD band pattern은 *T. rubrum*과 동일하였으며, NTS 부분의 증폭 결과도 *T. rubrum*의 여러 가지 PCR pattern 중 한 가지로 분류할 수 있었다. 따라서 이들 균종들은 *T. rubrum*과 동일한 진균일 가능성이 높은 것으로 생각되었다. 본 연구에서 확립한 *T. rubrum*의 분자생물학적 방법에 의한 동정 및 형별 판정은 향후 피부사상

균종의 역학적 연구 및 발병 기전에 대한 연구, 항진균제에 대한 내성 균주의 발견 등에 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Kane J, Summerbell R, Sigler L, et al. Laboratory Handbook of Dermatophytes. Belmont: Star Publishing Co., 1997, 120-125, 158-164.
2. 서순봉. 우리나라의 피부사상균증과 원인균의 변천. 의진균지 1996; 1: 1-10
3. Kac G. Molecular approaches to the study of dermatophytes. Med Mycol 2000; 38: 329-336
4. Ellis D, Marriott D, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. Med Mycol 2000; 38 (suppl 1): 173-182
5. Howell SA, Barnard RJ, Humphreys F. Application of molecular typing methods to dermatophytes species that cause skin and nail infections. J Med Microbiol 1999; 48: 33-40
6. Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophytes strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Clin Microbiol 1999; 37: 920-924
7. Kim JA, Takahashi Y, Tanaka R, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M. Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. Mycoses 2001; 44: 157-165
8. Gräser Y, Kühnisch J, Presber W. Molecular markers reveal exclusively clonal reproduction in *Trichophyton rubrum*. J Clin Microbiol 1999; 37: 3713-717
9. Jackson CJ, Barton RC, Evans EGV. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol 1999; 37: 931-936
10. Jackson CJ, Barton RC, Kelly S, Evans EGV. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. J Clin Microbiol

- 2000; 38: 4527-4534
11. Jackson CJ. Molecular identification and strain typing of dermatophyte fungi. *Jpn J Med Mycol* 2001; 42: 7-10
 12. Kim JA, Takizawa K, Fukushima K, et al. Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by random amplified polymorphic DNA. *Mycopathologia* 1999; 145: 1-6
 13. Kim JA, Norma BG, Kaoru O, et al. Identification of *T. tonsurans* by random amplified polymorphic DNA. *Ann Dermatol* 1999; 11: 135-141
 14. 김정애, 김상덕, 문상은 등. 진균학적 검사 및 random amplified polymorphic DNA analysis에 의한 피부사상균의 동정과 미동정 원인에 대한 분석. *대피지* 2001; 39: 168-175
 15. 박용묘, 최종수, 김기홍. Potato dextrose agar에서 배양된 수종 백선균의 육안적 및 현미경 소견. *대피지* 1991; 29: 364-376
 16. 김기홍, 문병천, 최종수. 대구지역 백선 환자에서 분리된 *Trichophyton* 속의 진균학적 성상 및 아형의 분류. *의진균지* 1997; 2: 129-143
 17. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. Molecular de-termination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Brit J Dermatol* 1997; 137: 351-355
 18. Mchizuki T, Kawasaki M, Ishizaki H, Makimura K. Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS1) in nuclear ribosomal DNA. *J Dermatol* 1999; 26: 276-281
 19. 서무규, 김병천, 김정철. Internal transcribed spacer 1 부위의 염기서열 분석을 통한 피부사상균의 계통발생 및 분류. *대피지* 2000; 38: 1186-1193
 20. 김정애, 임종현, 문상은, 김규환. 조광현. 애완동물로부터 감염된 환자 및 애완동물에서 분리된 *Trichophyton mentagrophytes*의 internal transcribed spacer 1 (ITS1) 염기서열 분석. *대피지* 2001; 39: 1086-1093
 21. Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De Hoog GS. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. *Med Mycol* 1999; 37: 315-330
 22. Gräser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3329-3336

23. Summerbell RC, Haugland RA, Li A, Gupta AK.
rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. J Clin Microbiol 1999; 37: 4005-4011