Malassezia 효모균 동정을 위한 Multiplex PCR 기법 개발과 평가

중앙대학교 의과대학 피부과학교실[1], 중앙대학교 약학대학[2], 중앙대학교 의과대학 응급의학과[3]

김형미[1] · 임윤영[1] · 박은주[1] · 천영진[2] · 김명남[1] · 김범준[1] · 이동훈[3]

= Abstract =

The Development and Evaluation of Multiplex PCR Technique for Identification of *Malassezia* Yeast

Hyeong Mi Kim[1], Yun Young Lim[1], Eun Joo Park[1], Young Jin Chun[2], Myeung Nam Kim[1], Beom joon Kim[1] and Dong Hoon Lee[3]

Department of Dermatology, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea[1]
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul, Korea[2], Department of Emergency Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, Seoul, Korea[3]

Background: *Malassezia* yeasts as major pathogenic fungi causes the common skin diseases including dandruff, psoriasis, seborrheic dermatitis and atopic dermatitis etc. various molecular techniques were developed to identify and classify the *Malassezia* species until now. But, these methods were discovered the problems. So, the development of the better molecular methods required to identify and classify of *Malasseiza* species.

Objective: We sought to develop of molecular techniques to identify and classify of six *Malassezia* species (*M. restricta*, *M. globosa*, *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*).

Methods: We designed primers about ITS1 (Internal transcribed space 1) region that were well-known region useful to identify of *Malassezia* species. Because, ITS1 region that is located between 18S and 5.8S rDNA of ribosomal DNA was comparatively mutated quickly. The mono PCR using ITS1 primers was performed to confirm the specificity of ITS1 primers with six *Malassezia* standard strains. Then, *Malassezia* Multiplex detection kit was developed on the basis of technique using ITS1 regions. *Malassezia* Multiplex detection kit was used to perform multiplex PCR with six *Malassezia* standard strains and clinical isolates.

Results: The results of mono PCR using ITS1 primers about six *Malassezia* standard strains was detected each *Malassezia* standard strains. Also, the multiplex PCR using developed *Malassezia* Multiplex detection kit was confirmed to classify about six *Malassezia* standard strains and clinical isolates.

Conclusion: In this study, we verified that six *Malassezi*a yeasts was classified using *Malassezia* Multiplex detection kit from *Malasszia* standard strains and clinical isolates. And we anticipate that *Malassezi*a Multiplex detection kit is able to do accurate diagnosis about six *Malassezia* yeasts (*M.*

접수일: 2010년 6월 5일, 수정일: 2010년 6월 5일, 최종승인일: 2010년 6월 5일
†별책 요청 저자: 김범준, 140-757 서울시 용산구 한강로 3가 65-207, 중앙대학교 용산병원 피부과
전화: (02) 748-9573, Fax: (02) 797-39573, e-mail: beomjoon@unitel.co.kr
*본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업(A080065)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

restricta, *M. globosa*, *M. furfur*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. obtusa*).
[Kor J Med Mycol 2010; 15(2): 51-60]

Key Words: *Malassezia*, ITS1, Multiplex PCR

서 론

비듬의 주요 원인균인 *Malassezia* 효모균은 피부에 정상적으로 존재하는 정상 균주이며, 건강한 성인의 약 75~98% 정도에서 검출되고 있다. *Malassezia* 효모균은 정상인의 비듬 이외에도 지루피부염 (seborrheic dermatitis), 모낭염 (*Malassezia folliculitis*), 어루러기 (pityriasis versicolor) 등 다양한 피부질환과 연관되고, 비듬으로 인한 치료나 관리가 필요한 경우는 정상성인의 약 15~30% 가량으로 추정한다. 특히 과도한 비듬이 특징인 지루피부염의 경우, 전체 인구의 약 1~3% 정도에서 발생하는 것으로 알려져 있다[2,3].

현재 *Malassezi*a 비듬균은 현재 7종 이상이 알려져 있으며, 신체 부위에 따라 서로 다른 효모균이 검출되며 이에 따른 피부질환도 다르게 나타난다. 외국의 경우, 가장 흔한 *Malassezia* 비듬균이 *Malassezia globosa*로 보고되었으나 한국의 경우에는 *Malassezia globosa* 이외에도 *Malassezia restricta*도 또한 흔한 비듬균으로 추정하고 있다. 그러나 전 세계적인 연구 추세를 보면 비듬 발생에 가장 중추적 역할을 하는 균주로써는 *Malassezia globosa*로 예상하고 있으며, 이는 두피 비듬 형성에 관여하는 지방 분해 효소인 lipase 활성도가 *Malassezia globosa*에서 가장 높고 실제로 인체의 두피조직에서 발현된다는 점으로 그 이유를 설명할 수 있다. 그러므로 한국인에서 가장 흔한 비듬균이 *Malassezia restricta*인지 *Malassezia globosa*인지 명확히 확인할 필요가 있으며, 이를 바탕으로 정확한 비듬균 진단이 가능하게 됨으로써 우리나라도 또한 비듬균 연구를 선진국 수준으로 올릴 수 있고, 향후 비듬균 제품의 개발과 연구에 경쟁력을 갖출 수 있다.

현재까지 *Malassezi*a를 동정하고 분류하는 분자생물학적인 방법은 polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), PCR-RFLP[5,11], pulsed field gel electrophoresis (PFGE), amplificated fragment length polymorphism (AFLP)[13], denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)[13], random amplification of polymorphic DNA (RAPD)[13], single strand conformation polymorphism (SSCP), terminal fragment length polymorphism (tFLP)의 9개 방법이 이용 가능하다[5]. 그러나 이 방법들의 경우 검체를 이용한 배양이 어려우며, 배양에서 검사 결과를 확인하기까지 상당한 시간이 소요된다. 예를 들어, PCR의 경우에는 다양한 primers를 제작하여 사용하면 일부 비특이적인 반응이 일어나는 등의 *Malassezia* 검출에 있어서 많은 한계점을 가지고 있다[4,7].

따라서 본 과제의 위탁 연구 기관인 (주)씨젠은 본 과제와 상당한 유사성을 보이는 기술을 개발하여 상업화한 경험을 가지고 있고, 많은 유사성을 가진 제품인 Seeplex® Candida ID Set (Cat.No. CA1410Z, Seegene, Inc.)을 사용한 병원과 공동으로 논문화하였다[1]. 그 기술을 바탕으로 하여 기존 *Malassezia* 검출에 한계가 있던 부분을 해결한 *Malassezia* Multiplex detection kit (이하 multiplex PCR kit)를 개발하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1) *Malassezia* 효모균의 표준균주 (Standard strains)

본 연구에서 사용한 *Malassezia* 효모균의 표준균주는 *M. globosa* (KCTC 7846), *M. restricta* (KCTC 7848), *M. slooffiae* (KCTC 17431), *M. sympodialis* (KCTC 7985), *M. furfur* (KCTC 7743), *M. obtusa* (KCTC 7847) 총 6종으로써, 모두 한국

생명공학연구원에서 분양받았다[2,3].

2) 임상분리균주 (Clinical isolates)

임상분리균주는 대부분 Swab을 통해 *Malassezia* 효모균을 채취하였고, 일부는 모근에서 얻었다. 면봉에 있는 *Malassezia*에서 직접 이용하거나 배지에 배양한 후, *Malassezia* DNA을 추출하였다.

2. 방법

1) *Malassezia* 효모균의 배양

Leeming과 Notman (LNA) 배지를 이용하여 *Malassezia*를 배양하였다[14,15]. 배지조성은 증류수에 0.05% w/v glycerol monoesterate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Japan), 1% w/v peptone (Duchefa Biochemie B.V., Netherlands), 0.5% w/v glucose (Sigma-Aldrich, Japan), 0.01% w/v yeast extract (Duchefa Biochemie B.V., Netherlands), 0.4% ox bile (Merck, Germany), 1.5% w/v agar (BD Bioscience, U.S.A.), 0.05% v/v Tween 60 (Sigma-Aldrich, Japan), 0.1% v/v glycerol (MP Biomedicals, U.S.A)을 넣고 잘 녹인 후, 121℃에서 20분간 멸균 소독하였다. 멸균 후, chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Japan) 50 mg/L을 첨가하였다. 잘 혼합한 후, petri dish에 분주하고 사용 시까지 냉장 보관하였다. *Malassezia* 효모균의 표준균주와 임상분리균주를 배지에 접종한 후, 32℃에서 2주간 배양하였다.

2) 임상시료와 임상분리균주에서의 DNA purification

임상시료에서 직접적으로 DNA을 추출할 때는 CTAB method를 이용하고, 임상시료에서 *Malassezia* 효모균을 배양한 후, 배양한 균에서 DNA을 추출할 때는 i-genomic BYF DNA extraction mini kit (Intron)을 이용하였다[7].

CTAB method는 CTAB buffer (5% CTAB (Sigma), 700 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 5% 2-mercaptoethanol)을 시료에 첨가하여 3분간 균질기를 이용해 분쇄하였다. 이후, CTAB buffer를 더 첨가하여 65℃에서 30분간 incubation하였다. Chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v:v)을 첨가한 후, 실온에서 8,000 xg로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 분리하였다. 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 다시 실온에서 8,000 xg로 10분간 원심분리를 하여 DNA을 침전시켰다. 침전물을 washing buffer (76% ethanol, 10 mM ammonium acetate)로 wash하여 실온에서 8,000 xg로 10분간 원심분리를 통해 DNA을 다시 침전시켰다. 침전물을 완전히 건조시킨 다음, 멸균 증류수를 첨가하여 용해시켰다.

i-genomic BYF DNA extraction mini kit (Intron)는 MYP buffer과 β-mercaptoethanol에 배양한 균을 넣고 30초간 voltexing한다. 이후 37℃ waterbath

Table 1. *Malassezia* yeast used as standard strains

Species	Standard strains	Size of multiplex PCR products*
M. globosa	KCTC 7846	195 bp
M. restricta	KCTC 7848	300 bp
M. slooffiae	KCTC 17431	360 bp
M. sympodialis	KCTC 7895	500 bp
M. furfur	KCTC 7743	632 bp
M. obtusa	KCTC 7847	725 bp

KCTC, Korean Collection for Type Cultures; *PCR products size in *Malassezia* Multiplex detection kit (Internal control: 899 bp)

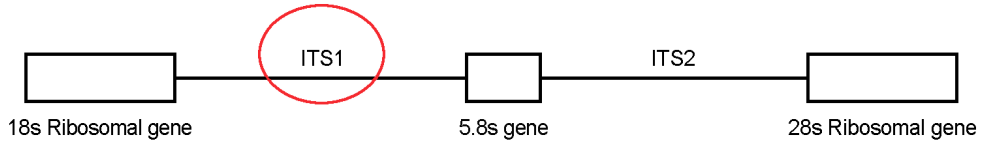


Fig. 1. Preparation of oligonucleotide primers for ITS1 region in *Malassezia* species. *Malassezia* Multiplex detection kit is a technique using ITS1 region between 18S rDNA and 5.8S rDNA in *Malassezia* species.

에서 15분 동안 incubation시킨 다음, 13,000 rpm에서 30초 동안 원심분리를 한다. 상층액을 버린 후, MP buffer와 lyticase를 첨가하고 30초간 voltexing한다. 또 다시 37℃ waterbath에서 15분 동안 incubation시킨 다음, 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리를 한다. 상층액을 버린 후, MG buffer, Proteinase K와 RNase A solution을 첨가하여 voltexing한다. 65℃ waterbath에서 30분 동안 incubation하고, 95℃ heating block에서 10분 동안 incubation한다. MB buffer를 첨가하여 inverting한다. 이후 80% ethanol를 넣어 inverting한다. 이 mixtures를 Spin column에 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 한다. Spin column을 새로운 2 ml collection tube에 옮기고 나서 MW buffer를 넣

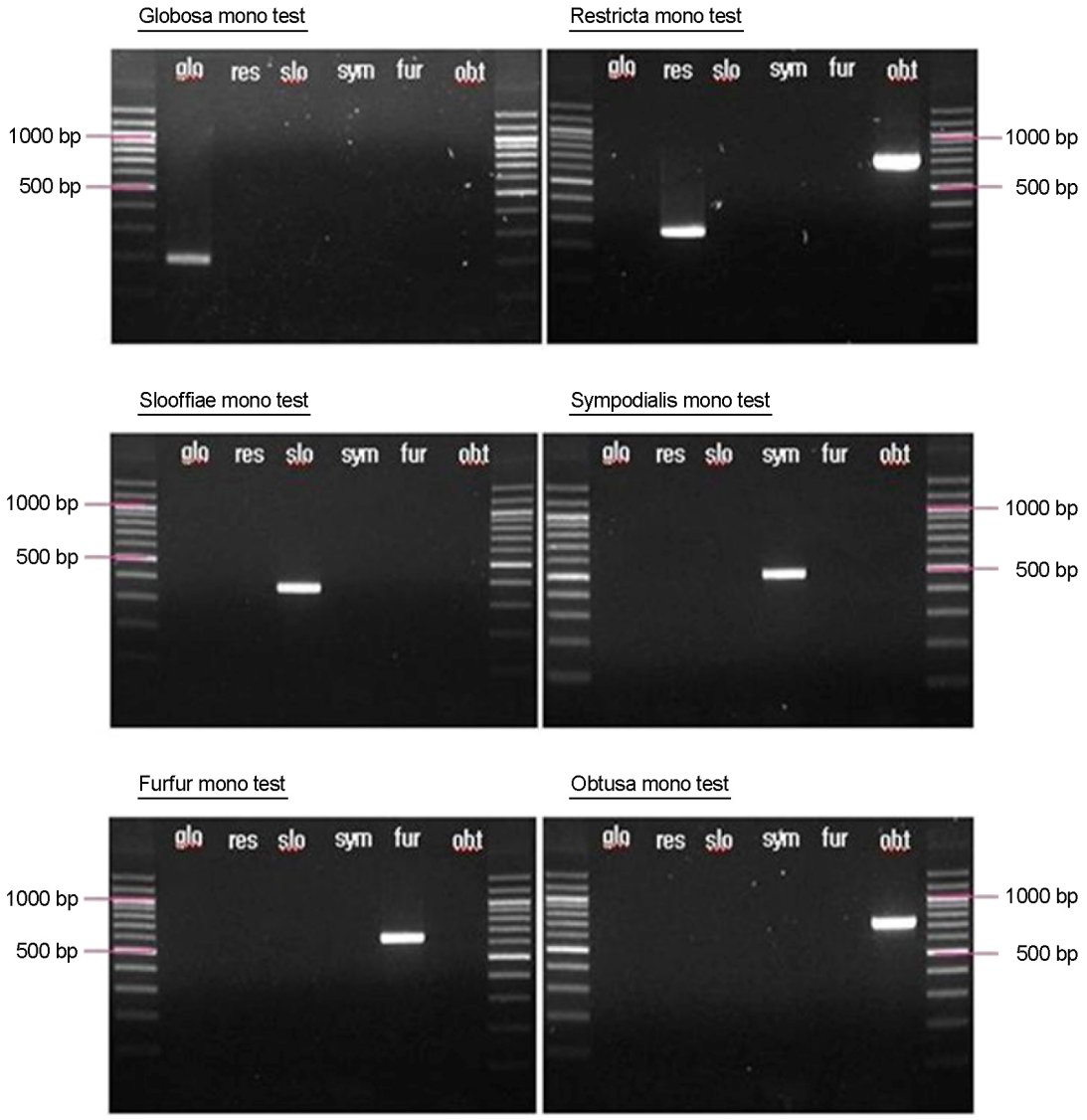


Fig. 2. Mono PCR products for 6 standard strains of *Malassezia* species. The specificity of designed ITS1 primers confirmed by mono PCR for *Malassezia* standard strains (*M. globosa*: 195 bp; *M. restricta*: 300 bp; *M. slooffiae*: 500 bp; *M. furfur*: 632 bp; *M. obtusa*: 725 bp).

어 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 한 후, 남아있는 ethanol를 제거하기 위해 13,000 rpm에서 1분간 더 원심분리를 한다. 새로운 1.5 ml tube에서 column을 옮긴 후, ME buffer를 넣어 상온에서 1분 동안 incubation한다. 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 하여 elution한다.

CTAB method와 i-genomic BYF DNA extraction mini kit (Intron)에서 얻은 total DNA는 ITS1 PCR에 이용하였다.

3) *Malasseiza* 효모균의 표준균주에 대한 ITS1 primer design

Malassezia 6종의 Ribosomal DNA (rDNA)의 ITS1 (internal transcribed spacer 1) 부분에서 PCR primer를 제작하였다. 18S와 5.8S rDNA사이에 존재하는 ITS1는 noncoding 부위로써, 길이는 162~266 bp 정도이다. 이 부위는 nuclear ribosome gene의 coding 부위보다 변이가 심하여 각 균주별로 sequencing 분석을 통해 *Malassezia* 동정이 가능하기 때문에 선택하게 되었다[2~4,6]. ITS1 primers를 이용하여 *Malasseiza* 6균주 (*M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. furfur*, *M. obtusa*)에 대해 각각의 PCR을 수행하여 ITS1 region을 잘 인식하는지 시험하였다.

4) *Malassezia* 효모균에 대한 multiplex PCR

개발한 *Malassezia* Multiplex detection kit의 PCR 조성은 total 20 μl으로 5× primer, 2× master

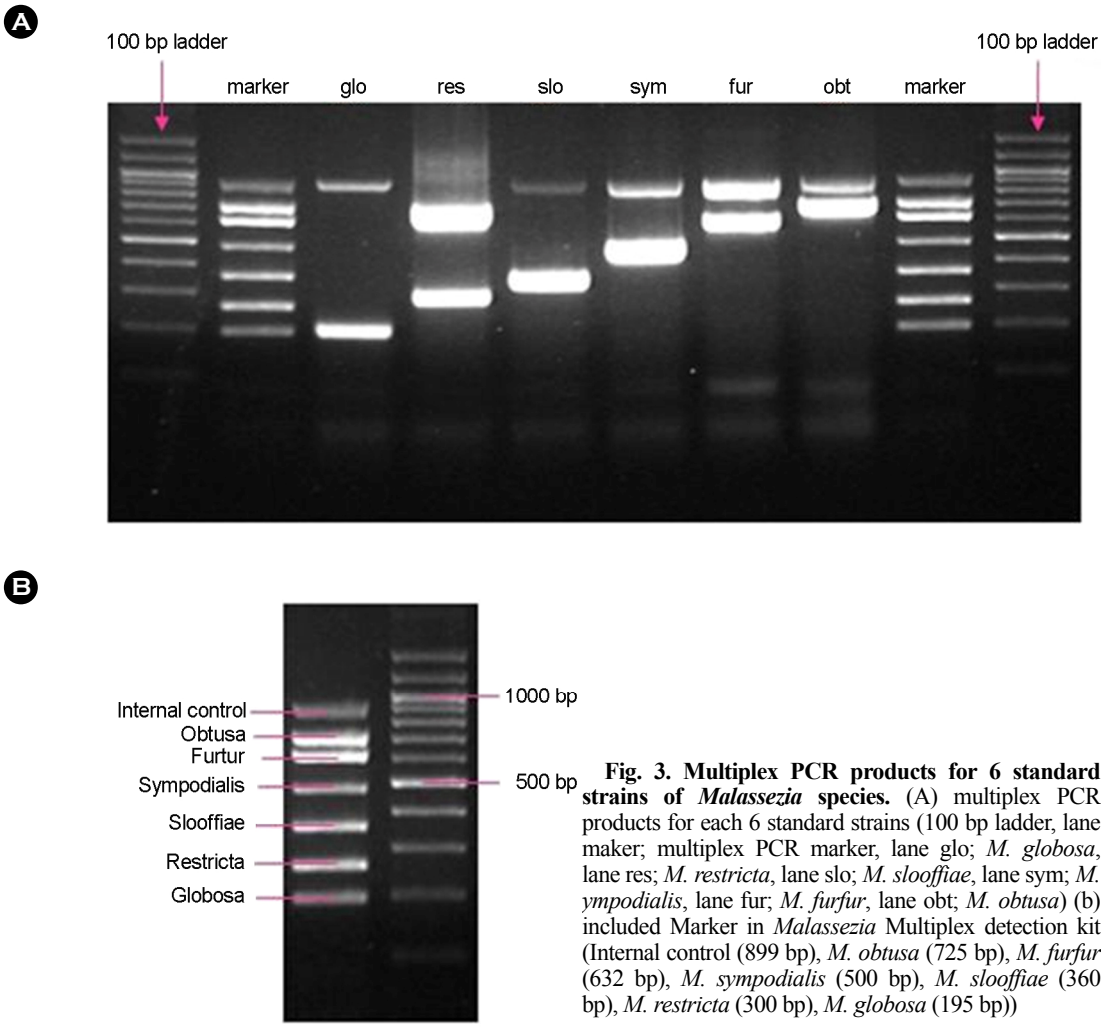


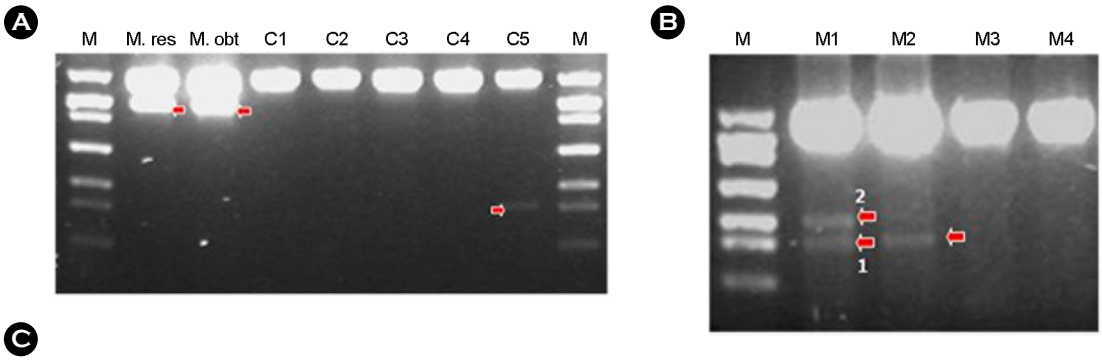
Fig. 3. Multiplex PCR products for 6 standard strains of *Malassezia* species. (A) multiplex PCR products for each 6 standard strains (100 bp ladder, lane maker; multiplex PCR marker, lane glo; *M. globosa*, lane res; *M. restricta*, lane slo; *M. slooffiae*, lane sym; *M. ympodialis*, lane fur; *M. furfur*, lane obt; *M. obtusa*) (b) included Marker in *Malassezia* Multiplex detection kit (Internal control (899 bp), *M. obtusa* (725 bp), *M. furfur* (632 bp), *M. sympodialis* (500 bp), *M. slooffiae* (360 bp), *M. restricta* (300 bp), *M. globosa* (195 bp))

mix, *Malassezia*에서 얻은 nucleic acid이다. 반응 조건은 pre-denaturation 단계 94℃에서 15분, denaturation 단계 94℃에서 30초, annealing 단계 68℃에서 1분, 72℃에서 40초간 extension을 40회 반복하였고 마지막 extension은 72℃에서 10분간 시행하였다. 증폭된 PCR product는 TAE buffer상에서 1% agarose gel에 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 확인하였다. 증폭된 PCR product 길이는 internal control (899 bp), *M. obtusa* (725 bp), *M. furfur* (632 bp), *M. sympodialis* (500 bp), *M. slooffiae* (360 bp), *M. restricta* (300 bp), *M. globosa* (195 bp)이다.

결 과

1. ITS1 region에 특이적인 primers의 제작과 특이성을 확인하기 위한 mono PCR 결과

Malassezia 6종의 Ribosomal DNA (rDNA)의 ITS1 (internal transcribed spacer 1) 부분에서 PCR primer를 제작하였다 (Fig. 1). 이 부분은 nuclear ribosome gene의 coding 부위보다 변이가 심하여 각 균주별로 sequencing 분석을 통해 *Malassezia* 동정이 가능하기 때문에 선택하게 되었다. 제작된 ITS1 primers로 KCTC에서 분양받은 6균주의 *Malassezia* standard strains (Table 1)에 대한 ITS1



C

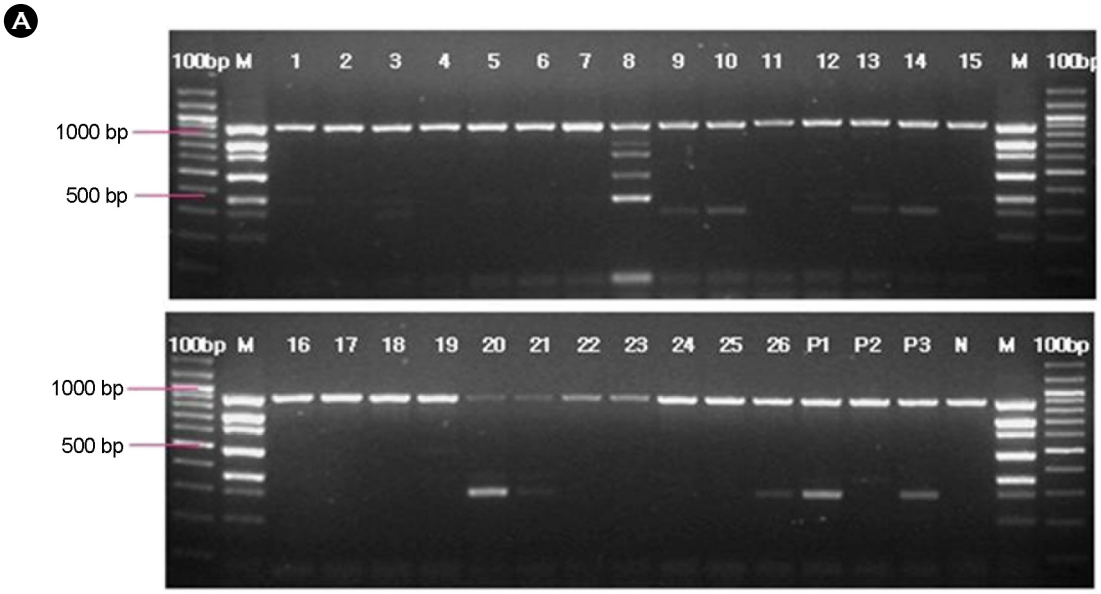
Sample name	Sample type	PCR results	Sequencing results (accession NO. from NCBI)
M. restricta	Media culture	*M. obtusa*	AY387138.1
M. obtusa	Media culture	*M. obtusa*	AY387138.1
C1	Media culture	-	-
C2	Media culture	-	-
C3	Media culture	-	-
C4	Media culture	-	-
C5	Media culture	*M. restricta*	EU400587.1
M1	Medical sample	(band1) *M. restricta*, (band2) *M. slooffiae*	(band1) EU400587.1, (band2) EU915458.1
M2	Medical sample	*M. restricta*	EU400587.1
M3	Medical sample	-	-
M4	Medical sample	-	-

Fig. 4. Sequence analysis of Multiplex PCR products for clinical isolates. (A), (B) The PCR product of Multiplex PCR for *Malassezia* yeasts as standard strains, media culture samples and medical samples (red arrows: these PCR products was performed sequencing analysis; M: included Marker in *Malassezia* Multiplex detection kit) (C) sequencing analysis for PCR product of Multiplex PCR (−: no detected)

PCR을 각각 수행하였다. 그 결과, 균주별로 ITS1 region을 특이적으로 인식하는 것을 확인하였다 (Fig. 2). *M. restricta*의 경우는 *M. obtusa*가 오염되어 있는 것을 발견하였다.

2. Multiplex PCR kit를 이용한 *Malassezia* standard strains과 clinical samples에 대한 PCR 결과

분양받은 6가지의 *Malassezia* standard strains으



B

Samle	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M. obtusa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M. furfur	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M. sympodialis	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M. slooffiae	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
M. restricta	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
M. globosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Samle	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	P1	P2	P3
M. obtusa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. furfur	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. sympodialis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. slooffiae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M. restricta	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
M. globosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Fig. 5. Multiplex PCR products for clinical isolates. The applications of Multiplex PCR kit for clinical isolates as medical samples (A) PCR products of Multiplex PCR kit for clinical samples (B) the analysis of PCR products of Multiplex PCR kit for clinical samples (No.1~26: clinical samples (hair root); P1~P3: samples of psoriasis patients; N: negative control; M: 100 bp marker)

로 *Malassezia* Multiplex PCR kit를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 3). 증폭된 PCR products의 길이는 mono PCR과 마찬가지로, *M. obtusa*는 725 bp, *M. furfur*는 632 bp, *M. sympodialis*는 500 bp, *M. slooffiae*는 360 bp, *M. restricta*는 300 bp, *M. globosa*는 195 bp로 확인되었다. *M. restricta*의 경우, *M. obtusa*가 오염되어 있기 때문에 각각의 band 2개가 나타나는 것을 알 수 있었다. 환자들의 진단에 실제로 이용하기 위해 *Malassezia*에 대한 clinical samples를 *Malassezia* Multiplex kit를 통해 PCR하였다 (Fig. 4).

Clinical samples은 Swab과 모근 (Hair root)을 통해 얻는 방법과 swab을 이용하여 배지에 *Malassezia*를 배양한 후, 배양된 *Malassezia*을 이용하는 방법으로 얻었다. 2가지 방법으로 얻은 모든 clinical samples도 standard strains 결과와 같이, *Malassezia* Multiplex kit를 통해서 *Malassezia* strains을 각각 구분할 수 있다는 것을 sequencing analysis 방법으로 정확하게 확인하였다. *Malassezia* Multiplex kit에 대한 재연성을 좀 더 확인하기 위해 더 많은 clinical samples을 수집하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 5). 그 결과, 각 strains에 대한 PCR band만으로 간단하게 *Malassezia* strains에 대한 구분이 가능하였다.

고 찰

Malasseizia 효모균은 사람이나 온혈동물의 피부에 서식하는 전형적인 균주이며, 건강한 성인의 약 75~98% 정도에서 검출된다. *Malassezia*는 정상인의 비듬 이외에도 지루성 피부염 (seborrheic dermatitis), 모낭염 (*Malassezia folliculitis*), 아토피 피부염 (atopic dermatitis), 어루러기 (pityriasis versicolor) 등 다양한 피부질환과 연관되어 있다[9]. 이러한 피부질환을 가진 환자들에게서 각 피부질환과 연관된 *Malasseizia* 균주들을 진단하기 위해 환자들의 조직에 있는 균을 배양함으로써 진단할 수 있었다. 하지만, 배양결과에 대한 다양한 결과분석으로 인해 부정확한 진단이 발생하고 배양하는 데 시간이 너무나 오래 걸리는 단점이 있다[10].

이후에 oligonucleotides를 이용한 분자적인 기법이 발달하면서 28S rRNA 부분을 이용한 방법, karyotyping 방법과 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 등이 개발되었다. 개발된 방법들은 성공적으로 진단에 이용될 수 있지만, 문제점도 발견되었다. 예를 들어, 28S rRNA typing 방법은 627 bp 정도의 RNA sequence를 얻어야 하기 때문에 실험기법이 어렵고, karyotyping 방법은 시간이 너무 많이 걸리고, 특이성 (specificity)이 떨어지는 단점이 있다. 그래서 좀 더 쉽고 정확한 *Malassezia* 효모균을 진단하기 위한 방법들이 계속적으로 개발되고 있다[6,8,12].

이번 연구에서는 기존의 *Malassezia* PCR kit의 문제점을 보완하여 좀 더 높은 특이성과 검출할 수 있는 *Malassezia* 효모균 수를 늘린 kit를 개발하였다. 특이성을 높이기 위해 변이가 잘 일어나는 부위인 ITS1 region에 대한 PCR을 수행하므로써 *Malassezia* strains간의 구분을 용이하게 하였다. 먼저 *Malassezia* standard strains으로 그 특이성을 확인한 후에 실질적인 clinical isolates로 *Malasseiza* Multiplex kit의 진단율을 확인하였다.

실험 기법 중, DNA purification 과정에서 Swab 등과 같이 실제적인 임상시료에서 CTAB buffer를 이용한 방법으로 DNA를 추출하였고, 조직에서 *Malassezia*를 culture하여 DNA를 추출할 때는 i-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit (intron)를 이용하였다. 하지만, CTAB buffer로 추출한 DNA는 대부분 inhibitor에 의해 PCR이 되지 않는다는 것을 확인하였다. 그 이유를 확실하게 밝힐 수 없어서 그 이후에는 i-genomic BYF DNA Extraction Mini Kit (intron)만을 사용하였다. 그리고 분양받은 *M. restricta*는 Multiplex PCR kit를 통해 *M. obtusa*가 오염되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 개발된 *Malassezia* Multiplex kit는 비듬의 원인이 되는 여러 종류의 *Malassezia* 효모균을 동시에 검출하기 위한 것으로서, oligonucleotides는 매우 높은 특이성으로 비듬 원

인균의 ITS1 region을 동시에 증폭할 수 있고, 특히 Multiplex PCR에서 우수한 작동성 (workability)을 나타내며, 하나의 PCR 반응 set에서 *Malassezia* 효모균 6종을 동시에 검출됨을 알 수 있었다.

현재 사용하고 있는 *Malassezia* PCR 진단법의 경우, 다양한 primers를 제작하여 사용하면 일부 비특이적인 반응과 비듬 원인균인 *Malassezia* 검출에 한계가 문제점이였지만, 이번에 개발된 *Malassezia* Multiplex kit를 통해 이 문제점들을 해결하였다. 특이성 (specificity)과 민감성 (sensitivity) 부분에서는 다른 진단법보다 높은 진단율을 나타냈다.

따라서, *Malassezia* 효모균의 혼성화용 서열을 사용하여 PCR 방법으로 진단을 한다면 기존의 배양에 의한 진단법에 비해, PCR과 전기영동만으로 간편하고 신속하면서도 매우 정확하게 *Malassezia*를 검출하고 구분할 수 있는 것으로 예상된다.

REFERENCES

1. Lee MK, Kim HR, Lee YJ. Identification of *Candida* species by Multiplex PCR. Korean J Clin Microbiol 2006;9(2):119-124
2. Koichi M, Yoshiko T, Michinari K, Katsuhisa U, Hiuga S, Hiedyo Y. species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Med Microbiol 2000;49:29-35
3. Aditya K, Yatika K, Richard C. Molecular differentiation of seven *Malassezia* species. J Clin Microbiol 2000;38(5):1869-1875
4. Kim SM, Lim SH, Jung BR, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. The application of colony PCR in the molecular biological analysis of *Malassezia* yeasts. Kor J Med Mycol 2007;12(4):180-188
5. Lee YW, Lim SH, Ahn KJ. The application of 26S rDNA PCR-RFLP in the identification and classification of *Malassezia* yeast. Kor J Med Mycol 2006;11(3):141-153
6. Christina M, Yvonne M, Bart Theelen, Teun Boekhout, Thomas L. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to Dandruff microbiology. J Clin Microbiol 2002; 40(9):3350-3357
7. Lim SW, Shin MG, Lim JY, Yun SJ, Kim SJ, Lee SC, et al. Nested PCR for detection of *Malssezia* species from patient skin scales and clinical starins. Kor J Dermatol 2008;46(4):446-452
8. Song YC, Lim SH, Jung BR, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. The application of pyrosequencing method in the identification and classification of *Malassezia* yeasts. Kor J Med Mycol 2007;12(4):189-197
9. Kim BJ, Lee EC, Lim YY, Kim DH, Chun YJ. Optimal culture condition for antifungal susceptibility tests of *Malassezia globosa*. Kor J Med Mycol 2009; 14(4):182-189
10. Takamasa K, Koichi M, Michiko A, Ryoko S, Yuka N, Rui K, et al. Revised culture-based system for identification of *Malassezia* species. J Clin Microbiol 2007;45(11):3737-3742
11. Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, Mitroussia A, Tsigonia A, Tzimogianni A, et al. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. Clin Microbiol Infect 2002;8:162-173
12. George G, Ioannis D, Bassukas, Aristea V. The range of molecular methods for typing *Malassezia*. Current Opinion in Infectious Diseases 2009;22:119-125
13. Bart T, Massimiliano S, Eveline G, Alex van B, Teun B. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP^{TM}), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). FEMS Yeast Research 2001;1(2):79-86
14. AJ Kindo, SKC Sophia, J Kalyani, S Anandan. Identification of *Malassezia* species. Indian Journal

of Medical Microbiology 2004;22(3):179-181
15. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of J four new species. Antonie van Leeuwenhoek 1996;69:337-355