PCR-reverse Blot Hybridization Assay을 이용한 피부사상균의 동정

연세대학교[1], 엠앤디 (주)[2], 한국의진균자원은행[3], 서울삼성병원[4],
전남대학교[5], 건국대학교[6], 건양대학교[7]

김현정[1*] · 진현우[1*] · 김성현[1] · 왕혜영[2] · 최연임[1] · 방혜은[1] · 박제섭[3]
이장호[4] · 원영호[5] · 안규중[6] · 김영권[7†] · 이혜영[1†]

= Abstract =

PCR-reverse Blot Hybridization Assay for Species Identification of Dermatophytes

Hyunjung Kim[1*], Hyunwoo Jin[1*], Sunghyun Kim[1], Hye-young Wang[2], Yeonim Choi[1], Hyeeun Bang[1], Je-Seop Park[3], Jang-Ho Lee[4], Young Ho Won[5], Kyu-Joong Ahn[6], Young-Kwon Kim[7†] and Hyeyoung Lee[1†]

Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju , 220-710[1], M&D, Inc., Wonju Eco Environmental Technology Center, Wonju, 220-710[2], Korean Culture Collection of Medical Fungi (KCMF), College of Medical Science, Konyang University, Daejeon, 302-718[3], Department of Laboratory Medicine, Samsung Medical Center, Seoul, 135-710[4], Department of Dermatology, Medical School of Chonnam National University, Gwangju, 140-755[5], Department of Dermatology, Konkuk University School of Medicine, Seoul, 143-914[6], Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Science, Konyang University, Daejeon, 302-718, Korea[7]

Background: Dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, and *Epidermophyton*) cause cutaneous mycoses called dermatophytosis. Forproper anti-dermatophytosis therapy, accurate and early diagnosis of dermatophytes is important. Laboratory diagnosis of dermatophytosis for dermatophytes still relies on microscopic and macroscopic examination of *in vitro* cultures and some physiological tests. These methods (conventional methods) are time-consuming (2~4 weeks) and yet, still have low sensitivity and specificity. Recently, in order to overcome such limitations of conventional methods, molecular-based methods have been developed to identify dermatophytes. The polymerase chain reaction-reverse blot hybridization assay (PCR-REBA) allows sensitive and specific identification of dermatophytes species.

Objective: This study was aimed to develop a new PCR-REBA with higher sensitivity using less amount of probe concentration, so the assay can be more practical in clinical settings.

접수일: 2011년 7월 21일, 수정일: 2011년 9월 22일, 최종승인일: 2011년 9월 22일

*These authors contributed equally to this work.
†Corresponding author: Hyeyoung Lee, Ph.D., Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Sciences, Yonsei University 1 Yonseidae-gil, Wonju-si, Kangwon-do 220-710, Korea.
Tel: 82-33-760-2740, Fax: 82-33-760-2561, e-mail: hyelee@yonsei.ac.kr
†Corresponding author: Young-Kwon Kim, Ph.D., Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Science, Konyang University, Daejeon, 302-718, Korea.
Tel: 82-42-600-6371, Fax: 82-42-543-6370, e-mail: ykkim3245@konyang.ac.kr

Methods: For this, PCR primers and species-specific oligonucleotide probes were designed within the internal transcribed sequences 1 region between 5.8S and 18S rRNA. The species-specific probes designed in this study was to identify 6 species (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum*, and *E. floccosum*) comprised 99% of dermatophytes isolatedin Korea.

Results: The detection efficiency of the PCR-REBA was compared with the microscopic method, and the results showed that the sensitivity of the PCR-REBA developed in this study is 100 times higher than previously developed one. Subsequently, the results of PCR-REBA were evaluated using clinical isolates. DNAs from a total of 68 clinical isolates were analyzed by PCR-REBA, and the inconsistent results between PCR-REBA and conventional microscopic identification results were confirmed by sequence analysis.

Conclusion: In brief, the results showed that results of sequence analysis were identical with PCR-REBA implying newly developed PCR-REBA is very useful method for accurate and rapid identification of dermatophytes and would provide higher simplicity, specificity, sensitivity than conventional method.

[Korean J Med Mycol 2011; 16(3): 86-98]

Key Words: Dermatophytes, Dermatophytosis, Molecular based method, Reverse blot hybridization assay

서 론

피부진균증은 전세계의 인구의 1/4 이상이 감염되어 있으며[1] 우리나라에서도 전체 피부질환의 1/5 이상을 차지할 만큼 널리 퍼져있는 피부질환이다[2]. 이러한 피부진균증은 최근 노령인구 또는 면역억제 치료를 받는 면역결핍인구의 증가, 약물의 오용, 목욕시설 및 스포츠 활동의 확대로 인해 그 발생 빈도가 증가하고 있다[3~5].

피부진균증은 피부사상균에 속하는 각질 친화성 사상형 진균이 피부, 모발, 손톱, 발톱 등 피부 표피층에 감염하여 발생되며, 그 증상은 약하게 나타나지만, 각질화된 조직 내에 감염이 되면 면역기작에 의해 쉽게 완치되지 않아 난치성으로 발전하기 쉽다[5].

피부진균증을 유발하는 대표적인 피부사상균에는 백선균속 (*Trichophyton*), 소포자균속 (*Microsporum*), 표피균속 (*Epidermophyton*)이 있으며 현재까지 세계적으로는 약 40여종의 원인균이 알려졌지만, 우리나라에서는 *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum ferrugineum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. schoenleinii*, *T. verrucosum*, *T. violaceum*, *T. tonsurans* 등 약 10여종이 피부진균증의 원인이 되는 것으로 확인된 바 있다[3].

현재 임상에서는 인체 감염 부위 또는 증상에 따라 피부진균증을 분류 및 진단하여 항진균제의 처방이 이루어지고 있다[3]. 따라서, 임상적으로 유사한 증상을 가지는 다른 피부질환으로의 오진이 쉽게 야기될 수 있으며, 이에 따른 적절한 항진균제의 처방이 어렵기 때문에 항진균제의 오용으로 인한 치료기간의 연장과 장기복용에 따른 인체의 부작용을 야기할 수 있으므로, 신속하고 정확한 피부사상균의 동정과 각 원인균에 따른 적절한 항진균제의 선택은 피부사상균에 의한 병변의 빠른 완치에 도움을 줄 수 있다[5,6~9].

현재 널리 사용되고 있는 피부사상균의 진단법은 피부병변으로부터 직접 균사체를 확인하는 수산화칼륨 (KOH) 검사법[10], 진균 배양 검사법[10], 피부 조직 검사법[11] 등이 있다. 수산화칼륨 (KOH) 검사법은 쉽고 간편하게 균을 동정할 수 있으나 민감도가 낮아 진균 배양 검사법을 병행해야 하는 단점이 있고, 진균 배양 검사법은 피부병변에서 직접 배양할 경우 배양성공률이 낮으며, 진균이 완전히 자라기 까지 오랜 시간 (2~4주 이상)이 걸리며 피부사상균의 배양조건에 따라 전형적인 분생자의 특징을 잃을 수 있기 때문에 신속하

고 정확한 균 동정이 어렵다는 단점이 있다[5,7,11~13].

최근 보고들에 의하면 피부사상균의 전통적인 진단법들이 가지는 단점 보완을 위해 신속하고 정확한 결과를 제공할 수 있는 분자생물학적인 진단법들이 개발되었다[14]. 대표적인 예로 중합효소 연쇄반응 (Polymerase chain reaction, PCR)을 기초로 한 진단법들이 개발되고 있다[10,13,15~16]. 소량의 피부사상균 DNA를 증폭시킨 후, 제한효소를 처리하여 나타난 DNA 절편의 절단양상을 비교하는 제한효소 단편길이 다형성 분석법 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)[7,17], 실시간으로 피부사상균 DNA의 증폭 확인 및 정량이 가능한 실시간 중합효소 연쇄반응 (real-time PCR)[18], 염기서열을 직접 분석하는 염기서열 분석[13], 각 균종의 특이 유전자 부위에만 반응할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용해 표적균에만 반응하는 중합효소 연쇄반응-역교잡법 (poly merase chain reaction-reverse blot hybridization assay, PCR-REBA)[19,20] 등이 있다.

RFLP는 간편한 실험과정으로 균 동정이 가능하다는 장점이 있으나, 전기영동을 통해 DNA 절편의 절단양상을 비교하는 과정 중의 변수가 많다는 단점이 있다[7,17,21~22]. 그리고 real-time PCR은 현재 널리 많이 개발중인 분자생물학적인 진단법으로써, 민감도와 특이도가 높고 피부사상균의 감염에 대한 정량적인 분석이 가능하다는 장점이 있지만 한번의 검사로 검출할 수 있는 수가 제한되어 있으며[18], 또한 염기서열 분석법은 분자생물학적인 진단법의 표준 검사법으로 사용되고 있으나, 피부상재균의 오염이나 피부사상균의 중복감염 시 결과를 판독하기 어렵다는 단점이 있다[13]. PCR-REBA는 한번의 검사로 여러 원인균을 검출할 수 있고, 얇은막 (membrane)을 재사용 함으로써 검사비용을 아낄 수 있고 자동화가 가능하다는 장점을 가지고 있다[19,20].

본 연구에 앞서 이미 PCR-REBA을 이용하여 피부사상균을 동정하는 진단법을 개발한 연구가 있었으나[19], 이들이 개발한 PCR-REBA는 고농도의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 바탕으로 실험의 민감도를 높여 실제 임상에 적용하기에 비용이 많이 드는 어려움이 있었고, 검출할 수 있는 균주의 종류가 국내 실정과는 맞지 않은 단점이 있다.

따라서, 본 연구에서는 우리나라에서 분리 빈도가 가장 높은 피부사상균 6종 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*를 동시에 신속하고 정확하게 동정할 수 있으며, 저농도의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용해 최대의 민감도를 나타낼 수 있는 PCR-REBA을 개발하였으며, 임상분리균주를 이용해 그 성능을 평가하였다.

재료 및 방법

1. Strain 및 단일 분리균주

2010년 5월부터 2011년 6월까지 국내 종합병원으로부터 분리하여 한국의진균자원은행에 기탁되어 보관중인 의진균 목록 중 피부사상균을 분양 받아 본 연구에 사용하였다. 피부상재균은 연세대학교 임상미생물학연구실에서 제공받아 사용하였다. 본 연구에서 사용한 피부사상균의 종류는 표준균주 3종 (*Trichophyton rubrum* (ATCC 28188), *Trichophyton mentagrophytes* (IFM 48154), *Epidermophyton floccosum* (CBS 970.95), 임상분리균 6종 (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Epidermophyton floccosum*)을 대상으로 실험을 하였다. 그리고 PCR-REBA의 특이도를 실험해 보기 위해서 피부사상균이 아닌 진균 8종 (*Malassezia furfur* (KCMF 20409), *Aspergillus oryzae* (KACC 44847), *Penicillium paneum* (KACC 44823), *Aureobasidium pullulans* (KACC 41291), *Aspergillus sydowii* (41869), *Bipolaris sorokiniana* (KACC 44841), *Cryptococcus neoformans* (KCMF 20047), *Candida albicans* (KCMF 20403)), 피부상재균 2종 (*Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), *Corynebacterium diphtheria* (DML 460))을 함께 사용하였다.

2. 피부사상균의 배양

Sabouraud dextrose agar (SDA) 배지를 이용해 피부사상균 배양에 사용하였고, 배지는 증류수 1,000 ml에 dextrose 분말 40 g, neopeptone 분말 10 g, Agar 분말 (Becton and Dickinson, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.) 15 g을 넣고 녹인 후, 121℃에서 15분간 고압증기멸균한 후, 60℃까지 식힌 뒤, 배양접시에 분주하고 사용 시까지 냉장 보관하였다. 피부사상균의 표준균주와 임상분리균주를 SDA 배지에 접종한 후, 집락의 넓이가 배지의 3분의 2 이상을 덮을 때까지 26℃에서 2주에서 4주간 배양하였다. 4주 이상 배양하더라도 자라지 않은 검체는 음성으로 판정하고 이번 연구에서 제외하였다.

3. 표준균주와 임상분리균주에서의 genomic DNA 추출

피부사상균으로부터 genomic DNA를 추출하기 위해 DNA Purification from Animal Tissue kit (SolGent, 대전, 한국)를 이용하였다. 상용화된 핵산 분리키트를 사용하기 이전단계로 5~10 mg 정도의 균사체를 inoculation needle로 긁어 2 ml 시험관에 옮기고, 액체질소를 이용하여 1차 동결시킨 후, 동결건조기 (본듸로, (주)일신바이오베이스, 양주, 한국)를 이용해 18시간 동안 동결건조하였다. 완전히 건조된 균사체를 분쇄한 후 DNA Purification from Animal Tissue kit (SolGent, 대전, 한국)가 권고하는 실험법을 균사체 양과 실험실 환경조건에 따라 수정하여 DNA 추출하였다. 요약하면, 분쇄한 균사체에 Cell lysis solution 500 μl를 넣고 강하게 교반한 후 Proteinase K solution (20 mg/ml) 2 μl를 넣고 55℃에서 18시간 동안 반응하였다. 18시간 동안 반응이 끝나면, 실온에 꺼내어 식힌 후 Protein Precipitation Solution 200 μl을 넣고 강하게 교반하고 13,000 g에서 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 1.5 ml 시험관으로 옮기고 동량의 100% isopropanol을 첨가하고 20회 이상 위, 아래로 뒤집어 섞고 -20℃에서 30분 이상 DNA를 침전하였다. 13,000 g에서 15분 동안 원심분리하여 하얀색 DNA pellet을 확인한 뒤, 상층액을 제거하고 80% 에탄올 1 ml을 첨가한 뒤, 5회 이상 위, 아래로 뒤집어 섞었다. 또다시 상층액을 제거하고 13,000 g에서 5분 동안 원심분리한 뒤 남아있는 상층액은 파이펫을 이용하여 완벽히 제거한 후 시험관 뚜껑을 열고 상온에서 10분 동안 건조시켰다. Kit 내 구성물인 Hydration solution 50 μl을 첨가하고 5초간 위, 아래로 섞어 DNA를 녹이고 DNA가 완벽하게 녹을 수 있도록 4℃에서 30분 이상 방치한 후 RNase A (25 mg/ml)를 2 μl 첨가하고 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 마지막으로 검체를 65℃에서 60분 동안 재수화시킨 뒤, 사용시까지 4℃에 보관하였다.

4. 피부사상균의 유전자 수집 및 분석

미국 국립생물정보센터 (National center for biotechnology information, NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov) Genbank에서 표적으로 하는 피부사상균들의 PCR 프라이머와 올리고뉴클레오타이드 프로브는 피부사상균의 정확한 균 동정을 위해 18S ribosomal RNA (rRNA)와 5.8S rRNA의 사이에 존재하는 internal transcribed sequence 1 (ITS 1) 유전자를 검색하여 염기서열을 수집하였다. 멀티얼라인 (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin)을 수행한 후 표적으로 하는 피부사상균들이 공통으로 가지는 염기서열 부위에서 2쌍의 primer를 디자인하였고, 그 중 reverse primer에는 PCR-REBA법을 위해 biotin을 5' 말단에 붙였다. 그리고 2쌍의 primer 내부에 존재하는 균특이 부위에서 각각의 표적 피부사상균을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 디자인하였고 각 올리고뉴클레오타이드 프로브에는 얇은 막과 펩타이드 결합을 할 수 있도록 하기 위해 5' 말단에 amine기를 붙였다. 디자인한 primer와 올리고뉴클레오타이드 프로브는 바이오니아 (대전, 한국)에 합성을 의뢰하였다.

5. 피부사상균으로부터 추출한 genomic DNA로부터 ITS1 부위를 표적으로한 one-tube nested PCR

추출한 피부사상균의 genomic DNA를 주형으로 상용화된 Prime Taq Premix (2X) (GENET BIO, 논산, 대한민국)를 이용하여 PCR을 수행하였다. Prime Taq Premix (2X)의 조성은 primer taq polymerase 1 unit/10 μl, 2X reaction buffer, 4 mM $MgCl_2$, enzyme stabilizer, sedment, loading dye, pH 9.0, 0.5 mM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP이다. PCR을 위한 각 조성은 Prime Taq Premix (2X) 10 μl, 2쌍의 10 pmole primer를 각각 1 μl, ultrapure water 1 μl, 피부사상균 genomic DNA 5 μl, 총량을 20 μl로 하였다. 검사의 민감도를 높이기 위해 두 쌍의 프라이머를 이용해 one-tube nested PCR을 수행하였다. PCR 반응은 초기 변성과정을 위해 95℃ 5분, 일차 증폭을 위해 95℃ 30초, 65℃ 30초 반응을 10번 반복, 2차 증폭을 위해 95℃ 30초, 60℃ 30초 반응을 40번 반복 후, 완전한 신장반응을 위해 72℃ 10분간 반응시켰다. PCR 반응이 완료된 PCR 산물은 2% TBE (Tris-borate-ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate) agarose gel (W/V ratio)에서 290 volt로 20분간 전기영동하여 ethidium bromide에 10분간 염색 후 자외선 투과조명기로 증폭 여부를 확인하였다.

6. ITS1을 기초로 피부사상균 동정을 위한 REBA

PCR 반응산물과 Denaturation solution (0.2 N NaOH, 0.2 mM EDTA)을 일대일로 잘 혼합한 후 25℃에서 5분간 반응시켜 이중가닥의 PCR 반응산물을 단일가닥으로 변성하였다. 반응하는 동안 균특이 올리고뉴클레오타이드 프로브가 부착된 얇은막에 2X SSPE/0.1% SDS (Hybridization solution) 100 ml을 반응하였다. 변성된 PCR 반응산물을 Hybridization solution 130 μl와 혼합한 후, MN45 miniblotter system (immunetics, 보스턴, 매사추세츠주, 미국)에 140 μl 점적하여, 25℃에서 30분간 교잡하였다. MN45 miniblotter system (immunetics, 보스턴, 매사추세츠주, 미국)로부터 흡입기를 이용하여 PCR 반응산물을 완전히 제거하고 얇은막을 미리 데워둔 2X SSPE/0.5% SDS (Washing solution) 100 ml을 이용하여 54℃ 항온수조에서 90 rpm으로 2회 세척하여 비특이 산물을 제거하였다. 두 번째 세척이 완료되기 전에 Streptavidin-AP Conjugate (Roche, 독일)를 Washing solution으로 1:2,000배 희석하여 미리 준비한 뒤 2회 세척이 끝난 뒤 Washing solution을 완전히 제거하고 25℃에서 30분 동안 얇은막 전체에 AP solution이 반응할 수 있도록 Rolling bottle (FHB15 Tube, Hyland Scientific, 시애틀, 워싱턴, 미국)을 이용하여 얇은막과 AP solution을 반응시켰다. 반응 후 Washing solution을 이용해 25℃에서 5분씩 2회, 2X SSPE 용액으로 1분씩 2회 세척하고 CDP-star (GE healthcare, 영국) 5 ml을 4분 동안 반응시켰다. 이 후 Hyper™ film (GE healthcare, 영국)에 10분간 감광시킨 후 현상하여 나온 필름의 결과를 통해 검출 여부를 판단하였다.

결 과

1. 기존 Bergmans 등의 PCR-REBA와의 민감도 비교

Bergmans 등의 PCR-REBA과 본 연구의 PCR-REBA의 민감도 비교를 하기 위하여, 계열희석한 *T. rubrum*의 DNA를 가지고 PCR을 수행한 결과, Bergmans 등의 PCR은 1 pg 농도의 DNA까지 449 bp의 반응산물을 확인하였고[19], 본 연구에서 디자인한 PCR은 100 fg 농도의 DNA까지 235 bp의 PCR 반응산물을 확인하였다 (Fig. 1A, 1B). 이 PCR 반응산물들을 가지고 Bergmans 등의 REBA와 본 연구의 REBA를 실시하였다. 그 결과, Bergmans 등의 REBA은 1 pg 농도의 DNA까지 증폭이 가능하였고[19] 본 연구의 REBA로 10 fg 농도의 DNA까지 증폭가능한 민감도를 가지는 것을 확인하였다 (Fig. 1C, 1D).

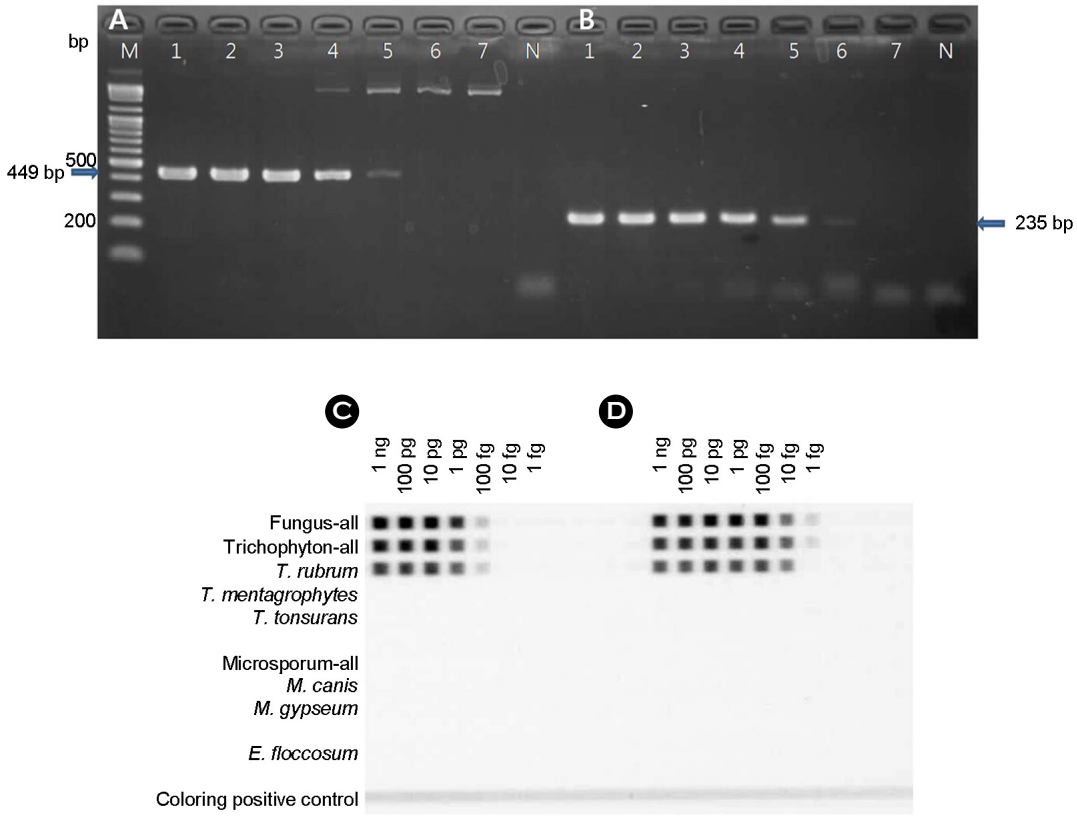

Fig. 1. Comparison of PCR-REBA sensitivity. (A) Using serially diluted *T. rubrum* DNAs for Bergmans' PCR. **(B)** Using serially diluted *T. rubrum* DNAs for PCR in this study. M, 100 bp DNA ladder (Bioneer, Daejeon), 1 ng (lane 1), 100 pg (lane 2), 10 pg (lane 3), 1 pg (lane 4), 100 fg (lane 5), 10 fg (lane 6), 1 fg (lane 7), and negative control (lane N); **(C)** and **(D)** REBA results.

2. PCR-REBA에 사용되는 균특이 올리고튜클레오타이드 프로브의 특이도 검사

표준균주를 포함한 피부사상균 (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*)에 대한 올리고뉴클레오타이드 프로브의 특이도를 확인하기 위하여 PCR-REBA를 수행하였다. 실험에 사용한 모든 피부사상균 주들이 본 연구에서 디자인한 Fungus-all 프로브와 균특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브에 양성반응을 나타냈다. 또한 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*가 Trichophyton-all 프로브에 양성반응을 나타냈고 *M. canis*와 *M. gypseum*가 Microsporum-all 프로브도 양성반응을 나타냈다. 그리고 각 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum* 균특이적인 올리고뉴클레오타이드 프로브에 피부사상균이 특이적으로 양성반응을 나타냈다 (Fig. 2A). 각 피부사상균 검출용으로 디자인한 올리고뉴클레오타이드 프로브가 교차반응 없이 특이적인 결합을 하여 피부사상균을 정확하게 동정하였다.

PCR-REBA의 특이도 검사를 위하여 피부사상균 이외에 피부사상균이 아닌 진균과 피부상재균으로 알려진 세균을 대상으로 PCR-REBA를 수행하였다. *Malassezia furfur*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium paneum*, *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus sydowii*, *Bipolaris sorokiniana*, *Cryptococcus*

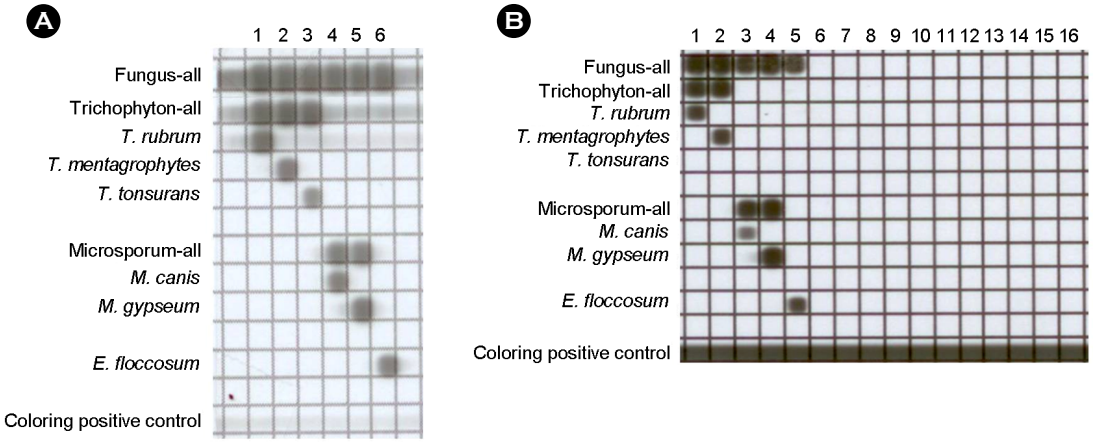

Fig. 2. The specificity of PCR-REBA for identifying dermatophytes. (A) Using dermatohytes' DNAs; Vertical lanes: genus-specific and species-specific oligonucleotide probes. Horizontal lanes: PCR products of *T. rubrum* (lane 1), *T. mentagrophytes* (lane 2), *T. tonsurans* (lane 3), *M. canis* (lane 4), *M. gypseum* (lane 5), and *E. floccosum* (lane 6). **(B)** Using dermatohytes, other fungus, and normal flora bacteria DNAs; Vertical lanes: genus-specific and species-specific oligonucleotide probes. Horizontal lanes: PCR products of *T. rubrum* (lane 1), *T. mentagrophytes* (lane 2), *M. canis* (lane 3), *M. gypseum* (lane 4), *E. floccosum* (lane 5), *Malassezia furfur* (lane 6), *Aspergillus oryzae* (lane 7), *Penicillium paneum* (lane 8), *Aureobasidium pullulans* (lane 9), *Aspergillus sydowii* (lane 10), *Bipolaris sorokiniana* (lane 11), *Cryptococcus neoformans* (lane 12), *Staphylococcus epidemidis* (lane 13), *Corynebacterium diphtheria* (lane 14), *Candida albicans* (lane 15), and negative control (lane 16).

neoformans, *Staphylococcus epidemidis*, *Corynebacterium diphtheria*, *Candida albicans*는 all-fungus 프로브와 균특이적인 프로브에서는 검출되지 않았다 (Fig. 2B). 따라서, 진균 및 피부상재균은 어떠한 올리고 뉴클레오타이드 프로브에도 음성반응을 나타냈고, 디자인한 균특이 올리고뉴클레오타이드 프로브가 피부사상균에만 양성반응을 나타내는 것을 확인하였다.

3. PCR-REBA에 사용되는 균특이 올리고뉴클레오타이드 프로브의 민감도 소견

다음은 피부사상균의 검출을 위한 PCR-REBA의 민감도를 검사하였다. 각 균종마다 1 ng에서 1 fg까지 10배 계열희석한 피부사상균의 DNA를 가지고 PCR-REBA를 수행한 결과, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*와 *M. gypseum*은 10 fg까지 양성신호를 나타냈고, *M. canis*는 100 fg까지, *E. floccosum*은 1 pg까지 양성신호를 나타냈다 (Fig. 3).

4. 임상분리균주를 이용한 PCR-REBA의 유용성 평가

임상분리균주를 대상으로 PCR-REBA법을 실시하였다. 전체 임상분리균주 68개 중 54개의 임상분리균주는 전통적인 검사법에 의해 동정이 균종 수준까지 완료된 균주였으며 나머지 14종 중 4종은 균속 수준까지 완료된 균주, 나머지 10균주는 동정 결과가 없는 균주였다. 이들 균주를 대상으로 본 연구에서 개발된 PCR-REBA를 수행하였다. 그 결과 전통적인 검사법에 의해 균종 수준까지 동정된 54균주 중 PCR-REBA법과 일치하는 균주의 비율은 98.1% (53균주)이었고, 일치하지 않은 균주의 비율은 1.9% (1균주)이었다. 각 균주별로 살펴보면, 피부사상균인 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*은 100% 모두 일치하였고, 하나의 균주는 전통적인 동정법으로 *T. verrucosum*으로 동정되었으나, PCR-REBA 결과는 *T. mentagrophytes*로 동정되었다. 그리고 전통적인 검사법으로 *Trichophyton* 속

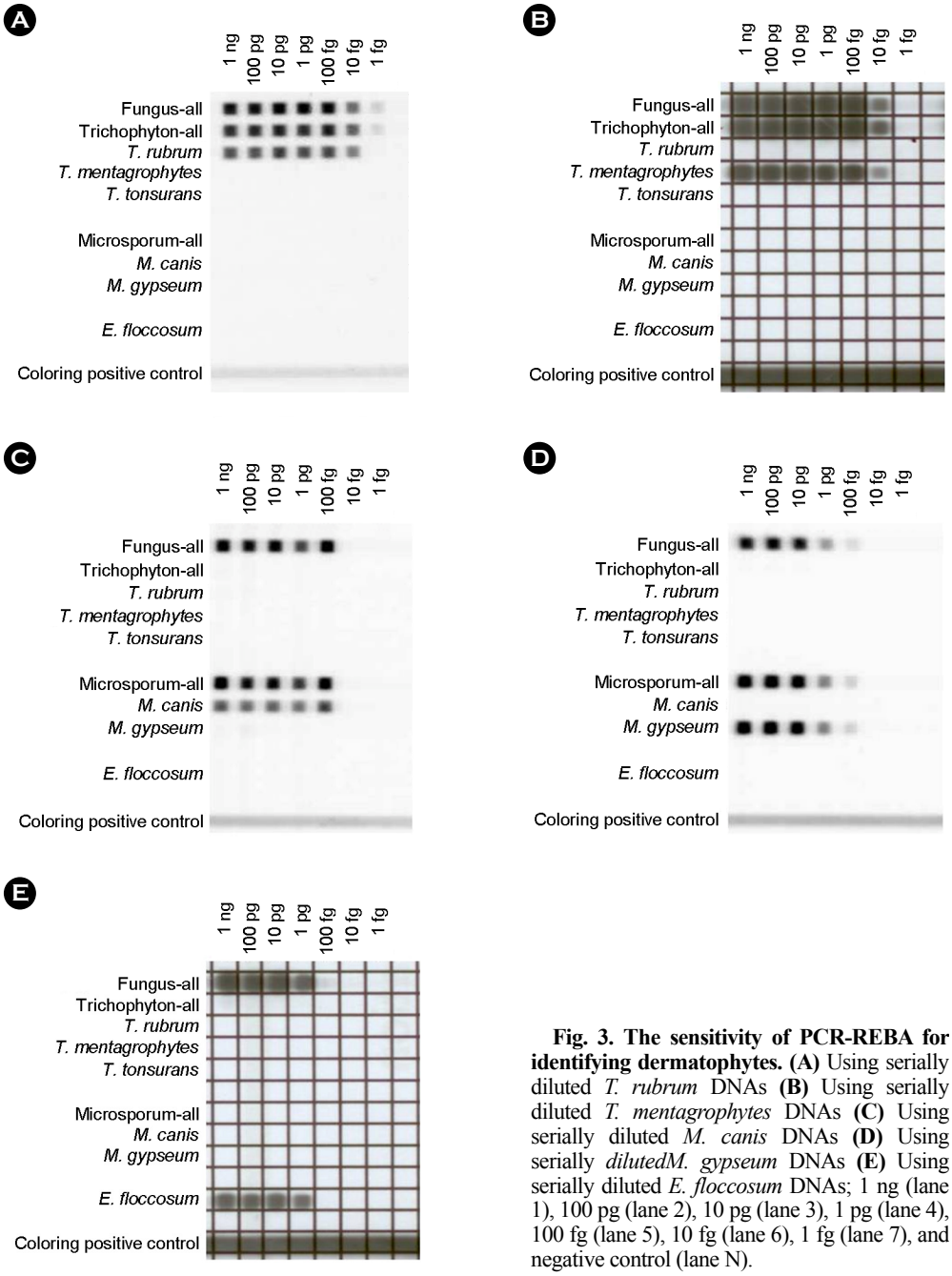

Fig. 3. The sensitivity of PCR-REBA for identifying dermatophytes. (A) Using serially diluted *T. rubrum* DNAs **(B)** Using serially diluted *T. mentagrophytes* DNAs **(C)** Using serially diluted *M. canis* DNAs **(D)** Using serially *dilutedM. gypseum* DNAs **(E)** Using serially diluted *E. floccosum* DNAs; 1 ng (lane 1), 100 pg (lane 2), 10 pg (lane 3), 1 pg (lane 4), 100 fg (lane 5), 10 fg (lane 6), 1 fg (lane 7), and negative control (lane N).

으로 균속 수준까지 동정된 4균주는 PCR-REBA에 의해 *T. rubrum* 3균주와 *T. mentagrophytes* 1균주로 각 동정되었다. 전통적인 검사법에 의해 동정된 결과가 없던 10균주의 PCR-REBA 결과, *T. rubrum*가 8균주, *T. mentagrophytes*가 1균주, *E. floccosum*가 1균주로 동정이 되었다 (Table 1).

총 68균종의 임상분리균주 중에서 전통적인 동정법으로 동정된 결과와 PCR-REBA 결과가 일치하지 않은 1균주와 전통적인 검사법으로 *Trichophyton* 속으로 동정된 4균주와 동정되지

않은 10균주는 염기서열 분석법 의뢰하였다. 그 결과 전통적인 검사법과 PCR-REBA의 결과가 일치하지 않은 균주의 염기서열 분석 결과는 *T. mentagrophytes*로 동정되어 PCR-REBA 결과와 일치하였으며, 전통적인 동정법을 이용하여 *Trichophyton* 속으로 동정된 4개의 균주는 염기서열 분석 결과가 *T. rubrum* 3균주, *T. mentagrophytes* 1균주로 분석되어 PCR-REBA의 결과와 일치하였다. 한편, 전통적인 검사법으로 동정 결과가 없었던 10균주의 염기서열 분석 결과, *T. rubrum*가 8균주, *T. mentagrophytes*가 1균주, *E. floccosum*가 1균주로 동정이 되었다 (Table 2). 따라서 염기서열 분석 결과와 PCR-REBA의 결과가 일치하였다.

Table 1. Comparison of isolates identification by microscopic method and PCR-REBA

Microscopic		PCR-REBA	
T. rubrum	35	*T. rubrum*	35
T. mentagrophytes	8	*T. mentagrophytes*	8
M. canis	5	*M. canis*	5
M. gypseum	3	*M. gypseum*	3
E. floccosum	1	*E. floccosum*	1
T. tonsurans	1	*T. tonsurans*	1
T. verrucosum	1	*T. mentagrophytes*	1
Trichophyton spp.	4	*T. rubrum*	3
		T. mentagrophytes	1
Unidentified samples	10	*T. rubrum*	8
		T. mentagrophytes	1
		E. floccosum	1
Total	68		68

고 찰

피부사상균증은 피부사상균의 감염으로 인해 발생하는 피부질환으로[1], 정확한 균 동정없이 치료를 시작하게 되면 치료 실패 확률이 증가되며 치료기간이 연장되어 환자에게 신체적 또는 경제적인 부담을 안겨주게 되므로 피부진균증의 원인균 동정은 중요하다[5]. 현재 우리나라에서 피부진균증을 일으키는 원인균으로 분리된 피부사상균의 99.8%는 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccosum*이다. 그 중에서 *T. rubrum*이 92.0%를 차지하고 있으며, *T. tonsurans*가 증가하고 있다[3]. 현재 임상에서 피부사상균을 동정하는 방법으로는 KOH 검사와 분리 배양 검사가 있으나[10], 이러한 전통적인 검사법은 양성율이 낮고 특히 진균을 배양하여 균을 동정하기 까지 오랜 시간이 걸리며, 오염균이나 피부상재균에 의한 오염으로 인해 정확하게 균을 동정하는데 어려움을 겪고 있다[1].

최근에는 분자생물학적인 검사법을 이용하여 피부사상균의 DNA를 직접 검출하는 방법이 널리 사용되고 있다[10,13~16]. 본 연구에서 사용된 PCR-REBA법은 PCR을 이용하여 소량의 DNA를 증폭하고 얇은막 (membrane)에 있는 특이 올리고뉴클레오타이드 프로브와 반응시켜 검출하기 때문에 적은 양의 검체로도 검출할 수 있고,

Table 2. Comparison of the PCR-REBA with microscopic identification using dermatophytes clinical isolates

Microscopic method		PCR-REBA		Sequence analysis	
T. verrucosum	1	*T. mentagrophytes*	1	*T. mentagrophytes*	1
Trichophyton spp.	4	*T. rubrum*	3	*T. rubrum*	3
		T. mentagrophytes	1	*T. mentagrophytes*	1
Unidentified samples	10	*T. rubrum*	8	*T. rubrum*	8
		T. mentagrophytes	1	*T. mentagrophytes*	1
		E. floccosum	1	*E. floccosum*	1

Table 3. Comparison of the PCR-REBA with Bergmans's PCR-REBA and new developed PCR-REBA

New developed PCR-REBA				Bergmans' PCR-REBA			
Oligonucleotide (Species)	Sequence 5'-3'	Target	A mount of probe per lane (pmole/lane)	Oligonucleotide (Species)	Sequence 5'-3'	Target	A mount of probe per lane (pmole/lane)
Primer				Primer			
MF1	GCCDYACSGCCCCATTCTTGT	ITS1		DERMF1	GGAAACGACCGCCCAGG	18S rRNA gene	
CR1	Biotin-TCGCTGCGTTCTTCATCGATG	5.8S rRNA gene		DERMR2	Biotin-CGGAATTCTGCAATTCACATTACT	5.8S rRNA gene	
MF2	CDYACSGCCCCATTCTTGTCTAC	ITS1					
CR2	Biotin-TGCGTTCTTCATCGATGCCGGA	5.8S rRNA gene					
Probe				Probe			
All-fungus	Amine-CTTTCAACAACGGATCTCTTG	5.8S rRNA gene	100	All-fungus	Amine-AAG TAA AAG TCG TAA CAA GGT	18S rRNA gene	800
Trichophyton	Amine-AGCTGTCAGTCTGAGCG	ITS1	100	Trich4	Amine-AGC TGT CAG TCT GAG CG	ITS1	400
Microsporum	Amine-ACACTCTTGAAAGAACATACC	ITS1	100	Micro1	Amine-CAC TCT TGA AAG AAC ATA CC	ITS1	800
T. rubrum	Amine-ACAAGAA AAA ATTCTCTGAAGAG	ITS1	100	Truso1	Amine-CAA GAA AAA ATT CTC TGA AGA G	ITS1	800
T. mentagrophytes	Amine-AGCCTCTCTTTAGTGGCTA AACG	ITS1	500	Tment2	Amine-AGT GGC TCA ACG CTG G	ITS1	3200
T. tonsurans	Amine-AGCCTCTCTTTATAGCGGCTCAAC	ITS1	250	Ttons1	Amine-CTT TAT AGC GGC TCA ACG	ITS1	400
M. canis	Amine-A GGGGACTCTTGTTTCCTAG	ITS1	100	Mcafe1	Amine-GGG GAC TCT TGT TTC CT	ITS1	3200
M. gypseum	Amine-GAG TGA TTA AAA TCC ATG AAT ACT GTT	ITS1	100				
E. floccosum	Amine-TACGAA ATCTCCATAGGTG	ITS1	100	Efloc2	Amine-TAC GAA ATC TCC ATA GGT G	ITS1	800
				Tinte1	Amine-TAG TGG CTA AAC GCT GG	ITS1	400
				Tviol1	Amine-AGG AAA ATT CTC TGA AGG G	ITS1	800
				Tverr3	Amine-GAT CAG CGT TCC ATC AG	ITS1	1600
				Maudo1	Amine-GGG GGA CTT TTG TTT CC	ITS1	400

중복 감염 시에도 검출할 수 있다는 장점이 있다. Bergmans 등의 연구팀에서 이미 PCR-REBA를 개발하였으나, 고농도의 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 비용이 많이 들고 검출대상균주가 국내에서 분리되는 균주와는 차이가 있었다[19]. 본 연구에서는 국내 실정에 맞게 검출대상균주를 정하고, 단점을 개선하였다.

Bergmans 등이 사용하는 PCR 조건에서의 민감도 보다 높은 민감도를 나타내기 위하여 PCR 반응산물의 크기를 235 bp로 작게 증폭하도록 프라이머를 디자인하였고, PCR 반응 온도와 조건을 조정하여 민감도를 극대화 하였다. 그리하여 PCR에서 민감도가 10배 상승하였다. REBA에 사용되는 올리고뉴클레오타이드 프로브도 보다 높은 민감도를 나타내는 염기서열로 수정 및 신규 디자인하여 REBA 결과에서도 100배의 민감도가 상승하였다 (Fig. 1). 한편, 사용하는 올리고뉴클레오타이드 프로브의 양이 Bergmans 등에서는 최소농도 400 pmol/lane에서 최대농도 3,200 pmol/lane으로 평균 1,077 pmol/lane 농도로 사용하였으나[19], 본 연구에서는 최소농도 100 pmol/lane에서 최대농도 500 pmol/lane으로 평균 161 pmol/lane 농도를 사용하였다 (Table 3). 이러한 결과를 볼 때, Bergmans 등의 REBA 보다 적은 양의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하면서 높은 민감도를 나타냈기 때문에 경제적인 측면에서 볼 때 보다 유용하다는 것을 확인하였다. 본 연구에서 개발한 피부사상균 검출 PCR-REBA의 민감도가 균종에 따라 차이가 있지만 *M. canis*의 경우는 기존 논문에서 보다 100배, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*와 *M. gypseum*은 10배 뛰어난 민감도를 나타냈고, *E. floccosum*은 동일한 민감도를 나타냈다. 그리고 새로 개발된 PCR-REBA의 특이도 검사를 위해 피부사상균이 아닌 진균과 피부상재균을 함께 PCR-REBA 수행해 본 결과, 피부사상균에만 양성반응을 나타냈다 (Fig. 2). 따라서 본 연구에서 개발한 PCR-REBA법은 피부사상균을 검출하기 위하여 높은 민감도와 특이도를 나타냈다. 전통적인 동정법은 배양환경, 슬라이드 제작방법, 실험자의 경험에 따라 검사 결과의 차이를 나타낼 수 있기 때문에, 피부사상균의 정확한 종 동정이 어렵다. 하지만 임상분리균주를 대상으로 PCR-REBA를 수행해 본 결과, 전통적인 동정법으로 동정할 수 없었던 균주들까지 정확하게 동정할 수 있었다. 새로 개발된 PCR-REBA를 평가하기 위해 염기서열 분석법을 실시하였고 그 결과, PCR-REBA와 염기서열 분석법의 결과가 일치하였다 (Table 2). 본 연구는 이미 임상검체로부터 분리 배양된 임상분리균주를 대상으로 PCR-REBA를 수행하였지만, 피부병변으로부터 직접 피부사상균의 genomic DNA를 추출하여 PCR-REBA를 수행한다면, 피부사상균을 동정하는 과정에 있어 정확함을 높이는 것뿐만 아니라 배양시간을 줄여 신속하게 피부사상균의 동정이 가능할 것이다.

결 론

본 연구에서는 전통적인 피부사상균 동정법이 가지는 단점을 극복하고 원인균을 빠르고 정확하게 동정하고자 임상분리균주를 대상으로 분자생물학적인 방법인 PCR-REBA를 수행하였다. 본 연구에서 사용한 PCR-REBA의 경우에는 DNA를 대상으로 분석하기 때문에 DNA만 추출할 수 있으면 정확한 동정이 가능하다는 장점을 이용하여 전통적인 피부사상균 동정법보다 신속하고 정확하게 피부사상균의 동정 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구에서는 피부사상균의 종 수준까지 구분이 가능하다고 알려진 5.8S와 18S rRNA사이에 존재하는 ITS1 부위를 표적으로 하여 PCR-REBA를 실시해 본 결과, 그 민감도는 기존에 다른 연구팀에서 발표한 결과보다 약 100배 정도 높은 민감도를 보였고, 총 68개의 임상분리균을 이용하여 유용성을 검사한 결과 배양을 기초로 한 방법으로 정확하게 동정할 수 없는 검체들까지 정확하게 동정할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 개발한 PCR-REBA법은 우리나라 실정에 맞는 피부진균증을 유발하는 피부사상균을 동정할 때에

전통적인 검사법을 대신하여 유용할 것으로 생각되며, 보다 나은 평가를 위해서는 보다 많은 수의 임상분리배양균과 직접검체에 의한 유용성 평가가 필요할 것이다.

REFERENCES

1. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses 2008;51:2-15
2. Jang SJ, Ahn KJ. Superficial dermatomycosis and the causative agents in Korea. Korean J Med Mycol 2004;9:91-99
3. Kim KH. Changing patterns of dermatophytosis and its causative agents according to social and economic developments in Korea. Korean J Med Mycol 2006; 11:1-12
4. Blanco JL, Garcia ME. Immune response to fungal infections. Vet Immunol Immunopathol 2008;15: 125:47-70
5. Garg J, Tilak R, Garg A, Prakash P, Gulati AK, Nath G. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. BMC Res Note 2009;18:2-6
6. Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasan I, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. J Clin Microbiol 2000;38:341-344
7. Shin YM, Shin DH, Cho JS, Kim KH, Kim GJ. A comparative study of KOH preparation, fungal culture, histopathologic examination and polymerase chain reaction for diagnosis in onychomycosis. Korean J Med Mycol 2007;12:59-69
8. Gupta AK, Cooper EA. Update in antifungaltherapy of dermatophytosis. Mycopathologia 2008;166:353 -367
9. Nweze EI, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Agar-based disk diffusion assay for susceptibility testing of dermatophytes. J Clin Microbiol 2010;48:3750 -3752
10. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. Mycopathologia 2008; 166:295-306
11. Kwon OC, Baek SC, Cho BK. Significance of polymerase chain reaction for the detection of causative fungi of onychomycosis: comparison with fungus culture and KONCPA (KOH + nail clipping + PAS (periodic acid-schiff) stain). Korean J Dermatol 1999; 37:1457-1465
12. Dobrowolska A, Staczek P, Kaszuba A, Kozłowska M. PCR-RFLP analysis of the dermatophytes isolated from patients in central poland. J Dermatol Sci 2006; 42:71-74
13. Wengenack NL, Binnicker MJ. Fungal molecular diagnostics. Clin Chest Med 2009;30:391-408
14. Hay RJ, Jones RM. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. Clinics in Dermatology 2010;28:190-196
15. Turin L, Riva F, Galbiati G, Cainelli T. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. Eur J Clin Invest 2000; 30: 511-518
16. Uchida T, Makimura K, Ishihara K, Goto H, Tajiri Y, Okuma M, et al. Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. J of Dermatology 2009;36:202-208
17. Baek SC, Chae HJ, Houh D, Byun DG, Cho BK. Detection and differentiation of causative fungi of onychomycosis using PCR amplification and restriction enzyme analysis. Int J Dermatol 1998;37:682 -686
18. Bergmans AM, van der Ent M, Klaassen A, Böhm N, Andriesse GI, Wintermans RG. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. Clin Microbiol Infec 2010;16:704-710
19. Bergmans AM, Schouls LM, van der Ent M, Klaassen A, Böhm N, Wintermans RG. Validation of PCR-

reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. Clin Microbiol Infect 2008; 14:778-788

20. Martin C, Roberts D, van Der Weide M, Rossau R, Jannes G, Smith T, et al. Development of a PCR-basedlineprobeassay for identification of fungal pathogens. J Clin Microbiol 2000;38:3735-3742
21. Bagyalakshmi R, Senthilvelan B, Therese KL, Murugusundram S, Madhavan HN. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens. Indian J Dermatol 2008; 53:15-20
22. De Baere T, Summerbell R, Theelen B, Boekhout T, Vaneechoutte M. Evaluation of internal transcribed spacer2-RFLP analysis for the identification of dermatophytes. J Med Microbiol 2010;59:48-54