

진균학적 검사 및 random amplified polymorphic DNA analysis에 의한 피부사상균의 동정과 미동정 원인에 대한 분석

서울대학교 의과대학¹, 한양대학교 의과대학², 가톨릭대학교 의과대학³, 연세대학교 의과대학⁴, 건국대학교 의과대학⁵ 피부과학 교실, 보라매병원 임상병리과⁶

김정애¹ · 문상은¹ · 권태은¹ · 유희준² · 조백기³ · 이광훈⁴ · 안규중⁵ · 윤종현⁶

=Abstract=

Identification of Dermatophytes by Mycological Tests and Random Amplified Polymorphic DNA analysis

Jeong Aee Kim, M.D.¹, Sang Eun Moon, M.D.¹, Tae Eun Kwon, M.D.¹, Hee Joon Yu, M.D.², Baik Kee Cho, M.D.³, Kwang Hoon Lee, M.D.⁴, Kyu Joong Ahn, M.D.⁵, Jong Hyun Yoon, M.D.⁶

Department of Dermatology, Seoul National University¹, Hanyang University², Catholic University³, Yonsei University⁴, Konkuk University⁵ and Department of Clinical Pathology Seoul City Boramae Hospital⁶

Background : Dermatophytes are usually identified based on their characteristic morphologies and physiological tests. However, identification is often delayed and problematic for atypical isolates. Recently, random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis was successfully performed for the identification of dermatophytes.

Objective : This study was performed to identify clinical isolates which could not be identified previously. The causes of unidentification were analysed and the merits and demerits of RAPD analysis were evaluated.

Methods : Thirty-six clinical isolates and 14 standard strains were included in this study. Seven mycological studies were performed and RAPD analysis was done by using primer OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3').

Results : Based on the results of 7 mycological tests, 28 strains were confirmed as follows: 24, *T. rubrum*; 2, *T. mentagrophytes*; 2, *T. raubitschekii*. Four were considered as atypical strains of *T. rubrum*, and another 4 as non-dermatophytic moulds. This results were confirmed by RAPD analysis.

Conclusion : RAPD analysis was useful for the identification of dermatophytes, especially the atypical strains. However, non-dermatophytic mould could not be identified by RAPD analysis. RAPD analysis was considered as a supplementary method to the conventional mycological studies for the identification of dermatophytes. (Korean J Dermatol 2001;39(2) : 168~175)

Key Words : Dermatophyte, RAPD analysis, Identification, Mycology

<접수:2000년 9월 29일>

* 본 논문은 2000년도 보라매병원 일반(공동임상) 연구비 지원에 의해서 연구됨

* 본 논문의 요지는 2000년 6월 대한진균학회 제 7차 학술대회에서 발표되었음

교신저자 : 김정애

주소 : 150-012 서울시 동작구 신대방2동 395번지

보라매병원 피부과

전화 : (02)840-2190 Fax : (02)831-0714

E-mail : jakim@snu.ac.kr

서 론

피부사상균은 사람과 동물의 피부 및 피부부속기(모발, 조갑)에 표재성 피부 진균 감염증인 피부사상균증(백선)을 일으키는 진균으로서 *Trichophyton(T.)*, *Microsporum(M.)* 및 *Epidermophyton(E.)* 속에 속하는 진균이다^{1,2}. 피부사상균은 균종에 따라 임상 양상, 균의 감염 경로 및 치료 경과가 다를 수 있으므로^{2,3} 신속한 치료와 재발의 방지 및

질병의 확산을 방지하기 위하여 원인균을 정확하게 동정하는 것이 필요하다. 특히 최근에는 외국과의 활발한 스포츠 교류가 이루어지고 있고^{4,5}, 이전에 기르지 않던 새로운 애완동물을 사육함에 따라⁶ 과거에 보고가 없었던 새로운 피부사상균들이 국내에 도입되고 있으므로 피부사상균의 동정을 정확하게 하여야 할 필요성이 더욱 높아지고 있다⁷.

피부사상균의 동정은 대개 그 형태학적 특징을 육안 및 현미경 하에서 관찰하거나 몇 가지 진균학적 검사를 실시하여 내리게 된다^{8,9}. 그러나 진균학적 검사를 실시하는 데는 배양이 종료된 이후에도 3 내지 4 주 정도의 시간이 소요되며, 드물지 않게 검사 결과들이 서로 상충되어 균의 동정이 확실하지 않을 때가 있다^{8,9}. 따라서 1990년대 초부터 피부사상균의 동정에도 여러 가지 분자생물학적 기법이 시도되어 왔는데, 이러한 방법들을 이용하면 대개 2-3일 정도의 짧은 시간 내에 정확하게 피부사상균을 동정할 수 있다^{9,10}. 그러나 분자생물학적 방법은 고가의 기자재와 시약이 필요하고 연구 기법이 확립되어 있는 연구실에서만 실시가 가능하므로 일상적인 피부사상균의 동정 방법으로 이용하는 것은 어렵다고 생각된다.

본 연구에서는 피부사상균으로 생각이 되지만 형태학적 특징의 관찰만으로는 동정이 어려웠던 36주를 대상으로 하여 7종의 진균학적 검사와 분자생물학적 연구 방법의 일종인 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석을 실시하였다. 이러한 동정 결과를 토대로 대상 진균들의 동정이 어려웠던 원인에 대하여 분석을 하여 보았으며, 피부사상균의 동정을 위하여 RAPD 분석법을 적용

하는데 대한 문제점에 대하여 고찰하여 보았다.

재료 및 방법

1. 대상 균주

1) 임상 분리주: 피부사상균증 환자의 피부 병변에서 분리한 진균 중, 집락의 형태학적 특징만으로는 동정이 불확실하였던 36 주를 수집하였다. 수집 당시 분리 배지로 서울의대 보라매병원 (9 주), 한양의대 구리병원 (13 주), 연세의대 세브란스병원 (4 주) 및 건국의대 민중병원 (3 주)에서는 SDA를 사용하였고, 가톨릭의대 성모병원 (7 주)에서는 Potato dextrose agar-Cornmeal-Tween 80 배지를 사용하였다.

2) 표준 공시 균주: 일본 지바대학 진균의학연구소 및 일본 식품안전청에 등록되어 있는 11 종, 11 주 및 대구 가톨릭피부과의원에서 동정한 3주를 포함하였다(Table 1).

2. 임상 분리주의 진균학적 검사

임상분리주를 대상으로 다음의 7 가지 진균학적 검사를 통상적인 방법으로 실시하였다⁹.

1) Sabouraud dextrose agar(SDA)에서의 배양 소견 관찰

SDA에 진균을 접종하여 25°C에서 3 주간 배양하여 관찰하였다.

2) Potato dextrose agar(PDA)에서의 배양 소견 관찰

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

Organism	Source	DNA bands with OPAO-15(kbp)
<i>T. rubrum</i>	IFM 48102	1.50, 1.04, 0.74
	TR1	1.54, 1.06, 0.75
	TR2	1.54, 1.07, 0.76
<i>T. mentagrophytes</i>	IFM 47707	1.49, 1.33, 0.87
	TM1	1.52, 1.36, 0.88
<i>T. raubitschekii</i>	IFM 45579	1.52, 1.06, 0.76
<i>T. tonsurans</i>	IFM 47710	1.35, 0.98, 0.90
<i>T. equinum</i>	HMC 9014	1.47, 1.33, 0.95
<i>T. violaceum</i>	IFM 41075	1.86, 1.54, 1.09
<i>T. terrestre</i>	IFM 45102	1.82, 1.34, 1.27, 1.08, 0.63
<i>M. canis</i>	IFM 48118	1.61, 0.82, 0.56
<i>M. gypseum</i>	IFM 48117	1.52, 1.28, 1.19, 0.97
<i>M. persicolor</i>	IFM 5319	1.07, 0.80
<i>E. 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

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

TR1, TR2 & TM1 : Clinical isolates identified and donated by Prof. SB Suh, Catholic Skin Clinic, Taegu, Korea

PDA에 진균을 접종하여 25℃에서 3 주간 배양하였으며, 특히 배지의 이면에서 *T. rubrum*에서 나타나는 적색소가 생성되는지를 관찰하였다.

3) 비타민 요구성 검사

비타민이 첨가되지 않은 Casamino acids agar(Trichophyton agar 1, Difco, USA)에 진균을 접종하여 25℃에서 2 주간 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℃에서 1 주 및 2 주간 배양하여 관찰하였으며, 배지의 색깔이 황색에서 분홍색으로 변하면 양성으로 하였다.

5) 온도에 대한 감수성 검사

Chloramphenicol 및 cycloheximide가 포함된 SDA에 진균을 접종하여 25℃와 37℃에서 2주간 배양을 하여 2가지 온도에서의 성장 속도를 비교하였다.

6) 모발 천공 검사

0.05% yeast extract 용액에 소독된 모발을 넣고 진균을 접종하여 25℃에서 배양하였다. 배양 1주와 2주 후에 모발을 꺼내어 lactophenol cotton blue 용액으로 염색하여 관찰하였으며, 모발에 썩기 모양의 perforating organ이 관찰되는 경우 양성으로 하였다.

7) 현미경 하에서의 형태학적 관찰

PDA에 접종하여 25℃에서 2 주간 배양된 균집락을 취하여 lactophenol cotton blue로 염색한 후 균사의 형태, 소분생자와 대분생자의 유무 및 형태, 분생자의 균집 상태를 관찰하였다.

3. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis

표준 균주 및 임상 분리주를 대상으로 저자들의 이전

Table 2. Identification of 36 clinical isolates by 7 mycological tests

Identification	Number of strains
<i>T. rubrum</i> (typical)	24
<i>T. mentagrophytes</i> (typical)	2
<i>T. raubitschekii</i>	2
<i>T. rubrum</i> (var. <i>colorless</i>)	2
<i>T. rubrum</i> with diffusible pigment	2
Non-dermatophytic mould	4
Total	36

논문에 기술된 방법¹¹⁾을 다소 변형하여 시행하였다.

1) 균주의 순수 배양과 harvest

SDA 평판배지 위에 소독된 투석막을 놓고, 진균을 도말 접종하여 25℃에서 1-2주간 배양하였다. 투석막 표면의 균 집락을 긁어서 1.5ml Eppendorf tube에 모은 뒤 ×1 TE buffer로 세척하였다.

2) 진균 DNA의 추출

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

3) PCR

반응액은 주형 DNA 5 μl(50ng), 10mM dNTP mix(Perkin Elmer, USA) 4 μl, primer(20pmol/μl) 1.25 μl, 10X PCR buffer 5 μl, Taq. DNA polymerase(5Unit/μl, Perkin Elmer, USA) 0.25 μl 및 증류수 34.5 μl를 포함하여 총 50 μl로 하였다. 적합한 random primer 선정을 위한 예비 실험에서 OPAO-15(5'-GAAGGCTCCC-3'), ATGS(5'-ATGGATC(G,C)(G,C)C-3') 및 ATG(5'-ATGGATCGGC-3', 이상 Operon Te-

Table 3 Results of mycological tests of atypical dermatophytes and non-dermatophytic moulds

strain	surface on SDA	Color on PDA	Vitamine requirement	uresae test	Growth at 37℃	Hair perforation	Microscopic findings	Identification according to mycological tests
ID3	powdery	red	-	+	good	-	micro(++), macro(+)	<i>T. raubitschekii</i>
ID6	cottony	brown/diffusible	-	-	good	-	micro(+)	<i>T. rubrum</i> (diffusible pigment)
ID8	cottony	no pigment	-	-	good	-	micro(++)	<i>T. rubrum</i> var. <i>colorless</i>
ID15	cottony	no pigment	-	-	good	-	micro(+)	<i>T. rubrum</i> var. <i>colorless</i>
ID28	cottony	brown/diffusible	-	-	good	-	micro(+)	<i>T. rubrum</i> (diffusible pigment)
ID18	cottony	red	-	+	good	-	micro(++), macro(+)	<i>T. raubitschekii</i>
ID11	powdery	yellow	-	+	no growth	-	micro(++): aleurioconidia	r/o <i>Chrysosporium</i> spp.
ID21	powdery	no pigment	-	+	restricted	+	micro(+): aleurioconidia	r/o <i>Chrysosporium</i> spp.
ID22	powdery	no pigment	-	+	restricted	+	micro(++): arthroconidia	r/o <i>Malbranchea</i> spp.
ID23	cottony	no pigment	-	+	no growth	-	micro(+): aleurioconidia	r/o <i>Chrysosporium</i> spp.

Fig. 1. Colony morphologies of dermatophytes(PDA 25°C, 3 week)
A. Typical *T. rubrum* with cottony surface and red pigment
B. *T. raubitschekii* with powdery surface and red pigment(ID3)
C. *T. rubrum* var. *colorless*(ID8)
D. *T. rubrum* with diffusible pigment(ID6)

Fig. 3. Band patterns of reference strains of dermatophytes produced by RAPD analysis with primer OPAO-15(5'-GAAGGCTCCC-3'). Lanes 1&9, size marker; lanes 2 to 4, *T. rubrum*; lanes 5&6, *T. mentagrophytes*; lane 7, *T. raubitschekii*; lane 8, *T. tonsurans*; lane 10, *T. equinum*; lane 11, *T. violaceum*; lane 12, *T. terrestre*; lane 13, *M. canis*; lane 14, *M. gypseum*; lane 15, *M. persicolor*; lane 16, *E. floccosum*.

당 2개 내지 7 개 정도의 명확한 band가 생산되어 분석이 가장 용이하였으므로 이를 임상 분리주의 동정을 위한 primer로 선정하였다. PCR은 미국 MJ Research Inc.사의 thermal cycler를 사용하여 94°C에서 2분간 변성 후, 94°C 1분, 34°C 1분, 72°C 2분을 1회로 하여 40회 시행한 뒤 7

Fig. 2. Colony morphologies(SDA 25°C, 3 week) and microscopic findings of non-dermatophytic moulds(Lactophenol cotton blue, ×400).

chnologies, USA)를 사용하여 PCR을 실시하였으며, 이중 OPAO-15를 사용할 때 모든 표준 공시 균주에서 한 균주

2°C에서 10 분간 반응시켰다.

4) PCR 반응 산물의 검토

Fig. 4. Band patterns of clinical isolates produced by RAPD analysis with primer OPAO-15(5'-GAAGGCTCCC-3'). M, size marker; ID3 & ID18, *T. raubitschekii*; ID6 & ID28, *T. rubrum* with diffusible pigment; ID8 & ID15, *T. rubrum* var. *colorless*; ID11, ID21, ID22 & ID23, non-dermatophytic moulds.

PCR 산물을 1.2% agarose gel에 분주하여 80volt에서 80분간 전기 영동한 후 ethidium bromide로 염색하였다. Size marker로는 MassRuler™ 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.

연구 결과

1. 진균학적 동정 결과

진균학적 검사 결과를 종합하여 36 주의 임상 분리주 중 32주는 피부사상균으로, 4주는 피부사상균이 아닌 것으로 동정하였다(Table 2, 3). 전형적인 *T. rubrum*으로 동정된 24주는 cottony 내지 velvety한 표면을 가지고 있었으며 배지 뒷면에서 적색소가 관찰되었다(Fig. 1A). 또한 비타민 요구성이 없었고, urease 생성 검사 음성, 37°C에서 성장 가능, 모발 천공 검사 음성이었고 현미경 하에서는 구형 내지 난구형의 소분생자가 소수 관찰되었다. *T. mentagrophytes*로 동정된 2주는 powdery한 표면을 가지고 있었고 배지 뒷면은 옅은 갈색을 띄고 있었으며 비타민 요구성은 없었다. 또한 urease 생성 검사 양성, 37°C에서

성장 가능, 모발 천공 검사 양성이고 현미경 하에서 포도송이 모양으로 군집된 다수의 소분생자가 관찰되었다. *T. raubitschekii*로 동정된 2주(ID3, ID18)는 다른 진균학적 검사 결과는 전형적인 *T. rubrum*과 동일하였으나 표면이 분말형, 소분생자가 다수 관찰되고 대분생자가 드물지 않게 관찰되었으며 urease 생성 검사상 양성이어서 *T. raubitschekii*로 동정하였다(Fig. 1B). 한편 *T. rubrum*의 아형으로 생각되는 균주가 4 주 관찰되었는데, 이들은 다른 진균학적 검사 결과는 전형적인 *T. rubrum*과 동일하였으나 2주(ID8, ID15)는 배지의 뒷면에서 적색소가 관찰되지 않아 *T. rubrum* var. *colorless*로(Fig. 1C), 2주(ID6, ID28)는 배지를 갈색으로 착색시키고 있어서 배지착색형 *T. rubrum*(*T. rubrum* with diffusible pigment)으로 동정하였다(Fig. 1D).

한편 또 다른 4주(ID11, ID21, ID22, ID23)는 균집락의 표면이 응모형 또는 분말형이면서 이면에서 적색소가 관찰되지 않았고 urease 생성 검사 양성이었으므로 *T. mentagrophytes*와 매우 유사하였으나 모든 균주가 37°C에서 생장이 억제되어 피부사상균이 아닌 것으로 생각되었다(Table 3, Fig. 2). 현미경 하에서 ID11, ID21, ID23는 피부사상균의 소분생자보다 크기가 큰 아래우리오형의 소분생자(aleurioconidia)가 관찰되어 *Chrysosporium* 속으로, ID22는 폭이 좁은 분절형의 분생자(arthroconidia)가 관찰되어 *Malbranchea* 속으로 생각되었다 (Fig. 2).

Table 4. Identification of 36 clinical isolates by RAPD analysis with primer OPAO-15(5'-GAAGGCTCCC-3')

Identification	Number of strains
<i>T. rubrum</i> or <i>T. raubitschekii</i>	30
<i>T. mentagrophytes</i>	2
Non-dermatophytic moulds	4
Total	36

2. RAPD analysis에 의한 동정 결과

11종의 표준 공시 균주 모두에서 primer OPAO-15에 의하여 각 균종에 특이한 DNA band pattern이 생산되었으며 이를 이용하여 각 균종을 동정할 수 있었다. 그러나 *T. rubrum*과 *T. raubitschekii*는 동일한 band pattern이 관찰되

어 이 두 균종을 구별할 수 없었다 (Table 1, Fig. 3).

임상 분리주에 대한 실험에서는 (Table 4, Fig. 4) 진균학적으로 전형적인 *T. rubrum*으로 동정이 된 24 주, *T. raubitschekii*로 동정된 2주 (ID3, ID18) 및 *T. rubrum*의 비전형적인 아형으로 동정되었던 4주 (ID8, ID15, ID6, ID28)는 *T. rubrum* 또는 *T. raubitschekii*의 표준 균주와 동일한 band pattern을 보였고, 진균학적 검사 상 *T. mentagrophytes*로 동정된 2주는 *T. mentagrophytes*의 표준 균주와 동일한 band pattern을 나타내었다. *T. rubrum* 임상 분리주 일부에서 관찰되는 0.36kbp의 DNA band는 primer의 dimer로 생각되어 의미가 없는 것으로 생각되었다. 한편 피부사상균이 아닌 것으로 생각되었던 4 주들의 결과를 보면 ID11이 0.96, 0.56, 0.49, 0.43kbp, ID21이 0.68kbp, ID22가 0.90, 0.79, 0.46kbp, ID23이 0.97, 0.82, 0.66, 0.41kbp의 DNA band가 관찰되어 표준 균주의 DNA band pattern과 일치되는 것이 없었다. 따라서 이 4 주들은 본 연구에서 사용된 11종의 피부사상균은 아닌 것으로 생각되었다.

3. 의뢰 시 미동정 원인에 대한 분석

임상 분리주 36주의 진균학적 및 분자생물학적 검사 결과를 종합하여 볼 때 연구 의뢰 시 동정이 어려웠던 원인을 4 가지로 나누어 볼 수 있었다.

1) 분리 배지에서도 전형적인 모습이 관찰되었으므로 처음 동정한 연구자의 동정 기술이 미숙하였던 것으로 생각된 경우 : 2 주 (5.6%)

2) 분리 배지에서는 전형적인 모습이 관찰되지 않았으나 각종 진균학적 검사를 시행하여 전형적인 모습을 유도할 수 있었던 경우 : 24 주 (66.7%)

3) 피부사상균의 비전형적인 아형 균주 또는 드물게 분리되는 피부사상균이 배양된 경우 : 6 주 (16.7%)

4) 피부사상균이 아니었던 경우 : 4 주 (11.1%)

고 찰

피부사상균의 동정은 대개 집락의 모양 및 현미경 하에서 균사와 포자의 형태학적 특징을 관찰하여 내리고 있다. 그러나 피부사상균의 형태는 한가지 균종 내에서도 다양하며 배양 조건에 따라 달라질 수가 있고, 특히 계대 배양을 오래 할 경우는 흡도 변성을 일으켜서 전형적인 모습을 상실하게 된다^{1,2,8,9}. 형태학적 특징의 관찰로 동정이 어려운 경우 urease 생성 검사, 비타민 요구성 검사, 모발 친공 검사 및 교배 실험과 같은 진균학적 검사를 시행하게 되는데 이러한 검사들을 시행하기 위해서는 경험이 필요하고 시간이 오래 걸리며, 때로 이러한 검사를 실시한 후에도 동정이 확실하지 않을 수 있다^{8,9}. 본 실험에서도 임상 분리주 36주 중 *T. rubrum*의 비전형적인 아

형으로 동정된 4주 및 피부사상균이 아닌 진균으로 생각된 4주에 대하여는 본 실험에서 사용된 7가지 진균학적 방법으로 확정 동정을 할 수 없었다. 피부사상균의 비전형적인 아형 균주를 확정 동정하기 위하여는 완전형 (teleomorph)을 사용하여 교배 실험을 실시하는 것이 좋은 것으로 알려져 있지만 *T. rubrum*의 경우와 같이 아직 완전형이 알려져 있지 않은 균종에 대하여는 교배 실험을 할 수가 없다¹². 한편 피부사상균이 아닌 것으로 생각된 균주들의 동정을 위하여는 매우 다양하고 복잡한 진균학적 검사들을 추가로 실시하여야 한다². 따라서 이러한 경우에 분자생물학적인 동정 방법을 사용하는 것이 필요하다고 할 수 있다.

피부사상균의 동정을 위한 기존의 진균학적인 방법의 문제점을 해결하기 위하여 1990년대 초부터 다양한 분자생물학적인 기법이 도입되어 왔으며, restriction fragment length polymorphism (RFLP), RAPD analysis 및 염기서열 분석법에 의하여 이미 성공적으로 동정이 된 바 있다^{8,9}. RAPD analysis는 이러한 여러 분자생물학적 방법 중에서도 가장 신속하면서 경제적이고, 주형 DNA의 염기서열을 모를 때도 수행할 수 있다는 장점을 가지고 있다^{12,13}. 따라서 피부사상균의 동정에 많이 이용되고 있으며 국내에서도 여러 연구 결과가 보고되어 있다^{11,14,15}. 그러나 RAPD analysis를 사용하여 의미있는 결과를 얻기 위해서는 실험의 재현성이 확립되어 있어야 하며, 실험 목적에 맞는 적합한 primer를 선정하여야 한다. 본 연구자들은 이전의 연구에서 RAPD analysis의 재현성 및 primer 선정에 대하여 연구한 바 있으며^{11,16,17}, 이번 연구에서도 임상 분리주의 동정을 위한 가장 적합한 random primer를 선정하기 위한 예비 실험을 통하여 primer OPAO-15를 선정하였다.

본 실험에서 대상이 된 11종의 표준 공시 균주들은 primer OPAO-15에 의하여 각 균종에 특이한 band pattern을 보였으며 이에 의하여 각 균종을 구별할 수 있었다. 그러나 *T. rubrum*과 *T. raubitschekii*는 동일한 band pattern을 보여 구별할 수 없었으며, 이 두 균종은 본 실험의 예비 실험에서 사용한 다른 primer 들에 의하여도 구별되지 않았다(data는 제시하지 않음). 최근 Summerbell은 *T. rubrum*과 이의 유사 균종인 *T. raubitschekii*, *T. fischerii*, *T. kanei*를 대상으로 internal transcribed spacer1(ITS1) 부분의 염기서열을 분석하였으며 4 균종의 결과가 모두 동일하다고 보고하였다¹⁸. 이들이 분석한 ITS1 부분은 진균의 ribosomal DNA 중에서도 가장 많은 다양성을 보이는 부분이다. 따라서 *T. rubrum*과 *T. raubitschekii*는 별도의 균종으로 분류하기 어려울 정도로 유사하거나 또는 동일한 균종이라고 생각되며 이에 대하여는 향후 더 많은 검토가 있어야 할 것이다.

임상 분리주의 RAPD analysis 결과를 살펴보면 진균학

적 검사에서 *T. rubrum*의 비전형적인 아형으로 동정된 균주들의 band pattern은 *T. rubrum*의 표준 균주와 동일한 결과를 보이므로 *T. rubrum*으로 확정지을 수 있었고, 따라서 RAPD analysis는 비전형적인 모습을 나타내는 피부사상균의 확정 동정에 매우 유용한 검사법이라고 생각되었다. 그러나 피부사상균이 아닌 것으로 생각된 4균주의 DNA band pattern은 표준 균종의 것과 동일한 것이 없었으므로 본 실험의 RAPD analysis로 동정할 수가 없었다. 이와 같은 점은 대상 균주의 DNA band pattern이 표준 균주의 DNA band pattern과 동일한가 아닌가에 따라 균종을 결정하게 되는 RAPD analysis의 한계라고 할 수 있다. 즉 RAPD analysis에 좀더 광범위한 표준 균종을 포함시키거나 random primer를 좀더 다양하게 사용할 경우, 대상 균주가 어떤 표준 균종과 동일한 band pattern을 보일 가능성을 배제할 수 없기 때문이다.

본 실험에 사용된 임상 분리주들이 의뢰될 당시의 소견을 토대로 하여 미동정 원인을 분석하여 보면 약 70%가 분리 배지에서 전형적인 모습이 관찰되지 않아서 동정이 어려웠던 경우에 속하였다. 현재 국내에서는 피부과 환자 검체의 분리 배지로 SDA, 또는 SDA에 항생제 및 항진균제를 포함시킨 Mycobiotic(Mycosel) 배지를 흔히 사용하고 있다. 그러나 이러한 배지들보다는 PDA를 사용할 때 배지의 이면에서 *T. rubrum*의 적색소 형성이 잘 되고, *T. mentagrophytes*의 소분생자 및 대분생자의 형성이 촉진되는 것이 알려져 있다¹⁹. 우리 나라 피부과 환자로부터 분리되고 있는 피부사상균의 약 90%가 *T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*이며¹ 이번 연구에서도 미동정 임상 분리주의 약 90%가 *T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*이었던 점을 고려할 때, 피부과 환자 검체의 분리 배지로는 항생제 및 항진균제가 포함된 PDA를 선택하는 것이 실용적이라고 생각된다.

결 론

저자들은 피부사상균으로 생각이 되지만 형태학적인 관찰만으로는 동정이 어려웠던 임상 분리주 36주를 대상으로 7가지 진균학적 검사와 함께 분자생물학적인 방법의 일종인 RAPD analysis를 이용하여 동정을 하였다. 진균학적 검사로 28주(77.8%)는 확정 동정을 할 수 있었으나, *T. rubrum*의 아형 균주로 생각된 4주(11.1%)와 피부사상균이 아닌 것으로 생각된 4주(11.1%)는 확정 동정이 되지 않았다. Primer OPAO-15(5'-GAAGGCTCCC-3')를 이용한 RAPD analysis를 실시하여 11종의 표준 균주에서 각 균종에 특이한 DNA band pattern이 관찰되어 동정이 가능하였으나, *T. rubrum*과 *T. raubitschekii*는 동일한 DNA band pattern이 관찰되어 구별할 수 없었다. 이는 이 두 균

종이 동일하거나 매우 유사한 균종이기 때문으로 생각되었다. 임상 분리주에 대한 RAPD analysis결과를 이용하여 전형적인 피부사상균 뿐만 아니라 비전형적인 피부사상균도 확정 동정이 가능하였으며, 따라서 RAPD analysis는 피부사상균의 아형 균주의 확정 동정에 매우 유용한 검사법으로 생각되었다. 그러나 피부사상균이 아닌 것으로 생각된 4주는 RAPD analysis를 이용하여 동정이 되지 않았으며, 이는 RAPD analysis를 진균의 동정에 이용할 때의 한계점으로 생각되었다. 한편 피부과 검체의 분리 배지로는 *T. rubrum*에 특이한 적색소 형성이 우수하고 분생자 형성이 왕성한 PDA를 사용하는 것이 SDA를 사용하는 것보다 더 실용적인 방법이라고 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Summerbell R, Kane J. Physiological and other special tests for identifying dermatophytes. In: Kane J, Summerbell R, Sigler L, Krajden S, Land G, editors. Laboratory Handbook of Dermatophytes. Belmont:Star Publishing Co. 1997:45-79
2. 서순봉. 우리나라의 피부사상균종과 원인균의 변천. 대한의진균학회지 1996;1:1-10
3. Martin AG, Kobayashi GS. In:Freedberg IM, Deisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, Fitzpatrick TB, editors. In:Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. 5th ed. New York:McGraw-Hill. 1999:2337-2341
4. 전재복, 김영두, 이정우. 국내 레슬링 선수에 만연한 투사백선의 임상적, 진균학적 소견. 대한피부과학회지 1996;34(Suppl 2):62
5. 전재복, 최성관, 신동주, 이정주, 김도원, 이석종. 국내 중·고등학교 유도 선수에서 집단 발생한 투사백선의 임상적 및 진균학적 소견. 대한의진균학회 제 6차 학술대회 초록집, 1999, 31
6. 김상원. 장효찬. 토끼에서 전염된 *Trichophyton mentagrophytes* 감염증과 그 균학적 성상. 대한의진균학회지 1999;4:117-123
7. 김기홍, 문병천, 최중수. 대구지역 백선 환자에서 분리된 *Trichophyton* 속의 진균학적 성상 및 아형의 분류. 대한의진균학회지 1997;2:129-43
8. 김기홍. 피부사상균의 동정. 대한의진균학회지 1997;2: 1-8
9. 김정애. 피부사상균의 배양, 동정 및 특수검사. 제 1회 대한의진균학회 Workshop 초록집 1998, 9-29
10. Makimura K, Goto H, mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Yamaguchi H. Molecular biological approach to phylogeny and identification of dermatophytes. Jpn J

Med Mycol 1997;38:5-8

11. Kim JA, Norma BG, Okuda K, Takaki GMC, Fukushima K, Nishimura K, et al. Identification of *Trichophyton tonsurans* by Random Amplified Polymorphic DNA. Ann Dermatol 1999;11:135-141
12. Foster L, Kozak KR, Loftus MG, Stevens JJ, Ross IK. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. Mycol Res 1993;7:769-781
13. Mochizuki 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 (Japan) 1999;26:276-281
14. 최종수, 황계영, 김기홍, 신동훈, 이태윤, 김성광. Arbitrarily primed PCR을 이용한 피부사상균의 동정 및 분류. 대한피부연구학회지 1996;3:39-50
15. 이영선, 유재일, 최연화, 주형렬, 김봉수, 김동한. RAPD PCR분석에 의한 국내 피부사상균속 분류 및 동정. 대한진균학회지 1998;3:107-114
16. Kim JA, Takizawa K, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M. Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by random amplified polymorphic DNA. Mycopathologia 1999;145:135-141
17. JA Kim, Y Takahashi, R Tanaka, K Fukushima, K Nishimura, M Miyaji. Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. Mycoses. In press 2000.
18. 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
19. 박용묘, 최종수, 김기홍. Potato dextrose agar에서 배양한 수종 백선균의 육안적 및 현미경적 소견. 대피지 1991;29:364-379