

## Molecular Identification Patterns of Clinical Isolates from Korean Patients Infected with Dermatophytes

Sang-Ha Kim<sup>1</sup>, Seong-Wan Cho<sup>2</sup>, Seock-Yeon Hwang<sup>3</sup>, Soo-Young Jeon<sup>4</sup>  
and Young-Kwon Kim<sup>5,†</sup>

<sup>1</sup>Department of Public Health and Welfare, Graduate School of Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Konyang University, Nonsan 320-711, Korea

<sup>3</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Daejeon University, Daejeon 300-716, Korea

<sup>4</sup>Department of Dermatology, Konyang University College of Medicine, Daejeon 302-718, Korea

<sup>5</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University College of Biomedical Science, Daejeon 302-718, Korea

The aim of this study was to compare the results of morphological phenotypic examination and molecular biological method, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) using clinical isolates from Korean patients infected with dermatophytes. A total of 44 clinical isolates have been collected by Korean Collection Medical Fungi (KCMF) and those were subjected for the RAPD analysis. The results showed that the fungal strains that have RG1 band patterns were identified as *Trichophyton rubrum* by the neighbour-joining analysis. Additionally, other fungal strains that have RG3 band patterns were identified as *Epidermophyton floccosum* and RG5 band patterns were identified as *Micorsporum gypseum*. Even though molecular biological method such as RAPD are not necessary, it might be useful when some strains have similar morphological characteristics or when same species has phenotypic variations. In this study, therefore, we targeted internal transcribed spacer (ITS) regions of fungal rDNA, performed RAPD and then compared with morphological phenotypic examination.

**Key Words:** Dermatophytes, Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD), ITS, Fungal rDNA

### 서 론

피부사상균 (dermatophytes)은 사람이나 동물의 피부, 모발, 손톱 등 각화성 조직에 침투할 수 있는 능력을 가진 진균의 한 그룹으로서, 백선이라고 하는 피부사상균증을 일으킨다 (Kimura, 1980; Hamelin et al., 1993; Arenas et al., 1995; Evans, 1998; Aly et al., 2000; Elewski, 2000; Aman et al., 2001). 우리나라의 경우 *Epidermophyton*, *Trichophyton*, *Microsporum* 등이 보고되어 있고, 그 중 *Trichophyton rubrum*은 우리나라를 포함한 전 세계적으로 가장 많이 분리되는 대표적인 피부사상균이다 (Lui et al., 1996). 진균의 동정은 전통적으로 집락의 특성과 포자 및 균사의

현미경적 특성에 따라 이루어지고 있다. 그러나 균종에 따라서는 다양한 형태의 아형을 가지고 있기 때문에 분류 동정하는데 어려운 점이 많이 있다. 아직은 미약하지만, 최근 분자생물학적 방법에 의한 피부사상균의 진단과 분류 동정방법이 시도되고 있다 (Mazurek et al., 1996). 그 중 PCR 방법은 계통 분류와 집단 연구에서 널리 이용되고 있으며, 진균 동정에는 internal transcribed spacer (ITS)와  $\beta$ -tubulin 유전자 부위를 이용한 동정이 많이 이용되고 있다 (Mitchell et al., 1999). 그리고 random amplified polymorphic DNA (RAPD)는 무작위로 인위 합성된 primer 혹은 그 이상 크기의 oligonucleotide들을 primer로 어떤 중간 혹은 속간의 유전적 변이를 탐색하는 기술로서 PCR (Polymerase Chain Reaction) 내에 Taq. polymerase와 공시 균주의 DNA 및 primer를 넣고 thermal cycler를 돌려 유전자 혹은 DNA 특정 부위만을 증폭 (amplification) 시켜서 DNA 다형성을 유도하며, target gene sequence에 대한 사전 정보가 없이도 PCR을 통해 기존의 RFLP보

\*접수일: 2009년 11월 16일 / 수정일: 2010년 9월 16일  
채택일: 2010년 9월 27일

†교신저자: 김영권, (우) 302-718 대전광역시 서구 가수원동 685,  
건양대학교 의과대학 임상병리학과  
Tel: 042-600-6371, Fax: 042-600-6314  
e-mail: ykkim3245@konyang.ac.kr

다 훨씬 빠르고 경제적인 방법으로 알려져 있다 (Sabota et al., 1996; Roldan et al., 2000; Nweze, 2001; Rubio-Calyo et al., 2001).

따라서 본 논문에서는 한국인의 병소에서 분리한 기존의 피부사상균에 대한 형태학적인 특징에 의한 동정 결과와 분자생물학적 방법을 이용한 동정 결과를 비교 고찰하여 동정의 정확성을 기하고자 하였다.

## 재료 및 방법

실험에 사용된 균주들은 Table 1에서와 같이 국내 대학 병원 피부과에서 14~79세 남녀 환자의 손톱, 발톱, 발바닥, 사타구니, 엉덩이 등에서 분리되어 한국의진균자원 센터 (KCMF)에 보존 중인 48균주 (KCMF 10001-10048)를 사용하였다 [Table 1]. 균주들은 Potato dextrose agar에 접종하여 25°C에서 2~3주간 배양하여 DNA extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

Template DNA 추출을 위해 평판 및 액체 배양한 균의 DNA를 추출하였다 (Thompson et al., 1997). Primer는 PELF는 5'-ATATCATCGAAGCCGC-3'를 URP-1F는 5'-ATCCAGGTCCGAGACAACC-3'를 사용하였다.

PCR 반응 조건으로는 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% (w/v) gelatin, 200 mM dNTP mixture, 50 pM primer, Taq polymerase 0.025 units/μl로 하고 template DNA 농도는 0.1 μg/μl로 반응 혼합물이 50 μl가 되도록 하였다. 반응 조건에서 1차 denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 2분, extension은 72°C에서 1분으로 35회 반복하였다. 마지막에 extension은 72°C에서 7분 시행하여 최적 PCR 반응 조건을 검토하였다. Thermal cycler는 Perkin Elmer 9600을 사용하였고 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel에서 150 volt로 1시간 전기 영동시킨 후, ethidium bromide로 염색하여 자외선 발광기 (UV)로 관찰하였다. 염기서열 분석은 PCR한 template DNA를 가지고 ITS 영역의 primer인 ITS1 (5'-TCCGTA-

Table 1. List of clinical isolates from Korean patients infected with dermatophytes

(F: female, M: male)

Strain number	Isolated date	Isolated from			Strain number	Isolated date	Isolated from		
		Sex	Age	Source			Sex	Age	Source
KCMF10001	-	-	-	-	KCMF10025	2007-01-31	F	34	Nail
KCMF10002	2007-01-27	F	39	Web	KCMF10026	2007-02-01	M	54	Web
KCMF10003	2007-01-27	M	50	Nail	KCMF10027	2007-02-01	M	21	Hip
KCMF10004	2007-01-27	M	14	Sole	KCMF10028	2007-02-01	M	55	Web
KCMF10005	2007-01-29	F	46	Web	KCMF10029	2007-02-01	M	53	Web
KCMF10006	2007-01-29	M	41	Sole	KCMF10030	2007-02-01	M	40	Web
KCMF10007	2007-01-29	M	56	Web	KCMF10031	2007-01-19	M	61	Nail
KCMF10008	2007-01-29	M	79	Web	KCMF10032	2007-01-19	-	-	-
KCMF10009	2007-01-29	M	45	Web	KCMF10033	2007-01-25	F	56	Nail
KCMF10010	2007-01-29	M	57	Web	KCMF10034	2007-01-25	M	47	Web
KCMF10011	2007-01-29	M	40	Web	KCMF10035	2007-01-25	M	65	Web
KCMF10012	2007-01-29	-	-	-	KCMF10036	2007-01-25	F	52	Web
KCMF10013	2007-01-29	M	40	Web	KCMF10037	2007-01-25	M	63	Web
KCMF10014	2007-01-29	F	33	Web	KCMF10038	2007-01-26	F	48	Sole
KCMF10015	2007-01-22	M	70	Web	KCMF10039	-	-	-	-
KCMF10016	2007-01-22	M	47	Web	KCMF10040	-	-	-	-
KCMF10017	2007-01-22	M	18	Nail	KCMF10041	-	-	-	-
KCMF10018	2007-01-22	M	52	Sole	KCMF10042	-	-	-	-
KCMF10019	2007-01-22	F	57	Nail	KCMF10043	-	-	-	-
KCMF10020	2007-01-22	M	40	Web	KCMF10044	-	-	-	-
KCMF10021	2007-01-22	-	-	-	KCMF10045	-	-	-	-
KCMF10022	2007-01-22	M	53	Web	KCMF10046	-	-	-	-
KCMF10023	2007-01-31	F	51	Groin	KCMF10047	-	-	-	-
KCMF10024	2007-01-31	F	58	Nail	KCMF10048	-	-	-	-

GGTGAACCTGCGG-3')와 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT-GATATG-3')를 이용하였다 (Welsh & McClelland, 1990).

염기서열 반응은 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (ABI)를 사용하여 560 bp의 ITS 영역의 염기서열을 얻었다. DNA editing은 seqman program in DNASTAR lasergene computer package를 사용하였고, 염기서열 정렬은 MEGA 4.0 프로그램의 CLUSTAL W을 사용하였다 (White et al., 1990).

Neighbour-Joining 분석은 MEGA 4.0을 이용하였고,

Tamura-Nei parameter의 distance를 가지고 Bootstrap 분석은 1,000 반복을 하였다 (Williams et al., 1990).

## 결 과

Table 1과 같이 한국인의 병소에서 분리하여 보관 중인 KCMF10001부터 KCMF10048까지의 48균주 중에 KCMF10001과 KCMF10021, KCMF10029, KCMF10030 등을 제외한 총 44개의 균주로 RAPD를 수행하였다. Fig.

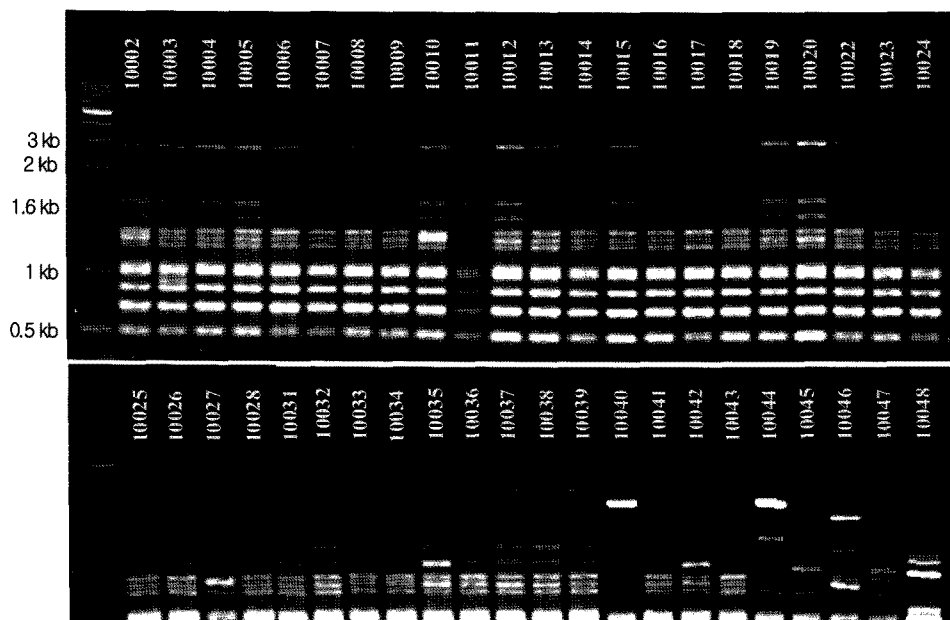


Fig. 1. RAPD patterns of dermatophytes genomic DNA by PELF primers

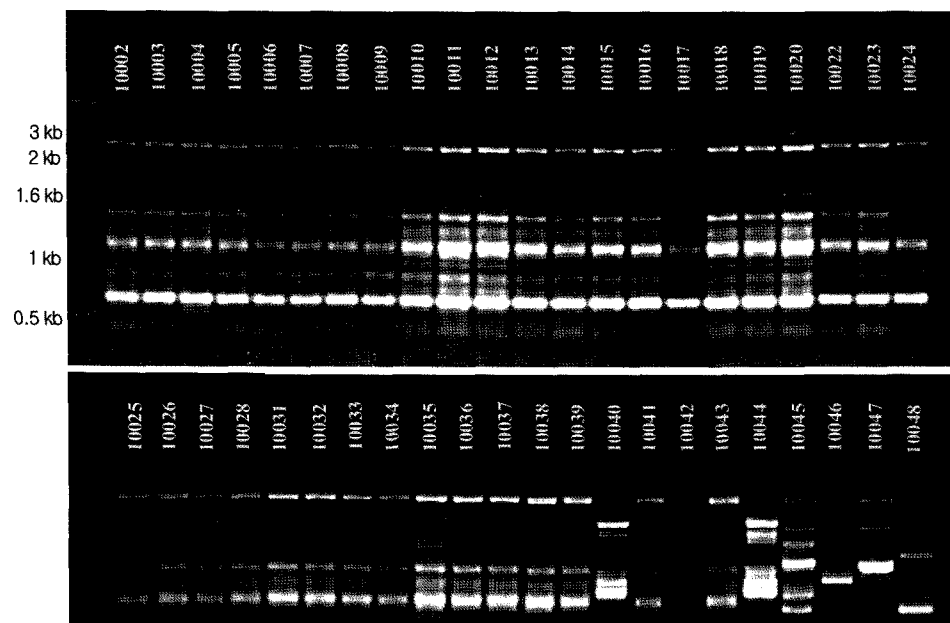


Fig. 2. RAPD patterns of dermatophytes genomic DNA by URP-1F primers

1과 2를 보면, KCMF10002부터 KCMF10020, KCMF-10022부터 KCMF10028, KCMF10031부터 KCMF10039, KCMF10041 그리고 KCMF10043은 RAPD 결과에서 가장 많았고 RAPD group (RG) 1으로 분류하였다. RG2는 KCMF10040과 KCMF10044로 밴드 패턴이 RG1과 달리 PELF 프라이머를 이용한 RAPD에서 3 kb 지점의 밴드가 없고 2.5 kb와 1.8 kb 지점의 밴드가 뚜렷하게 나타났

다. 그러나 URP-1F 프라이머에서는 1.8 kb와 1.3 kb에서 밴드가 나타났다. 따라서 RG1과 RG2를 다른 그룹으로 분류하였다. KCMF10042에서는 두 프라이머에서 모두 3 kb와 1.6 kb에서 밴드가 나타나지 않아 RG3로 분류하였다. KCMF10045는 PELF 프라이머에서 RG3와 밴드 패턴이 비슷하나 1.8 kb와 2.2 kb에서 밴드가 보여 RG4로 분류하였다. KCMF10046은 PELF 프라이머에서 RG4와 유

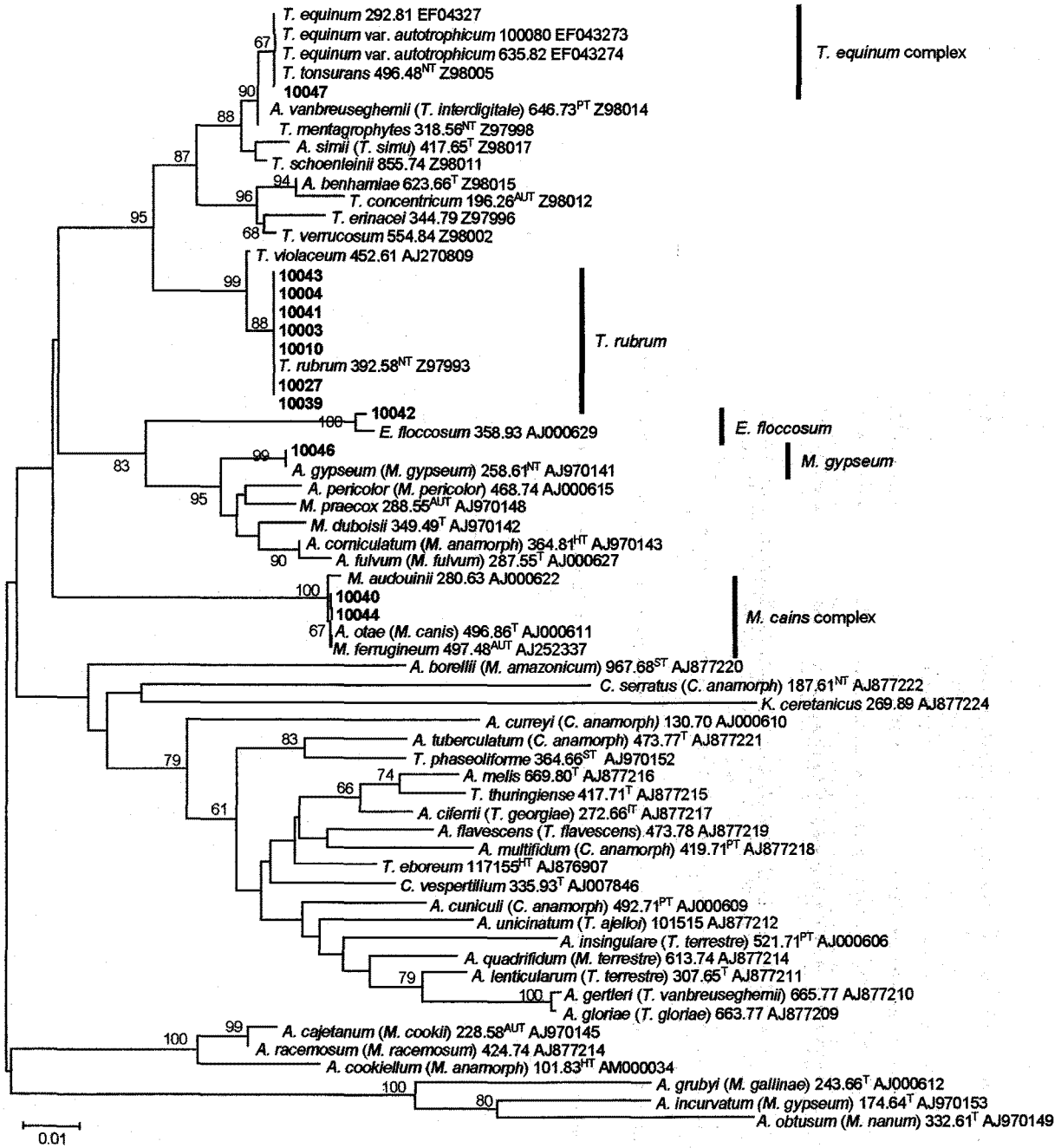


Fig. 3. Phylogenetic tree of dermatophytes. The tree was constructed from Neighbor-Joining analysis of ITS region by MEGA 4.0

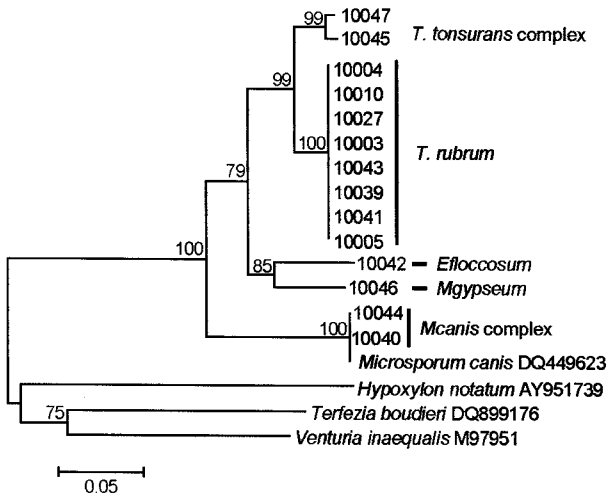


Fig. 4. Phylogenetic tree of dermatophytes. The tree was constructed from Neighbor-Joining analysis of beta-tubulin gene by MEGA 4.0

사하나 1.6 kb와 2 kb 사이에서 차이를 보여 RG5로 분류하였다. KCMF10047은 두 프라이머에서 모두 RG1과 유사하나 1.6 kb와 3 kb사이의 밴드 패턴의 차이를 보여 RG6로 분류하였다. KCMF10048은 RG6과 유사하나 두 프라이머에서 1.6 kb 부근의 밴드 패턴의 차이를 보여 RG7으로 분류하였다. 전반적으로 PELF와 URP-1F 프라이머의 사용으로 균주들 사이의 분류가 가능했고 다양한 밴드 패턴을 보였다. 그 결과 KCMF의 44균주로 RAPD를 통해 RG1부터 RG7까지 7가지 분류가 가능하였다. RAPD로 1차 분류를 마친 KCMF 균주 중에서 특징적인 밴드를 보인 15균주 (KCMF10003, 10004, 10010, 10027, 10029, 10038, 10039, 10040~10047)로, Fig. 3에서 보여주는 바와 같이, rDNA의 ITS 영역으로 neighbour-joining 분석을 하였다. 그 결과 크게 *Trichophyton*과 이름을 가지는 *Microsporium*으로 분류되고, *Trichophyton*는 *T. rubrum*과 *T. equinum* complex의 분류군, *Microsporium*는 *E. floccosum*과 *M. gypseum*, *M. cains*의 분류군으로 나뉜다. RG1에 속하는 균들은 *T. rubrum*과 88 정도의 상동성을 가지고 같은 분류군에 속하였으며, 그 수 또한 가장 많았다. RG4와 RG6에 속하는 균들은 *T. equinum* complex에 속하였으며 서로 다른 계통간에 존재한다. RG3는 *E. floccosum*의 분류군이며 100의 상동성을 보였다.

RG5는 *M. gypseum*의 분류군에 속하며 100의 상동성을 보였다. RG2는 *M. cains*의 분류군에 속하며 89의 상동성을 보였다. Neighbour-joining 분석은 RAPD와 같은 결과를 보였으며, RG1과 RG3, RG5는 신뢰할 만한 균명을

보여준다. Fig. 4에서 보여주는 바와 같이, Beta-tubulin 영역 분석 결과 ITS와 유사한 결과를 보였다.

## 고찰

한국인의 병소에서 분리한 피부사상균의 분류와 동정을 위해 잘 알려진 균종의 분류에는 전통적 방법과 RAPD 결과의 RG 분류가 neighbour-joining 분석 결과에서 유사한 결과가 나왔다. 우선 RG1 밴드 패턴을 보이는 그룹이 neighbour-joining 분석에서 *T. rubrum*으로 높은 상동성을 보이며 같은 결과를 보여주고 있으며, 이는 *T. rubrum*으로 이 분류군을 명명해도 무방한 것으로 생각된다. 그리고 RG3와 RG5 역시 RAPD 밴드의 특이성과 neighbour-joining 분석 결과에서의 상동성을 봤을 때 RG3는 *E. floccosum*으로, RG5는 *M. gypseum*으로 동정된 것으로 생각된다. 나머지 RG2와 RG4, 6, 7은 좀 더 많은 종들을 추가하여 분석할 필요가 있을 것으로 생각된다. 그리고 무엇보다도 rDNA를 이용한 분석보다 RAPD가 더 다양한 분류군을 보여주고 있다. 왜냐하면 RG에서는 7개의 밴드 패턴을 가지는 분류군으로 나누지만, neighbour-joining 분석에서는 크게는 *Trichophyton* 속과 *Microsporium* 속인 2개의 속, 작게는 *T. rubrum*과 *T. equinum* complex와, *E. floccosum* 및 *M. gypseum*과 *M. cains*으로 나뉘지기 때문이다.

RAPD와 ITS와 beta-tubulin을 이용한 rDNA 분석은 서로 다른 균종 내에서 뚜렷한 차이를 보이는 반면, 같은 균종 내에서는 비슷한 밴드 패턴과 상동성을 확인할 수 있었다. 따라서 병소에서 분리한 피부사상균의 분류와 동정을 위해 잘 알려진 균종의 분류에는 전통적 방법과 RAPD와 ITS와 beta-tubulin을 이용한 rDNA 분석과 같은 분자생물학적 방법이 별 차이가 없게 나타나 일반적 검사에서는 분자생물학적 진단까지 할 필요는 없지만, 형태가 변형되거나 분류가 애매한 경우에는 RAPD와 ITS와 beta-tubulin을 이용한 rDNA 분석과 같은 분자생물학적 방법으로 진단하는 것이 매우 유용성이 있을 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- Aly R, Hay RJ, Del Palacio A, Galimberti R. Epidemiology of tinea capitis. *Med Mycol.* 2000. 38: 183-188.
- Aman S, Haroon TS, Hussain I, Bokhari MA, Khurshid K. Tinea

- unguium in Lahore, Pakistan. *Med Mycol.* 2001. 39: 177-180.
- Arenas R, Dominguez-Cherit J, Fernandez LM. Open randomized comparison of itraconazole versus terbinafine in onychomycosis. *Int J Dermatol.* 1995. 34: 138-143.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. Interpretative criteria for identification of bacteria and fungi by DNA target sequencing; approved guideline. MM18-A. pl-71, Pennsylvania Clinical and Laboratory Standard Institute, 2008.
- Elewski BE. Tinea capitis: a current perspective. *J Am Acad Dermatol.* 2000. 42: 1-20; quiz 21-24.
- Evans EGV. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: A review. *J Amer Acad Dermatol.* 1998. 38: S32-S36.
- Hamelin RC, Ouellette GB, Bernier L. Identification of *Bremmeniella abietina* races with random amplified polymorphic DNA markers. *Appl Environ Microbiol.* 1993. 59: 1752-1755.
- Kimura M. A simple method for estimation evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol.* 1980. 16: 111-120.
- Lui D, Coloe S, Baird PR. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate *Trichophyton mentagrophytes*. *FEMS Microbiol Lett.* 1996. 136: 147-150.
- Mazurek GH, Reddy V, Narston BJ, Haas WH, Crawford JT. DNA fingerprinting by infrequent restriction site amplification. *J Clin Microbiol.* 1996. 34: 2386-2390.
- Mitchell TG, Sandin RL, Bowman BH. Molecular mycology: DNA probes and application of PCR technology. *J Med Vet Mycol.* 1999. 4: 32 (suppl. 1): 351-366.
- Nweze EI. Etiology of dermatophytoses amongst children in northeastern Nigeria. *Med Mycol.* 2001. 39: 181-184.
- Roldan YB, Mata-Essayag S, Hartung C. Erysipelas and tinea pedis. *Mycoses.* 2000. 43: 181-183.
- Rubio-Calvo C, Gil-Tomas J, Rezusta-Lopez A, Benito-Ruesca R. The aetiological agents of tinea capitis in Zaragoza (Spain). *Mycoses.* 2001. 44: 55-58.
- Sabota J, Brodell R, Rutecki GW, Hoppes WL. Severe tinea barbae due to *Trichophyton verrucosum* infection in dairy farmers. *Clin Infect Dis.* 1996. 23: 1308-1310.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D, G. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997. 24: 4876-4882.
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18: 7213-7218.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., New York, 1990.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990. 18: 6531-6535.