

Genetic Variations of *Trichophyton rubrum* Clinical Isolates from Korea

Nam-Sup Yoon^{1,2,§,*}, Hyunjung Kim^{3,**}, Sung-Bae Park^{4,5,***}, Min Park^{6,****},
Sunghyun Kim^{4,5,†,****} and Young-Kwon Kim^{2,†,****}

¹Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center, Seoul 05505, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences,
Konyang University, Daejeon 35365, Korea

³QuantaMatrix, Inc., Seoul 03082, Korea

⁴Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea

⁵Clinical Trial Specialist Program for in vitro Diagnostics, Brain Busan 21 Plus Program,
Graduate School, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea

⁶Department of Biomedical Laboratory Science, Daekyung University, Gyeongsan 38547, Korea

Trichophyton rubrum is one of the well-known pathogenic fungi and causes dermatophytosis and cutaneous mycosis in human world widely. However, there are not an available sequence type (ST) classification methods and previous studies for *T. rubrum* until now. Therefore, currently, molecular biological tools using their DNA sequences are used for genotype identification and classification. In the present study, in order to characterize the genetic diversity and the phylogenetic relation of *T. rubrum* clinical isolates, five different housekeeping genes, such as actin (*ACT*), calmodulin (*CAL*), RNA polymerase II (*RPB2*), superoxide dismutase 2 (*SOD2*), and β -tubulin (*BT2*) were analyzed using by multi-locus sequence typing (MLST). Also, DNA sequence analysis was performed to examine the differences between the sequences of *Trichophyton* strains and the identified genetic variations sequence. As a result, most of the sequences were shown to have highly matched rates in their housekeeping genes. However, genetic variations were found on three different positions of β -tubulin gene and were shown to have changed from C→G (1766), G→T (1876), and C→A (1886). To confirm the association with *T. rubrum* inheritance, a phylogenetic tree analysis was performed. It was classified as four clusters, but there was little significant correlation. Even so, MLST analysis is believed to be helpful for determining the genetic variations of *T. rubrum* in cases where there is more large-scale data accumulation. In conclusion, the present study demonstrated the first MLST analysis of *T. rubrum* in Korea and explored the possibility that MLST could be a useful tool for studying the epidemiology and evolution of *T. rubrum* through further studies.

Key Words: *Trichophyton rubrum*, Multi-locus sequence typing, Genetic variations, Clinical isolates

Received: August 17, 2018 / Revised: September 13, 2018 / Accepted: September 13, 2018

*Medical technologist, **Research scientist, ***Graduate student, ****Professor.

§Equal contributors.

†Corresponding author: Sunghyun Kim. Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 46252, Korea.

Tel: +82-51-510-0560, Fax: +82-51-510-0568, e-mail: shkim0423@cup.ac.kr

†Corresponding author: Young-Kwon Kim. Department of Biomedical Laboratory Science, College of Medical Sciences, Konyang University, Daejeon 35365, Korea.

Tel: +82-42-660-6371, Fax: +82-42-543-6370, e-mail: ykkim3245@konyang.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

피부 진균 감염증은 피부, 머리카락, 손톱, 발톱의 각질을 침습하는 피부사상균에 의해 일어나는 주요 진균 감염이다(Kwon-Chung and Bennett, 1992). 감염 시 원형으로 확산되는 임상증상으로 인해 'Ringworm'으로도 알려져 있으며, 최근 'Tinea'로 통일하여 사용하고 있다(Lee et al., 1995). *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*의 세 가지 속으로 대표되는 피부사상균(Dermatophyte)은 피부 진균증(Cutaneous mycosis)을 나타내며, 비감염성 조건뿐만 아니라 심각한 감염을 제어하기 위한 면역 억제제의 과다 사용 때문에 피부사상균에 의한 감염의 중요성이 과거보다 더 강조되고 있는 상황이다(Atef et al., 2008; Kim and Kim, 2016). 이 진균들은 각질(Keratin)을 분해하는 각질 분해효소(Keratinase)를 생성하면서 표면피부조직을 침습하여 인간과 동물의 피부 각화조직에 감염되어 Dermatophytosis, Tinea와 Trichophytosis라 불리는 피부 진균증의 원인이 되는 것으로 보고되어 있다(Atef et al., 2008; Vikesh and Prakash, 2014).

인체 친화성 피부사상균인 *Trichophyton rubrum*은 족부 백선에서 감염이 시작하여 수부 백선, 서혜부 백선, 손톱과 발톱(조갑 백선) 등의 부위로 퍼지며, 가벼운 증상이지만 만성으로 진행하여 치료가 어려운 경향이 있는 것으로 알려져 있다(Oh and Ahn, 2009). 전 세계적으로 가장 빈도가 높은 피부 진균 중은 *T. rubrum*으로, 1910년 Castellani에 의해 처음으로 명명되었으며(Yang, 1949), 약 30년 전에는 English 등이 *T. rubrum* 감염으로 인한 백선증의 높은 유행률을 보고했다(Judy et al., 1998).

현재 피부 진균 감염증은 인체 감염 부위 또는 증상에 따라 분류 및 진단 후 항진균제의 처방이 이루어지고 있으며, 원인 진균의 일반적인 동정은 형태학적, 생화학적 특성을 기반으로 하고 있다(Kim et al., 2011). *Trichophyton* 속의 경우 잘 발달된 대분생자(Macroconidia)와 소분생자(Microconidia)를 생성하며 약 20여 종이 알려져 있으나 대, 소분생자를 모두 생성하는 균종과 분생자를 생성하지 않는 균종 등 다양한 특성을 가지고 있어, 실험실 내에서의 형태학적 진단이 어려운 것으로 알려져 있다(Weitzman and Summerbell, 1995). 또한 균종 간 다양성이 적거나 동일한 부분이 많아 정확한 동정을 위해 형태학적 진단 외 다른 동정법이 요구되고 있다. 최근 다면 젤 전기영동법(Pulsed field gel electrophoresis, PFGE), Random amplified

polymorphic DNA analysis (RAPD), NTS와 Internal transcribed spacer (ITS) primer를 이용한 중합효소 연쇄반응법(Polymerase chain reaction, PCR), Nested-PCR, PCR을 이용한 제한효소 단편 다형성 분석법(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP), Arbitrary primer PCR, ITS region sequence analysis를 포함한 분자유전학적 기법들이 피부사상균 종 및 균주의 동정을 위해 사용되어 왔다(Anderson et al., 1996; Semighini et al., 2001; Dodgson et al., 2003; Balajee et al., 2006; Litvintseva et al., 2006; Anne et al., 2010; Kim et al., 2011; Jin et al., 2014).

이러한 분자생물학적 분석방법 중 진균의 유전자에 존재하는 매우 가변적인 Microsatellite인 단순 반복 뉴클레오티드(GACA)를 이용한 유전자 증폭법은 피부 백선 감염과 병원성 *Candida* 종의 효율적인 동정을 비롯한 인체 병원성 진균 분류와 동정을 위해 이용되고 있으며(Atef et al., 2008; Guofang et al., 2014), 또 다른 분자생물학적 분석 기법인 Multi-locus sequence typing (MLST)은 세균 및 진균의 동정을 위해 몇 개의 유전자 염기서열을 이용하여 염기서열 분석을 통해 얻어진 정보를 통해 종(Species) 단계의 진균 동정은 물론 단일 클론인지, 또는 혼합된 클론인지를 확인할 수 있어 정확한 동정을 할 수 있는 장점이 있는 것으로 보고되어 있다(Bongnoux et al., 2003; John and Matthew, 2003; Anne et al., 2010). MLST에서 주로 사용되는 유전자는 유전자 다형성(Polymorphism)과 microsatellite가 존재하는 유전자들로 약 10개 정도의 Housekeeping 유전자를 대상으로 분석하며, 해당 유전자 부위 약 200~500 bp 정도 영역을 Typing에 이용하고 있다. 기존에 많이 사용되었던 Multi-locus enzyme electrophoresis (MLEE)는 분석에 많은 수의 균주가 필요하고, 숨겨진 변이(Variation)를 분석할 수 없었던 점과 Phenotyping이나 Mating test를 통해서 동정하지 못했던 부분까지도 MLST는 분석이 가능한 장점이 있는 것으로 알려져 있다.

MLST 분석을 통한 진균 분석에 있어서 최초로 *Candida albicans* 동정에 이용된 후 *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum*과 같은 전신성 진균증 및 식물 병원성 진균 등에 적용되어 이미 그 결과가 보고되어 있다(Dodgson et al., 2003; Bougnoux et al., 2003; Litvintseva et al., 2006).

백선증(Dermatophytosis, tinea, ringworm, trichophytosis)은 수의학 및 공중 보건과 관련성을 가지고 있고, 지리적 분포와 기타 역학적 인자들인 연령, 성별과 계절 등에 의해 영향을 받는 것으로 보고되어 있다(Lee et al., 1995; Kim et

al., 2001). 이러한 이유로 MLST 분석법은 동일 균주 간에도 유전학적 및 형태학적 특성이 다른 양상으로 분석될 수 있어, 균주 간 구분을 통해 균의 감염 경로 추적이 가능하여 재감염, 재발 및 새로운 변이 균주의 감염이 만성 감염에 의한 것인지 분석이 가능한 것으로 보고되어 있다 (Bernhardt et al., 2013).

아직까지 가장 흔하게 나타나는 인체 진균 감염증의 원 인체인 *T. rubrum*을 대상으로 MLST를 수행한 연구는 보고된 바 없었다. 따라서, 본 연구에서는 임상 검체에서 분리된 *T. rubrum* 균주들에 대해 형태학적 분석과 분자유전학적 분석인 MLST를 실시하여, MLST 기법이 *T. rubrum*의 분자유전학적 특성 분석 및 역학적 조사를 실시하는데 활용될 수 있을 지와 이를 이용해 백선증 원인균의 정확한 동정을 위한 적용 가능성을 분석해 보고자 하였다.

재료 및 방법

연구 균주

국내 3차 의료기관의 내원 환자로부터 분리, 배양 후 형태학적 동정 및 분자생물학적 동정이 완료되어 한국의 진균자원은행(Korean Collection of Medical Fungi, KCMF)에 기탁되어 보관중인 의진균자원 중 *T. rubrum* 30주를 분양 받아 본 연구에 사용하였다. 분양 받은 임상분리 균주 간의 임상 역학적 특성을 분석하기 위해 환자의 성별, 연령, 분리된 검체의 종류 및 주 질환 등의 일반적인 환자의 임상정보 또한 KCMF로부터 제공받아 사용하였다(Table 1).

Genomic DNA (gDNA) 추출

20~30 mL의 Sabouraud dextrose 액체 배지를 이용하여 25°C에서 3~4일간 120 RPM으로 교반하면서 배양을 실시 하였다. 균사체가 충분히 자란 후 멸균된 거즈로 걸러내고 멸균 증류수로 3회 세척하였다. 균사체는 수분을 완전히 제거하고, 1.5 mL tube로 옮긴 후 Deep freezer에서 급속 동결시킨 후 동결 건조기를 이용하여 균사체는 5 mmTorr 이하의 압력에서 완전히 동결 건조시켰다. 건조된 균사체 20~300 mg을 Sea sand (15~20 mesh, Sigma, USA) 소량을 첨가한 후 액체질소를 이용해 빠르고 강하게 분쇄하였다. 균사체 분말의 적당량을 새 1.5 mL tube로 옮긴 후 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 방법을 기준으로 Genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. 400 µL의 Lysis buffer (200 mM Tris-Cl, pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS, Proteinase K 5 µL를 첨가하여 37°C에서 1시간 Incu-

bation한 후 400 µL 2 × CTAB solution (2% CTAB, pH 8.0 1 mM EDTA)을 첨가하고 Inverting하여 천천히 섞어주었다. 이후 700 µL의 Chloroform : Isoamylalcohol (24:1)을 첨가하고, 12,000 x g에서 10분간 원심분리하고 상층액 600 µL를 새로운 1.5 mL tube로 옮긴 후 0.7 × Volume (420 µL)의 Isopropanol을 첨가하고 -20°C 냉동고에서 30분간 방치한 후 다시 12,000 x g로 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 남아 있는 DNA pellet은 70% EtOH 500 µL로 세척한 뒤 Vacuum pump를 이용해 15분간 건조시킨 후 Tris-EDTA buffer에 DNA를 녹였다. 마지막으로 RNase (10 mg/mL) 2 µL를 첨가하여 RNA를 제거한 후 사용 전까지 냉동보관 하였다.

T. rubrum 임상분리 균주의 Multi locus sequence typing (MLST) 분석

T. rubrum 균주를 대상으로 MLST 분석을 통해 Sequence type (ST) 분석을 실시한 기존 연구가 없었기 때문에, 피부 사상균과 특성이 유사한 사상균에 속하는 *Scedosporium apiospermum*을 기준으로 하여 ST 분석에 사용되고 있는 Housekeeping gene 다섯 종류를 MLST 분석을 위한 타겟으로 설정하였고, National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank의 유전자 Database에서 *T. rubrum*의 다섯 가지 유전자의 gDNA 염기서열을 참고로 하여 Oligonucleotide primer set을 디자인 및 제작하였다(Table 2).

분석 대상 유전자의 염기서열 분석이 완료된 후 유전자의 염기서열 차이를 분석하기 위해 유전자의 일부 염기서열을 따로 분리하여 여러 개의 유전자를 하나의 파일로 결합하였고, 결합된 염기서열 정보를 이용하여 염기서열의 차이를 분석하였다(Fig. 1). *T. rubrum*의 경우 Allele type 이나 ST이 아직 정의되어 있지 않아 ST 분석은 생략하였다. *T. rubrum* 임상분리 균주들의 유전학적 연관성 분석을 위해 Phylogenetic tree 분석을 추가적으로 수행하였다. 다섯 가지 표적 유전자 각각의 염기서열을 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) v. 7.0 프로그램을 통해 하나의 파일로 결합하였고, 결합된 염기서열 정보를 이용해 1,000 bootstrap replication 조건으로 unweighted pair group method using arithmetic average (UPGMA) dendrogram을 생성하였고, 유전적 Cluster 및 연관성을 구분 짓기 위해 Cut-off limit을 0.05 Generic distance로 설정하여 분석하였다.

Table 1. Fungal strains and clinical data for this study

Strain No.	Clinical data			
	Specimen	Sex	Age	Diagnosis
1	Skin swab	M	60	Seborrhoeic keratosis
2	Forearm (Rt.)	F	70	Tinea corporis
3	Tissue	M	60	Nummular dermatitis
4	Others	M	30	Tinea corporis
5	Toe nail (Lt. 2 nd)	F	52	Tinea unguium
6	Toe nail (Lt. 1 st)	M	63	Tinea unguium
7	Toe nail (Lt. 2 nd)	M	58	Tinea unguium
8	Others	M	40	Cellulitis
9	Toe nail (Rt. 5 th)	F	67	Other rosacea
10	Finger nail (Lt. 1 st)	F	64	Other prurigo
11	Tissue	M	62	Irritant contact dermatitis
12	Toe nail (Lt. 4 th)	M	59	Onychomycosis
13	Toe nail (Lt. 4 th)	M	54	Tinea unguium
14	Others	M	76	Atopic dermatitis
15	Toe nail (Lt. 1 st)	F	10	Tinea unguium
16	Tissue	F	65	Onychomycosis
17	Others	F	85	Tinea unguium
18	Toe nail (Rt. 4 th)	M	85	Contact dermatitis
19	Toe nail (Lt. 1 st)	M	19	Vitiligo
20	Toe nail (Rt. 1 st)	F	5	Tinea unguium
21	Groin	M	35	Tinea corporis
22	Toe nail (Rt. 1 st)	M	30	Tinea unguium
23	Toe nail (Rt. 1 st)	M	59	Tinea unguium
24	Tissue	F	63	Tinea corporis
25	Finger nail	M	53	Tinea unguium
26	Toe nail (Rt. 1 st)	M	82	Tinea unguium
27	Others	M	59	Tinea unguium
28	Toe nail (Lt. 2 nd)	M	54	Tinea cruris
29	Foot	F	77	Tinea pedis
30	Arm	M	56	Psoriasis (unspecified)

결 과

주 질환별 환자 및 검체별 분석

주 질환에 따른 환자 분포에서는 조갑 진균증(Tinea unguium)이 12건(40%)으로 가장 많은 비중을 차지했고, 다음으로는 피부염(Dermatitis)이 4건(13.3%)이었으며, *T. rubrum*이 분리된 임상 검체의 종류는 손톱, 발톱 검체가 17건(56.7%)으로 가장 많았고, 다음으로 피부 및 조직 검체가 13건(43.3%)으로 많았다.

MLST 분석을 위한 유전자 증폭 및 Nucleotide substitution 분석

T. rubrum 임상분리 균주 30주에 대한 MLST 분석을 위해 Actin (*ACT*, 750 bp), Calmodulin (*CAL*, 500 bp), RNA polymerase II (*RPB2*, 850 bp), Superoxide dismutase 2 (*SOD2*, 1,300 bp), β -tubulin (*BT2*, 550 bp)을 포함한 5개의 House-keeping gene을 대상으로 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 대상으로 염기서열 분석을 실시한 결과, *T. rubrum*

Table 2. Specific oligonucleotide primer sets for *T. rubrum* MLST analysis

Target gene	Locus	Sequences (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>ACT</i>	Actin	Forward primer: TGG GAC GAT ATG GAI AAI ATC TGG CA Reverse primer: TCI TCG TAT TCT TGC TTI GAI ATC CAC AT	750
<i>CAL</i>	Calmodulin	Forward primer: GAC TAT TCA CTA ACA ACG CTG TG Reverse primer: GTC TAG TAT AAT CAA ATC GTT AGA G	500
<i>RPB2</i>	RNA polymerase II	Forward primer: GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG Reverse primer: CCC ATR GCT TGY TIR CCC AT	850
<i>SOD2</i>	Superoxide dismutase II	Forward primer: TCA CCA CGA TAA ACA CCA CC Reverse primer: CGT CGA TAC CCA AGA GAG GA	1,300
<i>BT2</i>	Beta-tubulin	Forward primer: GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC Reverse primer: ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC	550

*I=, Y=T or C, M=A or C, W=A or T, R=G or A.

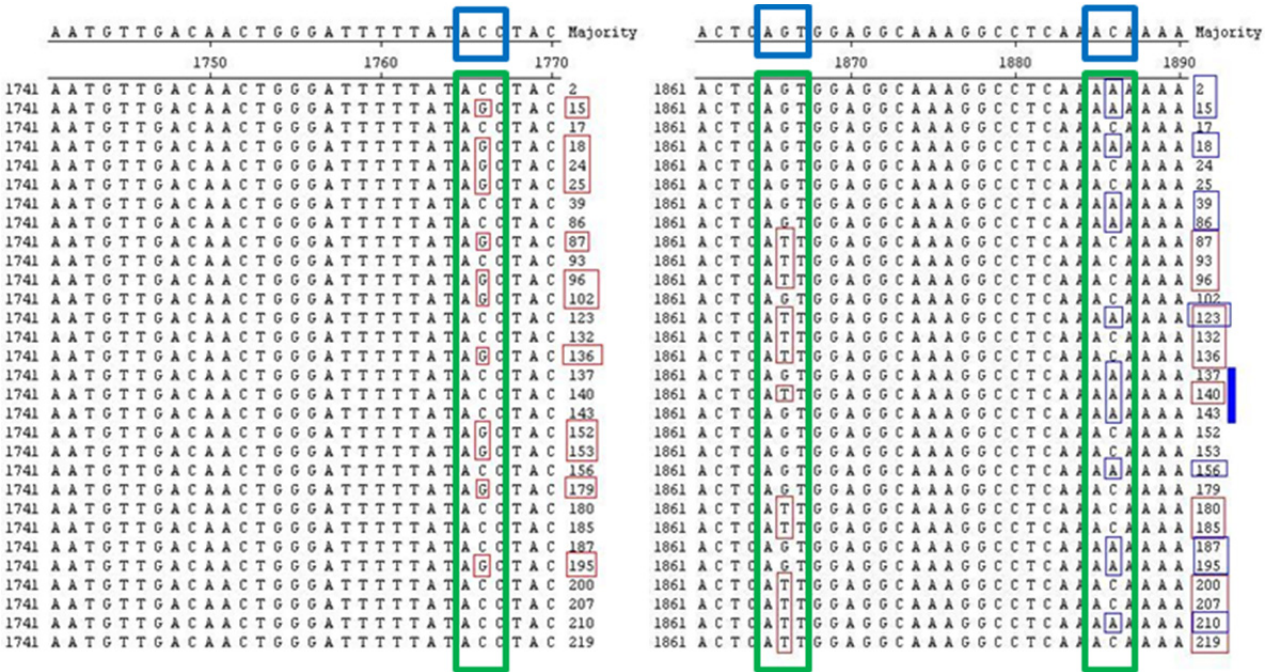


Fig. 1. Nucleotide substitutions in *BT2* gene of *T. rubrum* clinical isolates. Genetic variations of *T. rubrum* clinical isolates were found on three different positions of β -tubulin gene and were shown to have changed from C→G (1766), G→T (1876), and C→A (1886).

임상분리 균주들의 대부분의 Housekeeping 유전자에서는 염기서열이 모두 일치하는 결과를 보였다. 그러나, β -tubulin 유전자(*BT2*)에서 3개의 위치에서 염기서열의 변이가 다양하게 나타남을 확인하였다(Fig. 1). 변이가 나타난 세 염기는 주로 C→G (1766), G→T (1876), 그리고 C→A (1886)로 치환이 발생한 것을 확인하였다.

Phylogenetic tree 상관성 분석

T. rubrum 임상분리 균주들의 분자유전학적 연관성을 파악하기 위해 Phylogenetic tree 분석을 수행하였다. Cluster 분류를 위한 Cut-off limit을 0.05 Generic distance로 설정하였고, 그 결과 Cluster 1부터 Cluster 4까지 총 4개의 Cluster

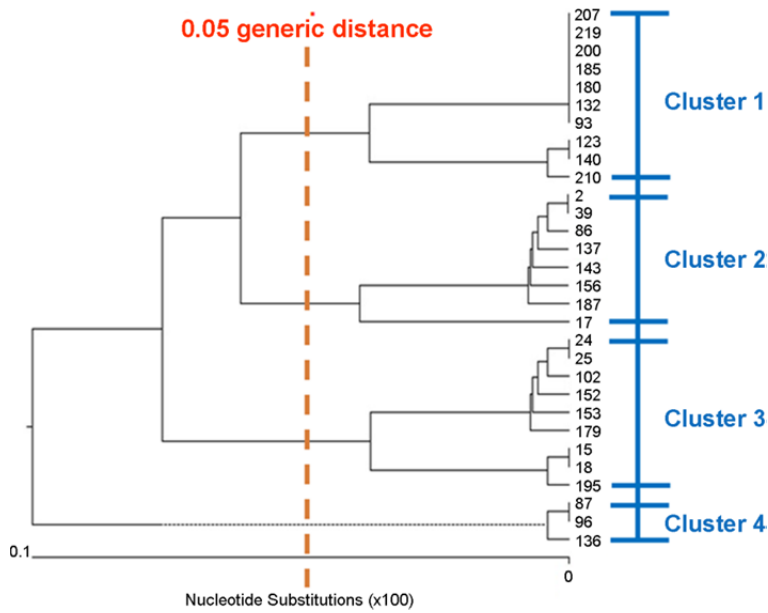


Fig. 2. Dendrogram of a total of 30 *T. rubrum* clinical isolates determined by MLST with five housekeeping genes. It was classified as four clusters, however there was little significant correlation.

Table 3. Type of dermatophytosis and clinical specimen sources according to the molecular genetic cluster of *T. rubrum* clinical isolates

Clusters	Diagnosis	No. of cases	Specimens	No. of cases	Sex (M/F)
I (N=10)	Tinea unguium	4	Nail	4	6/4
	Others	3	Others	4	
	Cruris	1	Skin	2	
	Pedis	1			
	Corporis	1			
II (N=8)	Tinea unguium	2	Nail	3	7/1
	Dermatitis	2	Tissue	3	
	Cellulitis	1	Skin	2	
	Tinea corporis	1			
	Seborrhoeic keratosis	1			
	Onychomycosis	1			
III (N=9)	Tinea unguium	5	Nail	7	6/3
	Tinea corporis	2	Arm	1	
	Vitiligo	1	Others	1	
	Onychomycosis	1			
IV (N=3)	Tinea unguium	1	Nail	2	1/2
	Dermatitis	1	Tissue	1	
	Rosacea	1			

로 구분되었다(Fig. 2). *T. rubrum* 임상분리 균주 간 분자유전학적 연관성 차이를 분석한 결과, Cluster 1의 경우 Tinea unguium 환자가 4명으로 가장 많은 분포를 보였고(Table

3), Cluster 2의 경우 질병에서의 차이는 없었으나 대부분이 남자 환자에서 많이 나타남을 확인할 수 있었다. 하지만, 균이 분리된 환자 성별 간의 통계학적인 유의성은 나타내

지 않았다. Cluster 3의 경우는 주 질환이 *Tinea unguium*인 환자가 5명이었으며, 대부분 손, 발톱에서 분리된 균주들로 확인되었다. Cluster 4에서는 균주 간의 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

고 찰

2006년부터 2010년까지 국내 진균 감염증 건강보험 청구 자료를 분석한 결과에 따르면, 연평균 인구의 9.4%가 진균증으로 치료를 받고 있으며, 이 중 백선증에 의한 감염이 6.5%를 차지하였다. 2010년 한 해 동안 백선증에 의한 요양급여 비용은 3,205억을 사용하여 매우 높은 것으로 알려져 있다(Yoon et al., 2014). 최근 보고에 의하면, 현재 한국의 경우 약 40여 종의 피부사상균이 동정되었으며, 주로 *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *E. floccosum* 등이 대표 균종이다. 하지만 예전에 주로 동정되던 *M. ferrugineum*, *T. schoenleinii* 등은 현재 거의 사라진 것으로 보고되고 있다. 현재 국내에서 가장 높은 빈도로 발생하고 있는 균종 역시 *T. rubrum*으로 보고자에 따라 다양한 수치를 보이거나 대개 80~92% 정도의 발생 빈도를 보이고 있으며, *T. mentagrophytes*와 *M. canis* 등은 10%대 이하로 감소하는 추세를 보이고 있다. 1979년에서 2013년까지 국내의 *T. rubrum*에 의한 진균 감염 환자 수는 매년 1,436명에서 5,565명 수준으로 평균 3,310명이 발생하였으며, 1979년 이후 꾸준한 증가 추세를 보이고 있다(Lee et al., 2015).

최근 진균 종의 정확한 동정과 유전자형 분석 및 분자 유전학적 변이 유형을 연구하기 위해 소개되고 있는 다양한 분자생물학적 분석법들은 특정 표적 유전자를 증폭하여 분석하는 방법을 기본적으로 사용하고 있으며, 대표적으로 교잡법(Hybridization), PFGE, RFLP, AFLP, RAPD, 염기서열 분석법 등이 존재한다(Anderson et al., 1996; Semighini et al., 2001; Dodgson et al., 2003; Balajee et al., 2006; Litvintseva et al., 2006; Anne et al., 2010; Kim et al., 2011; Jin et al., 2014). 하지만, 유전적 변이가 많이 발생하는 진균 종의 경우 분석에 한계가 있으며, PCR 증폭물의 밴드 패턴 분석(Poly-morphism)에 있어서 연구자 또는 실험실마다 결과가 일정치 않아 사용에 제한적이며, 표준화가 어려운 단점이 있는 것으로 보고된 바 있다(Bidet et al., 2000). 특히, PFGE 법은 분석시간이 4~5일로 노동 집약적이며, 결과 분석에 자의적인 견해가 개입될 수 있는 단점이 있는 것으로 알려져 있다. 최근 이용이 되고 있는 MLST 기법은 진균의 유전자 중 4~10개의 Housekeeping gene을 선정하여 염기

서열 분석을 통해 균종, 균주 별 또는 유전자형 구별이 가능한 동시에 유전자 변이 분석이 가능하여 전 세계적으로 진균의 분포, 호발 원인균 등 분자역학적 분석이 가능하다는 장점이 있는 것으로 보고되고 있다(Byun et al., 2012).

진균을 대상으로 한 MLST 분석을 이용한 역학적 연구는 최초로 *Candida albicans*의 유전자형 분석에 이용된 이후, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium oxysporum*과 같은 인체 전신 감염성 진균 및 식물 병원성 진균 등에 적용되어 이미 그 결과가 보고되어 있다(Dodgson et al., 2003; Bougnoux et al., 2003; Litvintseva et al., 2006). 동일 균주 간에도 유전학적 및 형태학적 특성이 서로 다른 양상으로 분석될 수 있기 때문에, 균주 간 구분을 통해 진균의 감염 경로 추적이 가능하여 재감염, 재발 및 새로운 변이 균주의 감염이 만성 감염에 의한 것인지 분석이 가능한 것으로 보고되어 있다(John and Matthew, 2003). 이는 현재 광범위 항진균제의 처방보다 적절한 항진균제의 처방 및 치료에 도움을 줄 수 있고 항진균제 내성균의 출현을 감시할 수 있으며 더불어 지리적, 시간적인 역학 조사의 방법으로 적용될 수 있을 것으로 여겨지고 있다.

그러나 백선증의 원인 진균으로서 *T. rubrum*에 대한 MLST를 이용한 분석은 아직 보고된 바 없어 본 연구에서는 MLST 기법이 *T. rubrum*의 분석에 이용될 수 있는지와 이를 이용하여 백선증의 원인균 동정에 관한 가능성을 분석하였다. MLST 분석에 있어서 *T. rubrum* 30검체에 대해 actin (*ACT*), calmodulin (*CAL*), RNA polymerase II (*RPB2*), superoxide dismutase 2 (*SOD2*) 및 β -tubulin (*BT2*)를 포함한 5개의 Housekeeping gene을 대상으로 염기서열에서의 변화를 분석한 결과, 대부분의 유전자에서 원인균 동정 결과가 *T. rubrum*으로 모두 일치하는 결과를 보였다. 그러나, β -tubulin 유전자(*BT2*)에서 3개의 염기 위치에서 변이가 다양하게 나타남을 확인하였으며 변이가 나타난 세 염기는 주로 C→G (1766), G→T (1876), 그리고 C→A (1886)로 치환을 보였다.

*T. rubrum*의 분자유전학적 연관성 분석을 위해 Phylogenetic tree 분석을 수행한 결과, 크게 4개의 Cluster로 구분되었으나 각 Cluster 마다의 연관성은 서로 크지 않은 것으로 나타났다. 본 연구에서 MLST 분석의 표적으로 사용된 5가지 종류의 Housekeeping gene 중 *BT2*에서만 Nucleotide substitution이 확인되었기 때문에, *BT2*에서의 유전적 변이가 4가지 Cluster로의 구분에 큰 영향을 준 것으로 사료되며, 이후 *T. rubrum*의 ST 분석을 위한 하나의

지표로 활용이 가능할 것으로 사료된다. 하지만, 추후 *BT2*에 의해 구분된 Cluster 간의 표현형으로 나타나는 특성 차이를 규명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. *T. rubrum* 균주 간 임상적 연관성 분석에서는 Cluster 1의 경우 *Tinea unguium* 환자가 4명으로 가장 많은 분포를 보였고, Cluster 2의 경우 질병에서의 차이는 없었으나 대부분이 남자 환자였다. Cluster 3의 경우는 주 질환이 *Tinea unguium*인 환자가 5명이었으며, 대부분 손, 발톱에서 분리된 균주였다. Cluster 4에서는 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

본 연구에서 사용한 검체의 수가 제한적이긴 하나, 지금까지 진균 종에서의 MLST 분석은 *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Fusarium oxysporum* 등 특정 사상균에 대해서만 한정적으로 이루어 졌지만, 본 연구에서 *T. rubrum*를 대상으로 유전적 변이 및 분자역학적 분석을 위해 MLST법의 적용 가능성을 탐색하였다는 점에서 의미가 있다고 할 수 있다. 향후 추가적인 연구를 통해 전국 단위의 분리 균주를 대상으로 한 연구 결과를 데이터베이스화 한다면 *T. rubrum*의 검체 별 유전적 변이 패턴, 항진균제 내성 패턴, 지역적, 시간적 변이 등에 대한 국내 피부 진균증 대표 원인균에 관한 정확한 분자역학적 분석이 가능할 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 *T. rubrum*에 대한 MLST 분석의 가능성을 확인함으로써 이를 기반으로 한 전 세계의 균주 간 분자유전학적 다양성이나 분자역학적 특성 파악이 가능할 수 있을 것으로 사료되며, 정확한 데이터베이스가 축적된다면 임상적으로 다방면에서 이용될 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 국내뿐만 아니라 세계적으로도 피부 진균증의 유병률이 전 세계 인구의 약 20%에 달하고 있고, 그 중 피부 진균증의 80~90%가 *T. rubrum*이 원인이 되고 있기 때문에, *T. rubrum*에 대한 정확한 진단과 분자역학적 분석에 관한 결과들이 이후 감염증의 조기 치료와 감염 전파 예방에 도움을 줄 뿐만 아니라 역학적 감시체계를 구축하는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

ACKNOWLEDGEMENTS

None.

CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interests exists for any of the authors.

REFERENCES

- Anderson MJ, Gull K, Denning DW. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 Southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. 34: 87-93.
- Anne D, Cecile G, Christophe H, Nelly CA, Sybren de H, Marie M. Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* species complex (FSSC) isolates. *Journal of Microbiological Methods*. 2010. 82: 319-323.
- Atef SS, Pranab KM, Hassan NA, Atef I, El A, Said HA, Mahmoud AG. Single-Step PCR Using (GACA) 4 Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008. 46: 2641-2645.
- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell*. 2006. 5: 1705-1712.
- Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, Schwarz C, Würstl B, Tintelnot K. Multi locus sequence typing of *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2013. 12: 592-598.
- Bidet P, Lalande V, Salauze B, Burghoffer B, Avesani V, Delmée M, et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38: 2484-2487.
- Bougnoux, ME, Tavanti A, Bouchier C, Gow NAR, Magnier A, Davidson AD, et al. Collaborative consensus for optimized multilocus sequence typing of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. 41: 5265-5266.
- Byun JH, Yoo JH, Park CM, Lee Dg, Park SH, Choi SM. Molecular epidemiologic analysis of community-onset extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* using infrequent-restriction site polymerase chain reaction (IRS-PCR) with comparison by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Infect Chemotherapy*. 2012. 44: 5-10.
- Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003. 41: 5709-5717.
- Guofang L, Chenghua HE, Haibin Z. Identification and characterization of dermatophyte species and strains with PCR amplification. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2014. 8: 545

- 550.
- Jin H, Kim H, Kim S, Choi Y, Bang H, Park S, Wang H, Lee JH, Jang IH, Kim YK, Lee H. Evaluation of a PCR-Reverse Blot Hybridization Assay to Identify Six Dermatophytes Predominant in the Republic of Korea. *Biomedical Science Letters*. 2014. 20: 139-146.
- John WT, Matthew CF. Fungal multilocus sequence typing-it's not just for bacteria. *Current Opinion Microbiology*. 2003. 6: 351-356.
- Judy RR, Robert WP, Rana AH, Mary EB, Arthur LR. The epidemiological features of invasive mycotic infections in the San Francisco bay area, 1992-1993: Results of population-based laboratory activity surveillance. *Clinical Infectious Diseases*. 1998. 27: 1138-1147.
- Kim KH, Jun JB, Yoo HJ. Superficial and cutaneous mycoses. *Dermatology revised vol. 4*. Seoul: Ryo Moon Gak. 2001. 310-340.
- Kim H, Jin H, Kim S, Wang H, Choi Y, Bang H, Park JS, Lee JH, Won YH, Ahn KJ, Kim YK, Lee H. PCR-reverse Blot Hybridization Assay for Species Identification of Dermatophytes. *Korean Journal of Medical Mycology*. 2011. 16: 86-98.
- Kim SJ, Kim SJ. A Distribution of Keratinophilic Fungi Isolated from the Soil of Haeundae Beach in Korea, *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 2016. 48: 343-347.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Philadelphia: Lea & Febiger. *Medical mycology*. 1992. 105-161.
- Lee SK, Choi JS, Kim KH. A clinical and mycological Study of *Tinea Pedis*. *Annals of Dermatology*. 1995. 33: 1029-1037.
- Lee WJ, Kim SL, Jang YH, Lee SJ, Kim DW, Bang YJ, et al. Increasing Prevalence of *Trichophyton rubrum* Identified through an Analysis of 115,846 Cases over the Last 37 Years. *Journal of Korean Medical Science*. 2015. 30: 639-643.
- Litvintseva AP, Thakur R, Vilgalys R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics*. 2006. 172: 2223-2238.
- Oh BH, Ahn KJ. Drug Therapy of Dermatophytosis. *Journal of the Korean Medical Association*. 2009. 52: 1109-1114.
- Semighini CP, Delmas G, Park S, Armstrong D, Perlin D, Goldman GH. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2001. 31: 15-19.
- Vikesh KB, Prakash CS. Epidemiological studies on Dermatophytosis in human patients in Himachal Pradesh. India: Springer-Plus. 2014. 134.
- Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995. 8: 240-259.
- Yang JH. Statistical observation of skin fungal disease for last 10 years. *Korean Dermatology & Urology Society Newsletter*. 1949. 1: 10-78.
- Yoon HJ, Choi HY, Kim YK, Song YJ, Ki Moran. Prevalence of fungal infections using National Health Insurance data from 2009-2013. *Epidemiology and Health*. 2014. 36.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2018.24.3.221>

Cite this article as: Yoon NS, Kim H, Park SB, Park M, Kim S, Kim YK. Genetic Variations of *Trichophyton rubrum* Clinical Isolates from Korea. *Biomedical Science Letters*. 2018. 24: 221-229.