

임상검체에서 분리된 *Aspergillus* Species에 대한 Random Amplified Polymorphic DNA 분석

신종희, 이창재, 이지연, 송정원, 기승정, 서순팔, 양동욱

전남대학교 의과대학 임상병리학교실

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis for *Aspergillus* Species Isolated from Clinical Specimens

Jong Hee Shin, M.D., Chang Jae Lee, M.D., Jee Yeon Lee, M.D., Jeong Won Song, M.D.,
Seong Jung Kee, M.D., Soon Pal Suh, M.D., and Dong Wook Ryang, M.D.

Department of Clinical Pathology, Chonnam National University Medical School,
Kwangju, Korea

Background : *Aspergillus* species are second only to *Candida* species as the most commonly isolated fungi from clinical specimens. As well as the identification of the *Aspergillus* species, it has been necessary for epidemiological studies to differentiate between strains of the same species. We performed genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Aspergillus* by using RAPD.

Methods : A total of 63 clinical strains of *Aspergillus* species (including 21 *A. fumigatus*, 12 *A. flavus*, 12 *A. niger*, 12 *A. terreus*, 3 *A. nidulans*, and 3 *A. sydowii*) from 63 patients was analyzed. For RAPD analysis, M13 primer (5' GAGGGTGGCGGTTCT3') and five random 10-mer primers (OPC-6, 7, 10, 18 and 20; Operon Technologies, USA) were used.

Results : The RAPD patterns by M13 primer appeared to be identical when the isolates of the same *Aspergillus* species were compared. Distinctive and reproducible sets of amplification products by primer M13 were observed for different *Aspergillus* species: 60 of 63 (95%) isolates were correctly identified by the RAPD analysis using primer M13. RAPD patterns obtained from different strains of the same *Aspergillus* species by five OPC primers were far more similar than those derived from different *Aspergillus* species, but the RAPD profiles with some OPC primers showed polymorphism among isolates of the same *Aspergillus* species. The application of some OPC primers made it possible to cluster the isolates of the same *Aspergillus* species into several groups.

Conclusion : These results indicate that RAPD can be useful for the rapid identification of *Aspergillus* species and for strain typing in the epidemiological investigations.

(Korean J Clin Microbiol 2001;4:33-29)

Key words : *Aspergillus*, RAPD, Genotype, Identification

*본 논문은 1999년도 전남대학교병원 임상연구소 연구비 지원에 의해 이루어졌음

접수번호 : CM 4-1-6

교신저자 : 신종희

(501-757)광주광역시 동구 학 1동 8

전남대학교병원 임상병리과

Tel : 062) 220-5342 FAX : 062) 224-2518

E. mail : shinjh@chonnam.ac.kr

서론

Aspergillus species는 칸디다 다음으로 인체 감염을 자주 일으키는 진균이다[1]. 임상적으로 알레르기성 폐기관지 아스페길루스증과 fungus ball 뿐 아니라, 기존 질환이 있거나 면역이 약화된 환자에서 폐와 다른 장기의 침습성 감염과 치명적인 전신성 감염증을 일으킬

수 있다[2]. 특히, 최근에는 면역이 약화된 환자의 수가 증가함에 따라 *Aspergillus species*에 의한 기회감염의 빈도가 증가하고 있으며, 혈액종양이나 장기이식 환자 등의 면역약화 환자들간에 *Aspergillus species*에 의한 감염의 병원내 집단발생도 보고되고 있다[1-4]. *Aspergillus species*는 흙, 식물 및 공기 등 환경에 널리 존재하는 사상형 진균으로, 많은 포자가 공기중에 존재할 수 있지만, 그 중에 소수의 균종만이 감염을 일으킨다. 약 20여 종의 *Aspergillus species* 중에서 *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, 및 *Aspergillus nidulans* 등이 인체 감염을 일으킬 수 있다고 보고되었다[1,2].

*Aspergillus species*의 동정은 현재 주로 형태학적 동정법이 이용되고 있는데, 이는 특징적 형태가 나타날 때까지 배양 시간이 오래 걸리고 때로 형태학적 특성만으로는 동정이 어려울 때가 많다. 최근 *Aspergillus species*에 의한 감염이 증가함에 따라 형태학적 동정법이 아닌, 신속하고 정확한 새로운 동정법이 요구되고 있다[1]. 한편, *Aspergillus species*는 병원 공기중 포자의 수가 증가하여 혈액종양이나 장기 이식 환자들에서 동일균에 의한 집단 병원감염을 발생시킬 수 있다고 보고되고 있는데[3,4], *Aspergillus*에 의한 병원 감염의 전파를 알아내는 일은 쉽지 않다. 따라서 최근 *Aspergillus*의 역학적 조사를 위해 몇몇 분자생물학적 방법들이 시도되고 있다[3-5].

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)법은 균의 DNA 염기서열에 대한 특별한 정보없이 1개의 arbitrary primer를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 실시하여 그 산물을 관찰함으로써 균의 DNA 다형성을 관찰할 수 있는 방법으로, 과정이 간단하고 신속하여 균의 분류와 역학조사에 널리 이용되기 시작하고 있다[6,7]. RAPD 분석은 일반 세균 뿐 아니라, *Candida glabrata*, *Candida lusitanae*, *Candida tropicalis*, *Candida lipolytica* 등의 일부 *Candida species*의 역학적 연구에 시도된 바 있는데, 각 *Candida species*의 동정과 역학적 분류에 유용하다고 보고되고 있다[6,8,9]. RAPD법은 최근 *Aspergillus species* 중 가장 흔한 *A. fumigatus*의 역학적 분석과 동정에 이용이 시도되고 있다[10-12]. 따라서 RAPD 분석은 *Aspergillus species*를 보다 정확하고 신속하게 동정하는 것 이외에도, *Aspergillus species*내 동일 균의 전파를 알아내는 분자 역학적 조사에도 이용될 가능성이 있다.

본 연구는 임상 검체에서 분리된 *Aspergillus species*를 대상으로 간단한 방법으로 DNA를 추출한 후, RAPD 분석을 실시함으로써, 이 방법이 *Aspergillus species*의 신속 동정에 이용될 수 있는지, 그리고 각 균종내에서 동일균주의 검출을 위한 역학적 조사에 이용될 수 있는지를 알아보았다.

대상 및 방법

1. 대 상

1996년과 1998년 사이에 전남대학교 병원 환자 63명의 임상 검체에서 분리된 *Aspergillus species* 총 63주를 대상으로 하였다. 균주의 최종 동정 결과는 Table 1과 같으며 *A. fumigatus* 21주, *A. flavus* 12주, *A. niger* 12주, *A. terreus* 12주, *A. nidulans* 3주 및 *Aspergillus sydowii* 3주 등으로서 호흡기 검체(42주, 66%)와 농(15주, 24%) 등에서 주로 분리되었다. 각 균주별 분리된 검체를 살펴보면, 대부분 호흡기 검체에서 분리되었으나 *A. niger*는 12주중 9주(75%)가 이비인후과 외래환자의 귀분비물에서 분리되었으며, *A. nidulans*는 3주중 2주가 농에서 분리되었다. 임상 검체에서 *Aspergillus species*의 분리는 주로 Sabouraud dextrose agar (SDA)를 이용하여 30℃와 실온에 한 달간 배양하여 실시하였다. 배양된 *Aspergillus*는 스카치 테이프법, tease mount 혹은 슬라이드 배양을 이용하여 lactophenol cotton blue 염색 후 형태학적으로 동정하였다[1]. 63주 중 3주가 형태학적으로 동정이 어려웠는데, 이 3주는 핵산 probe를 이용하여 PCR과 효소반응법으로 최종 동정을 확인하였다[13]. 분리 동정된 각 *Aspergillus species*는 SDA 사면배지에 배양 후 -70℃에 보관하였다. 표준 균주로는 *A. fumigatus* ATCC 64026, *A. flavus* ATCC 64025, *A. niger* ATCC 64028, *A. terreus* ATCC 64029, *A. nidulans* ATCC 64027 및 *A. sydowii* ATCC 1017을 이용하였다.

2. *Aspergillus* DNA 추출

Shin 등[14]의 *Candida* DNA 간단 추출법을 변형하여 이용하였다. 즉 약 5일간 37℃에서 *Aspergillus*를 배양한 SDA 사면 배지판을 clean bench로 옮기고 SDA 사면판에 2 mL의 멸균 증류수를 부었다. 멸균된 나무막대로 사면위의 *Aspergillus* conidia를 적당히 긁는 후 혼합액을 무거운 결정이 가라앉도록 3-5분 두었다가 상청액을 15 mL의 conical tube로 옮겼다. Hemocytometer를 이용하여 conidia 수를 세어 균액을 1-10×10⁶/mL 정도가 되도록 조절하였다. 이 중 200μL의 균액을 800μL의 TXTE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1% Triton X-100)가 든 멸균된 1.5 mL 원심관에 넣고 실온에 10분간 두어 균을 용해시킨 후 14,000 rpm에서 5분간 원심시켰다. 그 후, 1mL의 TXTE buffer로 세번 세척 후, 침전물은 200 μL의 TXTE buffer에 부유하여 200 μL의 0.5 mm zirconium beads (Biospec Products, USA)를 넣은 2 mL screw-cap conical-bottom tube (Starstedt, Inc., Germany)에 넣는다. 15분간 끓인 후, mechanical cell disrupter (Mini-beadbeater; Biospec

Table 1. *Aspergillus* species tested in this study

Species	Site of isolation			Total
	Respiratory	Pus	Others	
<i>A. fumigatus</i>	15	1	5	21
<i>A. flavus</i>	11	1	0	12
<i>A. niger</i>	3	9	0	12
<i>A. terreus</i>	11	1	0	12
<i>A. nidulans</i>	1	2	0	3
<i>A. sydowii</i>	1	1	1	3
Total	42	15	6	63

Products, USA)에서 20분간 흔들고, 20초간 원심 후 상청액을 취하여 -20℃에서 보관하여 추후 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)에 이용하였다.

3. RAPD 분석

RAPD에 사용한 primer는 M13 primer (5'GAGGGTGGCGGTTCT3')와 Operon사의 OPC kit의 20가지 primer (Operon Technologies, USA) 중 선별된, 5종의 10-mer oligonucleotide (OPC-6, GAACGGACTC; OPC-7, GTCCCGACGA; OPC-10, TGTCTGGGTG; OPB-18, TGAGTGGGTG; OPB-20, ACTTCGCCAC)를 이용하였다. 본 연구에서는 칸디다 균종의 동정에 유용하다고 보고된 M13 primer[8]를 *Aspergillus* species의 균종 동정에 적용하여 보았고, *A. fumigatus*의 균주간의 감별에 유용하다고 보고된 OPC primer[11]를 *A. fumigatus* 외에 *A. flavus*, *A. niger*, 및 *A. terreus*의 균주 감별에 이용하여 보았다. RAPD를 위한 PCR 혼합액은 3 mM MgCl₂, primer 20 pmoles, DynaZyme (Finzyme Inc., Finland) 1 U, 각각의 dNTP 250 μM, 50 mM KCl 및 0.001% gelatin에 *Aspergillus* species의 genomic DNA 25 ng (0.5 μL)을 넣어 총 25 μL의 양으로 시행하였다. 또 PCR은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer model 9600, USA)를 사용하여 시행하였는데, M13 primer를 이용한 PCR의 온도 조건은 95℃에서 5분간 predenaturation 시킨 뒤 94℃에서 30초, 50℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분간을 한 주기로 35회 실시하고 72℃에서 5분간 postextension 시켰다. 또, OPC primer를 이용한 온도 조건은 95℃에서 5분간 predenaturation 시킨 뒤 94℃에서 30초, 36℃에서 30초 그리고 72℃에서 1분간을 한 주기로 45회 실시하고 72℃에서 5분간 postextension 시켰다. RAPD 분석은 각 균에서 적어도 두 번 이상을 실시하였다. 또 임의로 추출한 5주에 대해 계대 배양, DNA 추출 및 RAPD 분석을 세 번씩 각기 시행하여 그 재현성을 검증하였다.

4. Agarose gel 전기영동 및 RAPD 양상 분석

전기영동은 TBE buffer (0.1 M Tris, 0.09 M Boric acid, 0.001 M EDTA, pH 8.4)를 사용하여 80V하에서 1-2시간 실시하였다. Gel은 1% (w/vol) agarose (International Technologies, USA)와 1% NuSieve agar (FMC Bio-products, USA)로 만들었고 전기영동후 gel은 ethidium bromide (EtBr) 0.5 μg/ml로 염색한 후 UV하에서 관찰하고 촬영하였다.

성 적

M13 primer에 의한 RAPD분석

M13 primer를 이용한 RAPD 분석 결과, *Aspergillus* species는 각 균종 별로 각기 다른 증폭산물을 보였고 동일 균종내 균주들은 모두 거의 같은 양상을 보였으며 재현성이 좋았다. 따라서 M13에 의한 RAPD 분석은 주로 260 bp와 1,000 bp 사이의 증폭산물을 관찰함으로써 각 균종의 동정이 가능하였다(Fig. 1). 즉, *A. fumigatus*는 21주 모두 250-1,000 bp사이에 8개의 bands를 보였고 그 중 600 bp 근처의 band가 강하였다. *A. flavus* 12주는 모두 250-1,000 bp사이에 6개의 bands를 보였고 그 중 900 bp 근처의 2개 band가 강하였다. *A. terreus* 12주는 650 bp 근처에 강한 2개의 band를 보였다. 이 세 균종에서의 RAPD 소견은 각각 표준 균주인 *A. fumigatus* ATCC 64026, *A. flavus* ATCC 64025 및 *A. terreus* 64029의 RAPD 양상과 일치하였다. *A. niger* 12주 중 10주는 300 bp에 강한 band를 보이는 공통점이 있었고 *A. niger* ATCC 64028에서도 동일하였으나 2주에서는 이 소견이 관찰되지 않았다. 또 *A. nidulans* 3주 중 2주에서는 *A. nidulans* ATCC 64027과 동일하게 500과 700 bp에 두 개의 band를 보였으나, 한 주에서는 다른 양상을 보였다. 따라서 RAPD법으로 *A. niger* 2주와 *A. nidulans* 1주가 동정이 불가능하였는데, 이 3주는 형태학적 동정법과 PCR과 효소면역법으로 동정이 확인되었다. *A. sydowii*는 3주 모두 600 bp 근처에 두개의 band와 480 bp band를 보였고 및 *A. sydowii* ATCC 1017에서도 동일하였다. 따라서 이 RAPD 양상을 ATCC 표준 균주와 비교 관찰함으로써 *Aspergillus* species의 균종의 동정이 가능하였다. 전체 균주 63주 중 60주 (95%)가 형태학적 방법으로 동정이 가능하였는데, 형태학적 방법으로 동정이 애매했던 3주는 RAPD법에 의해 *A. flavus* 2주와 *A. terreus* 1주로 쉽게 동정이 되었고, 이는 핵산 probe를 이용한 PCR과 효소면역법으로 확인한 결과와 일치하였다. 전체적으로 63주의 *Aspergillus* species는 형태학적 방법으로 60주(95%)의 동정이 가능하였고, M13을 이용한 RAPD법에 의해서도

Table 2. Comparative identification of *Aspergillus* species by phenotypic versus RAPD methods

Final identification ^a	No. (%) of isolates correctly identified with:	
	Phenotypic method	RAPD method
<i>A. fumigatus</i> (n=21)	21 (100)	21 (100)
<i>A. flavus</i> (n=12)	10 (83)	12 (100)
<i>A. niger</i> (n=12)	12 (100)	10 (83)
<i>A. terreus</i> (n=12)	11 (92)	12 (100)
<i>A. nidulans</i> (n=3)	3 (100)	2 (67)
<i>A. sydowii</i> (n=3)	3 (100)	3 (100)
Total (n=63)	60 (95)	60 (95)

^aFinal identification was confirmed by conventional morphological methods and/or by a PCR-EIA method using DNA probes

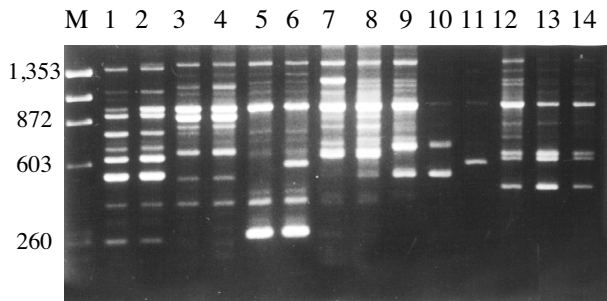


Fig. 1. RAPD fingerprinting by M13 primer for *Aspergillus* species. Lanes 1 and 2, *A. fumigatus*; 3 and 4, *A. flavus*; 5 and 6, *A. niger*; 7 and 8, *A. terreus*; 9 to 11, *A. nidulans*; 12 to 14, *A. sydowii*; M. molecular marker (Kb).

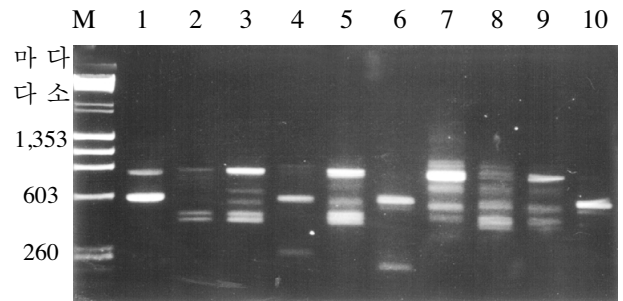


Fig. 3. Amplified RAPD products with OPC 6 from 10 clinical isolates of *A. niger*. Lanes 1, 4, 6 and 10, RAPD type I; lanes 2, 3, 5, 7, 8, and 9, RAPD type II; M, molecular marker (Kb).

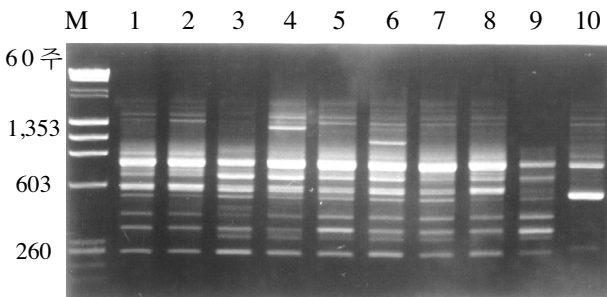


Fig. 2. Amplified RAPD products with OPC 6 from *A. fumigatus* isolates from Chonnam University Hospital (lanes 1 to 9) and *A. fumigatus* ATCC 64026 (lane 10). M. molecular marker (Kb).

(95%)가 동정되었다(Table 2).

OPC primers에 의한 RAPD분석

5개의 random primer (OPC primer 6, 7, 10, 18, 및 20)를 이용한 *Aspergillus* species의 RAPD 증폭산물은 보통 200-1,500 bp 사이에 3-15개의 band가 관찰되었다. 각 RAPD 양상은 균종이 다른 경우 그 양상이 상이하게 달랐고, 동일 균종내 균주들의 양상도 사용한 primer

차이는 있으나 균주간에 차이를 보였다. 따라서 동일 균종내 균주들의 5가지 OPC primer에 의한 RAPD 양상을 조합 비교함으로써 *A. fumigatus* (21주)는 8가지형으로, *A. flavus* (12주)는 7가지형으로, 그리고 *A. niger* (12주)는 크게 두 가지 형으로 작게는 10가지형으로 세분되었다. 또 *A. terreus* (12주)는 8가지형으로 구분되었다.

각 primer별 양상을 보면, 먼저 *A. fumigatus*의 경우 5개의 primer 중 OPC 7 및 18에 의해서는 동일한 RAPD 양상을 보였으나, OPC primer 6, 10 및 20에 의한 RAPD 양상은 동일 균종내 균주간에 다소 차이를 보여, 21주는 전체적으로 6가지형으로 구분되었다. 표준 균주인 *A. fumigatus* ATCC 64026도 전남대학교병원에서 분리된 21주와 OPC 7과 OPC 8 primer에 의한 RAPD양상은 거의 같았으나, OPC 6, 10 및 20에 의한 증폭산물에서는 상당한 차이를 보였다. Fig. 2는 OPC primer 6를 사용하여 증폭된 *A. fumigatus* 균의 RAPD 소견으로서 전남대병원 환자에서 분리된 균들은 RAPD 양상이 한 두 band에서 약간의 차이를 보였는데, *A. fumigatus* ATCC 64026과는 크게 다른 양상을 보였다. *A. flavus*의 RAPD 분석 결과는 OPC primer 6에 의한 RAPD 양상은 12주 모두 같았고, 나머지 4가지에 의한 RAPD 양상을

종합할 때 12주는 7가지형으로 구분되었다. *A. niger*는 OPC primer 20에 의한 RAPD 양상은 유사한 크기의 band의 수가 너무 많아 구분이 어려웠고, 나머지 4가지 OPC primer에 의해 명백히 다른 2가지형으로 구분되었다. 즉, 12주중 4주가 I형, 8주가 II형으로 구분되었는데, I형은 다시 4가지형으로 II형은 6가지형으로 세분되었다. Fig. 3은 OPC 6에 의한 *A. niger* 균주의 RAPD 양상으로 I 및 II형의 두 가지의 서로 다른 형을 보여준다. 12주의 *A. terreus* RAPD 분석결과, primer OPC 10에 의한 RAPD 양상은 12주 모두 같았으나, OPC primer 6, 7, 18 및 20에 의한 RAPD 산물에서는 균간의 차이가 관찰되어 이를 조합할 때 12주는 전체적으로 8가지형으로 구분되었다.

RAPD 분석의 재현성

임의로 추출한 5주에 대해 계대 배양, DNA 추출 및 RAPD 분석을 세 번씩 각기 시행하여 그 재현성을 검증하였는데, 210 bp 이하와 1,000 bp이상의 핵산 산물은 재현성에 일부 문제점이 있었으나 260 bp와 1350 bp 사이에서는 분명한 band를 관찰할 수 있어 재현성이 확인되었다. 특히 M13 primer를 이용한 RAPD의 경우 재현성이 우수하였다.

고 안

최근 면역이 약화된 환자의 수가 증가함에 따라 *Aspergillus species*에 의한 기회 감염의 빈도가 점점 증가하고 있어[1-5], 각종 분자생물학적 방법을 이용한 균 동정 및 감염에 대한 역학적 연구가 시도되고 있다. 이중 RAPD법은 *A. fumigatus*의 역학적 연구에 이용된 바 있는데[3, 10-12], 이들 보고들은 모두 PCR의 전단계인 *Aspergillus* DNA 추출 과정에 균사를 기계적으로 갈아서 부수는 등의 다수의 번거로운 과정과 phenol-chloroform 등을 이용하였고, 따라서 1-2일의 긴 시간이 소요되어 실제 임상적으로 이용하기가 어렵다. 본 연구에서는 열과 기계적 조작 (mechanical disruption)을 이용하여 *Candida* DNA를 약 1시간만에 추출하는, 간단한 DNA 추출법[14]을 *Aspergillus* DNA 추출에 이용하여 *Aspergillus species*에 대한 RAPD법을 보다 손쉽고 신속하게 시행하여 보았다. 즉, 신속하고 간단하게 RAPD법을 시행함으로써, 이 방법이 임상 검체에서 분리된 *Aspergillus species*의 균종을 신속하게 동정할 수 있는지, 또 동시에 동일 *Aspergillus species*내 균간의 역학적 분류에 이용될 수 있는가를 알아보하고자 하였다.

*Aspergillus species*는 공기내에 흔히 존재하므로 임상 검체에서 분리되었을 때 해석에 주의를 요한다. 임상적으로 감염이 의심되는 환자의 검체에서 한 번이라도

원인균으로 간주되는 *Aspergillus species*의 집락이 다수 배양되거나 동일한 균이 연속으로 배양되면 원인균이 확실하다. 따라서 균의 정확한 동정은 원인균의 확인과 동일 균종이 연속으로 분리되었는가를 알아내어 감염 유무를 판단하는데 도움을 준다[15]. 또 최근 *Aspergillus species*의 균종간에 amphotericin B에 대한 감수성에 차이가 있으며 특히 *A. terreus*는 amphotericin B에 내성을 보인다고 보고되어 정확한 균종의 동정은 치료약제의 선택에도 중요하게 되었다[16,17]. 현재까지 *Aspergillus species*의 동정은 주로 형태학적 동정법이 이용되고 있는데, 이는 특징적 형태가 나타날 때까지 배양 시간이 오래 걸리고 때로 형태학적 특성만으로는 동정이 어려울 때가 많다[1,2]. 본 연구의 대상이 된 63주 중에서도 3주가 형태학적으로 동정이 어려웠다.

본 연구에서 M13 primer를 이용한 RAPD 분석 결과, 6종의 *Aspergillus* 63주 중 60주(95%)가 동정이 가능하였다. 특히 형태학적 방법으로 동정이 애매했던 3주는 RAPD법에 의해 *A. flavus* 2주와 *A. terreus* 1주로 쉽게 동정이 되었고, 이는 핵산 probe를 이용한 PCR과 효소면역법으로 확인한 결과와 일치하여 RAPD법이 정확함을 알 수 있었다. 각 균종에서의 M13을 이용한 RAPD 소견은 각각 표준 균주인 *A. fumigatus* ATCC 64026, *A. flavus* ATCC 64025 및 *A. terreus* 64029의 RAPD 양상과 일치하였다. 따라서 M13을 이용한 RAPD법을 실시할 경우, ATCC 표준균주의 양상과 비교함으로써 각 균주의 동정이 가능하리라 생각된다. RAPD법으로 동정이 잘 안되었던 3주는 *A. niger* 2주와 *A. nidulans* 1주였다. *A. niger*의 12주중 2주의 증폭산물이 다른 것은 균간의 약간의 유전적 차이 때문으로 생각되며 *A. nidulans*의 경우는 이 균의 배양상 conidia 이외에도 cleistothecia 및 Hulle cell 등이 존재함으로[1], 이로 인한 다른 RAPD 양상의 차이로 생각되었다. 따라서 이 균들은 RAPD법만으로 균종의 동정이 어려울 가능성도 있음을 시사하였다. 최근 Latouche 등[8] 및 Shin 등[9]은 RAPD법으로 *Candida*의 동정을 시도하여 성적이 매우 좋았다고 하였는데, 본 연구에서는 M13 primer를 이용한 RAPD법으로 *Aspergillus*의 동정에 시도하여 역시 좋은 성적을 보였다. 특히 M13 primer에 의한 RAPD 양상은 재현성이 좋았다.

한편, *A. fumigatus* 같은 *Aspergillus species*는 병원 공기중 포자의 수가 증가하여 혈액종양이나 장기 이식 환자들에서 동일 균주에 의한 집단 병원감염을 발생시킬 수 있다고 보고되고 있는데[3,4], 면역이 약화된 환자가 모여있는 병동에서의 *Aspergillus*에 의한 감염이 발생하면 병원환경과 환자들에서 분리된 균주를 분석하여 병원감염 유무를 알아내는 것이 필요하다. 최근 *Aspergillus*의 역학적 조사를 위해 다양한 분자생물학적 방법들이 시도되고 있다[3-5,18,19]. Diaz-Guerra 등

[20]은 심장수술을 받은 환자에서 분리된 *A. flavus* 1주와 수술실 공기중에서 분리된 2주를 대상으로 RAPD 분석을 실시하여 동일한 유형을 보임을 보고하여 RAPD법이 *A. flavus*의 감염역학에 신뢰성이 있는 방법임을 보고하였다.

본 연구에서 5종의 OPC primer에 의한 *Aspergillus* species에 대한 RAPD 양상은 서로 다른 균간에는 큰 차이를 보였고 동일 균종내 서로 다른 균주간에도 몇몇 band에서 차이를 보였다. 특히 OPC 6, 10 및 20에 의한 RAPD 양상은 *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* 및 *A. terreus*의 동일 균종내 균주간에 다소 많은 차이를 보였다. Rinyu 등[11]은 *A. fumigatus* 균주들을 대상으로 몇몇 분자생물학적 방법으로 균주 분류를 시도하였는데, 미토콘드리아 DNA와 리보솜 DNA를 제한효소로 분해한 양상은 모두 일정한 반면, RAPD법은 몇몇 primer를 사용할 경우 균주 구분이 가능하였다고 보고하였다. 그들은 본 연구에서와 마찬가지로 OPC primer 제품을 이용하였는데, OPC 6, 7 및 10 primer가 *A. fumigatus* 균주를 구분하는데 좋다고 하였다. 본 연구에서는 OPC primer 6, 10 외에 OPC 20에 의한 RAPD 양상도 *A. fumigatus* 균주간에 차이를 보여, *A. fumigatus* 21주는 전체적으로 6가지 형으로 구분되었다. Clemons 등[21]은 RAPD법 등으로 동남아, 미국 및 유럽에서 분리된 *C. albicans* 균주를 비교하여 지역별로 분리된 균주간에는 유전학적으로 매우 큰 차이가 있음을 보고하였다. 본 연구에서도 전남대학교 병원환자에서 분리된 *A. fumigatus* 균주들과 표준균주 *A. fumigatus* ATCC 64026간에는 현저한 양상의 차이를 보였는데, 이는 지역별로 분포된 균주에 유전학적 차이가 있을 가능성을 시사하였다. 또 *A. niger*는 12주중 4주가 I형, 8주가 II형으로 크게 구분되었는데, 이로써 임상 검체에서 분리된 *A. niger* 균주는 크게 두 가지 유전형으로 나눌 수 있음을 알 수 있었다. 또 *A. niger* 12주는 다시 10가지형으로 세분되어 다른 *Aspergillus* 균종보다 더 다양한 양상을 보였는데, 이는 다른 *Aspergillus* 균종은 대부분 병원에 입원한 환자의 호흡기 검체에서 분리된 것에 비하여 이 균들은 대부분 외래 환자의 귀 분비물에서 분리되어 다른 *Aspergillus* 균종에 비해 유전학적 기원이 각각 다른 균주들이기 때문으로 생각되었다.

요약하면 M13 primer를 이용한 RAPD 양상으로 *Aspergillus* 균종의 동정이 가능하였으며, 또 5가지 OPC primer에 의한 RAPD 양상을 조합할 때 각 *Aspergillus* 균종은 몇 개의 형으로 구분될 수 있었다. 따라서 RAPD 분석은 *Aspergillus* species의 균종의 동정과 역학 조사에 있어 간단하고 신속한 방법으로 유용하리라 생각되었다.

요 약

배 경 : *Aspergillus* species는 임상 검체에서 칸디다 다음으로 많이 분리되는 병원성 진균으로 균종의 동정과 동일 균종내 균주간의 감별은 임상적 및 역학적 연구에 중요하게 되었다. 본 연구에서는 다양한 *Aspergillus* species를 대상으로 RAPD 분석을 실시하여 RAPD법이 *Aspergillus* species의 동정과 균주간의 감별에 이용될 수 있는 가를 알아보았다.

방 법 : 63명의 임상 검체에서 분리된 총 63주의 *Aspergillus* species를 대상으로 하였는데, 균종 별로는 *A. fumigatus* 21주, 그리고 *A. flavus*, *A. niger* 및 *A. terreus* 각 12주씩과 *A. nidulans*와 *A. sydowii* 각 3주씩이었다. RAPD 분석을 위한 primer로는 5종류의 OPC primer (OPC 6, 7, 10, 18 및 20)와 M13 (5'GAGGGTGGCGTTCT3') primer를 이용하였다.

결 과 : 63주의 *Aspergillus* species에 대한 RAPD 분석 결과, 각 균종별로 각기 다른 증폭산물이 관찰되었다. 특히 M13 primer에 의한 RAPD 양상은 균종별로 거의 같고 재현성이 좋았으며, 이 양상을 관찰함으로써 6종의 *Aspergillus* 63주중 60주(95%)의 동정이 가능하였다. 5종의 OPC primer에 의한 *Aspergillus* species에 대한 RAPD 양상은 서로 다른 균종에 비해 동일 균종간에는 매우 유사하였지만, 동일 균종내 서로 다른 균주에 몇몇 band에서 차이를 보였다. 따라서 5가지 OPC primer를 이용한 RAPD 성적을 조합하면 각 균종내 몇 가지 균 유형의 구분이 가능하였다.

결 론 : RAPD 분석법은 *Aspergillus* species의 신속한 균종 동정뿐 아니라 역학 조사에 있어 균주 분별에도 유용하리라 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Sigler L, Kennedy MJ. *Aspergillus, Fusarium, and other opportunistic moniliaceous fungi*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of clinical microbiology*. 7th ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1999;1212-41.
2. McGough DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Pfaller MA. *Fungi and fungal infections*. In: McClatchey KD, ed. *Clinical laboratory medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994;1169-96.
3. Leenders A, van Belkum A, Janssen S, de Marie S, Kluytmans J, Wielenga J, et al. *Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in a hematology ward*. *J Clin Microbiol* 1997;34:345-51.
4. Tang CM, Cohen J, Rees AJ, Holden DW. *Molecular*

- epidemiological study of invasive pulmonary aspergillosis in a renal transplantation unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994;13:318-21.
5. Van Belkum A, Quint WG, de Pauw BE, Melchers WJ, Meis JF. *Typing of Aspergillus species and Aspergillus fumigatus isolates by interrepeat polymerase chain reaction. J Clin Microbiol* 1993;31:2502-5.
 6. Robert F. Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, et al. *Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for Candida albicans in epidemiological surveillance of a burn unit. J Clin Microbiol* 1995;33:2366-71.
 7. Tyler KD, Wang G, Tyler SD, Johnson WM. *Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. J Clin Microbiol* 1997;35:339-46.
 8. Latouche GN, Daniel HM, Lee OC, Mitchell TG, Sorrell TC, Meyer W. *Comparison of use of phenotypic and genotypic characteristics for identification of species of anamorph genus Candida and related teleomorph yeast species. J Clin Microbiol* 1997;35:3171-80.
 9. Shin JH, Kook H, Shin DH, Hwang TJ, Kim M, Suh SP, et al. *Nosocomial cluster of Candida lipolytica fungemia in pediatric patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:344-9.
 10. Loudon KW, Burnie JP, Coke AP, Matthews RC. *Application of polymerase chain reaction to fingerprinting Aspergillus fumigatus by random amplification of polymorphic DNA. J Clin Microbiol* 1993;31:1117-21.
 11. Rinyu E, Varga J, Ferenczy L. *Phenotypic and genotypic analysis of variability in Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol* 1995;33:2567-75.
 12. Brandt ME, Padhye AA, Mayer LW, Holloway BP. *Utility of random amplified polymorphic DNA PCR and TaqMan automated detection in molecular identification of Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol* 1998;36: 2057-62.
 13. De Aguirre LA, Naishnav H, Westerman JM, Reiss E, Morrison CJ. *Rapid identification of Aspergillus species from other filamentous fungi and yeasts using species-specific DNA probes. abstr. C234, p.161. In Abstracts of the 96th General Meeting of American Society for Microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1997.*
 14. Shin JH, Nolte FS, Morrison CJ. *Rapid identification of Candida species in blood cultures by a clinically useful polymerase chain reaction. J Clin Microbiol* 1997; 35:1454-9.
 15. Richardson MD, Warnock DW. *Fungal infection. Diagnosis and treatment. 2nd ed. Berlin: Blackwell Science, 1997:113-30.*
 16. Sutton DA, Sanche SE, Revankar SG, Fothergill AW, Rinaldi MG. *In vitro amphotericin B resistance in clinical isolates of Aspergillus terreus, with a head-to-head comparison to variconazole. J Clin Microbiol* 1999;37:2343-5.
 17. 신중희, 홍원표, 신동현 기승정, 서순팔, 양동욱. 임상 검체에서 분리된 *Aspergillus* Species의 *amphotericin B*에 대한 생체의 감수성 검사 성적. *대한화학요법학회지* 2001;19: 33-42
 18. Chazalet V, Debeaupuis JP, Sarfati J, Lortholary J, Ribaud P, Shah P, et al. *Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings. J Clin Microbiol* 1998;36:1494-500.
 19. Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, et al. *Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of Aspergillus fumigatus. J Clin Microbiol* 1995;33:1596-601.
 20. Diaz-Guerra TM, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Gaztelurrutia L, Navarro JJ, Tudela JL. *Genetic similarity among one Aspergillus flavus strain isolated from a patient who underwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operating room. J Clin Microbiol* 2000;38:2419-22.
 21. Clemons KV, Feroze F, Holmberg K, Stevens DA. *Comparative analysis of genetic variability among Candida albicans isolates from different geographic locales by three genotypic methods. J Clin Microbiol* 1997;35:1332-6.