

다중 중합효소연쇄반응을 이용한 *Candida* 균종동정

이미경¹, 김혜련¹, 이영조²

중앙대학교 의과대학 진단검사의학교실¹, (주)씨젠 생명과학연구소²

배 경 : 신속한 *Candida* 균종동정을 위하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에 기초한 방법들이 시도되고 있다. 본 연구에서는 *Candida*의 internal transcribed spacers와 topoisomerase II 유전자를 사용하여 *Candida* 균종동정을 위한 다중 PCR을 개발하고자 하였다.

방 법 : 다중 PCR을 위하여 Dual Specificity Oligo (DSO) 시발체를 제작하였고, 8종류의 표준균주(*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*)와 96균주의 임상분리 *Candida* spp. (*C. albicans* 51균주, *C. parapsilosis* 10균주, *C. glabrata* 10균주, *C. tropicalis* 9균주, *C. krusei* 6균주, *C. guilliermondii* 5균주, *C. lusitaniae* 5균주)를 대상으로 다중 PCR 후의 아가로오스 겔 전기영동으로 균종을 동정하였다.

결 과 : DSO 시발체를 사용한 다중 PCR로 8종류의 표준균주의 감별이 용이하였다. 임상분리 96균주 모두 전통적인 방법으로 동정된 균종과 동일한 균종으로 확인되었다.

결 론 : *Candida* 균종동정 시 DSO 시발체를 사용한 다중 PCR은 일반 검사실에서 간편하고 신속하게 시행하기에 유용한 방법으로 사료되었다.

서 론

현재 *Candida* 속에는 대략 163종이 있으며, 사람에서 칸디다증을 일으키는 주요 균종으로는 *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* 등의 7가지가 있고, 최근에 새로운 병원균으로 생각되고 있는 *C. dubliniensis*도 HIV에 감염되지 않은 환자에서 침습성 병원균으로 보고되고 있다 [1]. 이중 가장 중요하고 흔한 병원균은 *C. albicans*이지만 *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* 등의 균종도 의미 있는 병원균으로 간주되고 있다 [2]. 또한 *C. glabrata*와 *C. krusei*는 fluconazole에 자연내성을 보이는 것으로 생각되고 있어, *Candida*는 균종별로 azole계 약제와 amphotericin B와 같이 현재 사용 중인 항진균제에 대해 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)가 다른 것으로 알려져 있다 [3]. 즉 현재 대부분의 *Candida* 균종은 예측 가능한 감수성 유형을 보이고 있고, 항진균제 감수성을 확

인하기 위한 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 표준 검사법을 임상 검사실에 도입하기에는 어려움이 있다는 이유로, 아직까지 일상적 항진균제 감수성 검사는 권장되지 않는다 [4]. 그러므로 치료 계획을 세우고 정확한 역학적 자료를 확보하기 위하여 보다 정확하고 신속한 *Candida*의 균종동정이 요구되고 있다.

그러나 배양에 기초한 전통적인 *Candida*의 균종동정은 수일간의 시간이 필요하기도 하며 인력과 비용이 소모되고, 일부 균종은 정확한 동정이 어려운 실정이다. 특히 1995년에 새로이 분류된 *C. dubliniensis*는 *C. albicans*와 매우 유사한 표현형을 보여 감별이 어려운 실정이다 [5]. 이러한 표현형적 특성을 이용한 검사의 문제점을 극복하기 위하여, *Candida*의 균종동정 방법에도 다양한 분자생물학적 기법에 기초한 방법들이 소개되고 있다 [2]. 즉, multilocus enzyme electrophoresis, restriction fragment length polymorphism (RFLP), Southern blot hybridization, 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), DNA 염기순서분석 등이 사용되고 있다 [6,7]. 이중에서도 PCR 방법은 일반 검사실에서 간편하고 신속하게 시행할 수 있어, 다양한 시발체와 반응 조건의 개선을 통한 시도가 이루어지고 있다.

이에 본 연구에서는 시발체 고안에서 한 염기의 차이까지 구별함으로 매우 특이하게 주형 DNA에 결합할 수

이 논문은 대한임상미생물학회 2006년도 연구비 지원에 의한 것임.

접 수 일: 06/8/30 게재승인일: 06/9/20

교신저자: 이미경

(140-755)서울시 용산구 한강로 3가 65-207

중앙대학교 용산병원 진단검사의학과

TEL : 02)748-9837 FAX : 02)797-3471

E-mail : cpworld@cau.ac.kr

있는 Dual Specificity Oligo (DSO) [8]를 제작하여 *Candida* 균종동정을 위한 다중 PCR을 개발하고 *Candida* 균종동정에서의 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 균주

중앙대학교 용산병원을 내원한 환자의 각종 임상검체에서 분리된 96균주(*C. albicans* 51균주, *C. parapsilosis* 10균주, *C. glabrata* 10균주, *C. tropicalis* 9균주, *C. krusei* 6균주, *C. guilliermondii* 5균주, *C. lusitaniae* 5균주)의 *Candida* 균종과 8균종의 표준 균주(*C. albicans* ATCC 18804, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 2001, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. guilliermondii* ATCC 6260, *C. lusitaniae* ATCC 34449, *C. dubliniensis* ATCC MYA-646)를 대상으로 하였다. 특히 임상분리 균주에서 *C. dubliniensis*의 검출을 확인하기 위하여, 51균주의 *C. albicans*에 *C. albicans*로 동정된 536균주 중 45℃에 48시간 배양 시 성장이 현저하게 저하된 24균주를 포함하였다. 균주들은 Sabouraud dextrose agar (SDA) plate에 2회 계대 배양하여 발아판 시험과 VITEK 2 (bioMerieux Vitek, Hazelwood, MO, USA) 등을 이용하여 동정하였다. *Candida* 균주는 50% glycerol에 풀어 -70℃에 보관하였다.

2. 다중 PCR을 위한 시발체 제작

각 균주의 특이적인 유전자로 internal transcribed spacers (ITS)와 topoisomerase II (TOPII) 유전자를 사용하여 고안하였다. 즉 각 균종별로 사용한 유전자의 accession number는 *C. albicans*는 ITS (AB018037), *C. dubliniensis*는 TOPII (AB019142), *C. glabrata*는 TOPII (AB010644), *C. krusei*는 TOPII (AB049139), *C. parapsilosis*는 TOPII (AB049144), *C. tropicalis*는 TOPII (AB049140), *C. lusitaniae*는 ITS (AF009215), *C. guilliermondii*는 TOPII (AB049145)였으며, clustal X (1.83, ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/)와 GeneDoc (http://www.psc.edu/biomed/genedoc/) 프로그램을 사용하여 DSO 시발체(Seegene Co., Seoul, Korea)를 고안하였다(Table 1). DSO 시발체는 35 염기 이상으로 길게 제작하게 되는데, 긴 염기로 인한 높은 융해온도는 시발체의 중간에 삽입한 linker가 만드는 기포와 유사한 구조에 의해 시발체가 두 부분으로 나누어지게 되어 융해온도를 낮춤으로 PCR을 가능하게 한다.

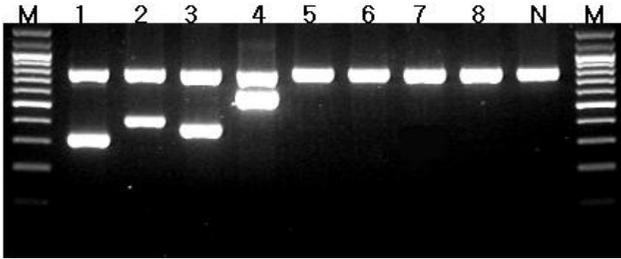
3. DNA 추출

-70℃에 보관 중인 균주를 SDA plate에 35℃로 2회 계대 배양하여 0.85% 식염수에 약 108개의 효모균을 풀고, 세포벽을 분쇄하기 위하여 lyticase (10,000 units/mL, Sigma-aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 10 μL를 첨가하여 37℃에 30분간 반응시킨 후, High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 DNA를 추출하였다.

Table 1. Primer sequences for identification of *Candida* spp.

	Primers	Oligonucleotide sequence (5'-3')	Product size
A set	<i>C. albicans</i> -F	TTATCAACTTGTCCACACCAGATTATIIIIITAATAGTCAA	323 bp
	<i>C. albicans</i> -R	TTACCGCCGCAAGCAATGTTIIIIITTAGACCTAA	
	<i>C. dubliniensis</i> -F	GGTAACTTATTAACCTCTTCGAIIIIIIGACGACAATG	424 bp
	<i>C. dubliniensis</i> -R	CTTTGATGGCTTTGACATACAIIIIIACATAGCTC	
	<i>C. glabrata</i> -F	TAAGGTACGTGATCCCTCAIIIIIIAGGATTGATG	608 bp
	<i>C. glabrata</i> -R	GTCTGATTCACCATTTGTCATIIIIITCATCTTTTC	
	<i>C. krusei</i> -F	GTTAGAGGTATCCGGGTCCTIIIIITGGTGAAGT	379 bp
	<i>C. krusei</i> -R	CGGTAATTTTACCACACAGCAIIIIIGCAACATCATC	
B set	<i>C. parapsilosis</i> -F	GGAGAGGTCGCCAGAGCCIIIIIGAGAAGGTGC	603 bp
	<i>C. parapsilosis</i> -R	CACACGGCTGATCAAGTTGIIIIIIAGCCACAAAC	
	<i>C. tropicalis</i> -F	CAAAAATTCGTTGCTAATGATAATIIIIICAATCGAATT	419 bp
	<i>C. tropicalis</i> -R	GAATAACACGATTATTACCGGATIIIIIGGTTTTGATG	
	<i>C. lusitaniae</i> -F	TTGCGATACGTAGTATGACTIIIIIIACGTGAATCA	194 bp
	<i>C. lusitaniae</i> -R	CCTACCTGATTTGAGGGCGAIIIIIIGGTGCTGTAA	
	<i>C. guilliermondii</i> -F	CCCGACCCTGTTGCTCCAIIIIIITGAAACGAGA	507 bp
	<i>C. guilliermondii</i> -R	CTTTATTCTCGATTTTCTGGAGIIIIIGGCTTTTCAGC	

(A) Multiplex primer set A



(B) Multiplex primer set B

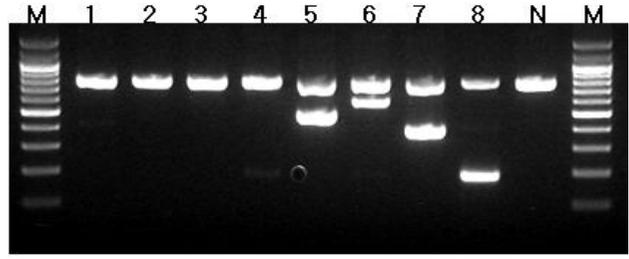
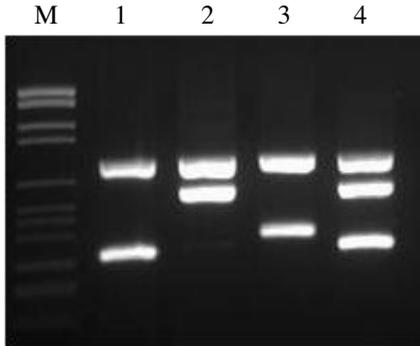


Fig. 1. Species-specific DNA amplifications by multiplex PCR using each of the primer sets. A 100-bp DNA ladder was used as molecular size marker (M). Negative control was used DEPC treated water (N). Internal control : 800bp. Lane 1 (323 bp), *C. albicans* ATCC 18804; Lane 2 (424 bp), *C. dubliniensis* ATCC MYA-646; Lane 3 (379 bp), *C. krusei* ATCC 6258; Lane 4 (608 bp), *C. glabrata* ATCC 2001; Lane 5 (507 bp), *C. guilliermondii* ATCC 6260; Lane 6 (603 bp), *C. tropicalis* ATCC 750; Lane 7 (419 bp), *C. parapsilosis* ATCC 22019; Lane 8 (194 bp), *C. lusitaniae* ATCC 34449.

(A) Multiplex primer set A



(B) Multiplex primer set B

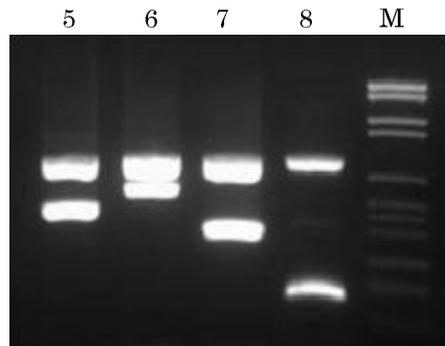


Fig. 2. Species-specific DNA amplifications by multiplex PCR in clinical isolates of *Candida* spp. Lane M, molecular size marker; Lane 1 (323 bp), *C. albicans*; Lane 2 (608 bp), *C. glabrata*; Lane 3 (379 bp), *C. krusei*; Lane 4 (323 bp and 608 bp), *C. albicans* and *C. glabrata*; Lane 5 (507 bp), *C. guilliermondii*; Lane 6 (603 bp), *C. tropicalis*; Lane 7 (419 bp), *C. parapsilosis*; Lane 8 (194 bp), *C. lusitaniae*.

4. 다중 PCR

8균종의 *Candida* 를 동정하기 위한 PCR은 4균종씩 2세트(A와 B세트)의 다중 PCR로 구성하였으며, A세트는 *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*를 B세트는 *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*를 각각 동정할 수 있다(Table 1). PCR 반응액은 각각의 시발체 5 pmole과 DNA 1 μ L를 첨가하여 총 20 μ L로 하였으며, PCR 반응은 자동온도조절기 (96 well GeneAmp[®] PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)를 이용하여 94 $^{\circ}$ C에서 15분간 전 변성시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 1분30초 및 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초씩 35회 증폭하고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 연장반응시켰다. 각각의 증폭산물은 2% 아가로오스 겔에서 100 V로 30분간 전기영동한 후 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 염색하여 Image system (ChemiDoc XRS

system, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 분절의 크기를 확인하였다.

결 과

1. *Candida* 균종동정을 위한 다중 PCR 개발

8균종의 *Candida* 를 동정하기 위하여 2개의 tube에 각각 4쌍의 시발체를 첨가하여 *Candida* 표준균주에서 추출한 DNA를 주형으로 다중 PCR을 시행하였다. A세트에서는 *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*에 해당하는 323 bp, 424 bp, 608 bp, 379 bp의 PCR 산물이 특이하게 관찰되었고, B세트에서는 *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*에 해당하는 419 bp, 603 bp, 194 bp, 507 bp의 PCR 산물이 관찰되어 균종 간 구별이 가능하였다(Fig. 1).

2. 다중 PCR에 의한 임상분리 *Candida*의 균종 동정

임상검체에서 분리된 총 96균주의 *Candida* spp.를 대상으로 시행한 다중 PCR에서, 94 균주는 배양에 기초한 전통적인 방법으로 동정된 균종과 동일한 균종으로 동정되었으며, 나머지 2 균주는 전통적인 방법으로 동정된 균종과 다르게 동정되었다. 그러나 전통적인 방법으로 *C. krusei*로 동정되었던 1균주는 다중 PCR에서 *C. glabrata*로 동정되어 VITEK 2로 재동정한 결과 *C. glabrata*로 확인되었고, 또한 발아판 시험으로 *C. albicans*로 동정되었던 1균주는 다중 PCR에서 *C. albicans*와 *C. glabrata*가 동시에 검출되어 재확인한 결과 *C. albicans*와 *C. glabrata*가 동시에 존재함이 확인되었다(Fig. 2).

고 찰

분자생물학적 기법을 이용하는 *Candida* spp.의 균종 동정 방법 중 PCR은 일반검사실에서 간편하고 신속하게 시행할 수 있어 흔히 이용되고 있다. 최근에는 실시간(real-time) PCR이 개발되어 다중 증폭이 시발체와 소식자를 사용한 *Candida* 균종 동정을 시도하여 PCR 후의 처리과정 없이 특이한 결과를 보고하였지만[9], 아직까지 실시간 PCR은 초기 장비도입과 검사수행에 고가의 비용이 소요되는 단점이 있다. 따라서 일반 PCR과 전기영동만으로 확인이 가능한 균종 동정 방법은 임상검사실에서 매우 간편하고 경제적으로 시도할 수 있어 유용하다.

균종 동정을 위한 PCR법은 증폭하고자 하는 DNA 표적의 결정과 시발체의 선택이 특히 중요하며, 모든 세균에 공통적으로 있는 반복염기서열, 결합 확률이 높은 임의의 염기서열, 또는 한 염색체 내에 다양한 수가 존재하는 특정 염기서열 부위 등을 고려하여 시발체를 선택하게 된다[10]. 미생물의 계통발생학적 발생 분류에 흔히 사용되는 부위는 small-subunit (SSU) rRNA, large-subunit (LSU) rRNA, ITS 등이 있다[11]. SSU rRNA의 염기순서 분석은 세균에서는 매우 효과적인 방법이지만, 진핵생물에 속하는 진균의 경우에는 SSU와 LSU rRNA 사이에 있는 ITS 부위가 균종 동정을 위한 표지부위로 사용될 수 있다[11]. *Candida* spp.의 균종 동정에 가장 흔히 사용되고 있는 표적부위는 5.8S, 18S 및 28S rRNA 유전자가 포함된 잘 보존된 rDNA 부위[2,12-14]와 이러한 유전자들 사이의 ITS 부위[15-17] 또는 intergenic spacer (IGS) 부위[18] 등이 있으며, 그 외에도 intron splice 부위[18], heat shock protein 유전자(*HSP70*) 부위[20], *CKRS-1*[21], *TOPII* 유전자 부위[22] 등을 이용한 균종 동정이 보고되었다.

본 연구에서는 ITS와 *TOPII* 유전자 부위의 염기서열을 이용하여 시발체들을 고안하였고, 임상에서 흔히 분리되는 8종류의 *Candida* spp.의 동정을 시도하고자 2개의 세

트로 다중 PCR을 시도하였다. 8 쌍의 시발체를 단일 시험관에 시행하는 것이 좀 더 편리하지만, 다중 PCR의 재현성을 유지하고 아가로오스 겔에서의 구별을 용이하게 하기 위하여 2개의 세트로 구성하였다. 다중 PCR은 검체에 있는 두 가지 이상의 표적 DNA를 동시에 증폭할 수 있도록 둘 이상의 시발체를 동일 반응액에 넣어 단일 시험관에서 동시에 증폭하여 검출하는 방법으로, 단일 시험관에서 여러 가지의 다른 미생물을 동시에 검사할 수 있으므로 임상 미생물분야에서 많이 시도되고 있다. 그러나 다중 PCR은 신속하고 편리한 검색 방법이지만, 적합한 반응조건을 개발하기가 어렵거나 수많은 반복 실험이 필요하기도 하다. 성공적인 다중 PCR을 위한 조건에는 시발체의 상대 농도, PCR buffer의 농도, 염화마그네슘과 dNTP 농도의 균형, annealing 온도, 주형 DNA와 DNA 증합효소의 양 등이 중요하다[23]. 그러나 일반 PCR보다 위양성, 위음성 및 재현성이 낮을 가능성이 높으므로 새로운 다중 PCR을 시도할 경우 철저한 평가와 확인이 필요하다. 본 연구에서 제작된 시발체들은 35 염기 이상으로 길게 제작되었지만, 긴 염기로 인한 높은 용해온도를 시발체의 중간에 삽입한 linker가 만드는 기포와 유사한 구조에 의해 시발체를 두 부분으로 나눔으로 용해온도를 낮추어 교차반응 없이 균종 특이 PCR이 가능하였다. 본 연구에 사용된 표준균주와 임상분리 *Candida* 균주 모두에서 정확하게 균종 동정이 가능하였으며, DNA 추출에서 결과 확인까지 5시간 이내의 시간이 소요되었고 PCR과 전기영동만으로 확인이 가능하였다. 또한 다중 PCR로는 *C. albicans*와 *C. glabrata*가 동시에 존재하는 경우의 확인이 가능하였으며, 대부분의 병원 검사실에서 *C. albicans*와 non-*C. albicans*의 감별에 쓰이고 있는 발아판 시험만으로는 두 균주가 함께 존재하는 경우에 정확하게 동정되지 않을 가능성이 있었다.

또한 본 연구에 사용된 51균주의 *C. albicans*에는 임상 분리 균주에서의 *C. dubliniensis*의 검출을 확인하기 위하여 총 536균주의 *C. albicans* 중 45°C에 48시간 배양시 성장이 현저하게 저하된 24균주를 포함하였다. *C. dubliniensis*는 *C. albicans*와 매우 유사한 표현형적 성상을 가지고 있어 감별이 어려운 것으로 알려져 있고 국내에서는 *C. dubliniensis*의 빈도에 관한 보고가 거의 없어, *C. albicans*로 동정된 균주 중 45°C에서 성장이 현저하게 저하된 균주를 선택하여 다중 PCR과 VITEK 2로 확인하여 보았으나 모두 *C. albicans*로 동정되어 임상분리 균주에서의 *C. dubliniensis*를 확인할 수 없었다.

이상과 같이 *Candida*의 ITS와 *TOPII* 유전자 부위에서 제작한 DSO 시발체를 사용하여 다중 PCR을 시행한 결과 8종류의 표준균주와 96 균주의 임상분리 *Candida* 균주 모두에서 정확하게 균종 동정이 가능하였으며, 검사방법이 간편하고 신속하였다. 따라서 전통적인 방법으로 균종 동정이 어렵거나 정확한 균종분포를 확인하여야 하는 경우 또는 신속한 보고가 필요한 경우 일반 검사실에

서 시행하기에 유용한 방법으로 사료되었다.

참 고 문 헌

1. Brandt ME, Harrison LH, Pass M, Pass M, Sofair AN, Huie S, et al. *Candida dubliniensis* fungemia: the first four cases in North America. *Emerg Infect Dis* 2000;6:46-9.
2. de Llanos Frutos R, Fernandez-Espinar MT, Querol A. Identification of species of the genus *Candida* by analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2004;85:175-85.
3. Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR, Conn LA, Perkins BA, Stephens DA, et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999;29:1164-70.
4. Vandebossche I, Vanechoutte M, Vandevienne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility testing of fluconazole by the NCCLS broth macrodilution method, E-test, and disk diffusion for application in the routine laboratory. *J Clin Microbiol* 2002;40:918-21.
5. Sullivan DJ, Moran GP, Pinjon EP, Al-Mosaid A, Stokes C, Vaughan C, et al. Comparison of the epidemiology, drug resistance mechanisms, and virulence of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research* 2004;4:369-76.
6. Soll DR. The Ins and Outs of DNA Fingerprinting the Infectious Fungi. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:332-70.
7. Ellepola ANB and Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J Microbiol* 2005;43:65-84.
8. PCT/KR2006/000746, Seegene Inc., 2006. Processes using Dual Specificity Oligonucleotide and Dual Specificity Oligonucleotide.
9. Cirak M, Kalkanci A, Kustimur. Use of molecular methods in identification of *Candida* species and evaluation of fluconazole resistance. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:1027-32.
10. Van Belkum A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:174-84.
11. O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:5544-50.
12. Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 1995;33:2913-2919
13. Jaeger EEM, Carroll NM, Choudhury S, Dunlop AAS, Towler HMA, Matheson MM, et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:2902-8.
14. Ball LM, Bes MA, Theelen B, Boekhout T, Egeler RM, Kuijper EJ. Significance of amplified fragment length polymorphism in identification and epidemiological examination of *Candida* species colonization in children undergoing allogeneic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 2004;42:1673-9.
15. Nho S, Anderson MJ, Moore CB, Denning DW. Species differentiation by internally transcribed spacer PCR and HhaI digestion of fluconazole-resistant *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, and *Candida norvegensis* strains. *J Clin Microbiol* 1997;35:1036-9.
16. Elie CM, Litt TJ, Reiss E, Morrison CJ. Rapid identification of *Candida* species with species-specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 1998;36:3260-5.
17. Massonet C, Eldere JV, Vanechoutte M, Baere TD, Verhaegen J, Lagrou K. Comparison of VITEK 2 with ITS2-fragment length polymorphism analysis for identification of yeast species. *J Clin Microbiol* 2004;42:2209-11.
18. Radford SA, Johnson EM, Leeming JP, Millar MR, Cornish JM, Foot ABM, et al. Molecular epidemiological study of *Aspergillus fumigatus* in a bone marrow transplantation unit by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences. *J Clin Microbiol* 1998;36:1294-9.
19. de Barros Lopes M, Soden A, Martens AL, Henschke PA, Langridge P. Differentiation and species identification of yeasts using PCR. *Int J Syst Bacteriol* 1998;48:279-86.
20. Arancia S, Sandini S, Cassone A, De Bernardis F, La Valle R. Construction and use of PCR primers from a 65 kDa mannoprotein gene for identification of *C. albicans*. *Mol Cell Probes* 2004;18:171-5.
21. Carlotti A, Chaib F, Couble A, Bourgeois N, Blanchard V, Villard J. Rapid identification and fingerprinting of *Candida krusei* by PCR-based amplification of the species-specific repetitive polymorphic sequence CKRS-1. *J Clin Microbiol* 1997;35:1337-43.
22. Kanbe T, Horii T, Arishima T, Ozeki M, Kikuchi A. PCR-based identification of pathogenic *Candida* species using primer mixes specific to *Candida* DNA topoisomerase II genes. *Yeast* 2002;19:973-89.
23. Markoulatos P, Sifakakos N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002;16:47-51.

Identification of *Candida* Species by Multiplex Polymerase Chain Reaction

Mi-Kyung Lee¹, Hye-Ryoun Kim¹, and Young-Jo Lee²

*Department of Laboratory Medicine¹, Chung-Ang University College of Medicine; and Seegene Inc.²,
Seoul, Korea*

Background: Polymerase chain reaction (PCR)-based methods have been described for rapid detection and identification of *Candida* spp. Multiplex PCR assay was developed using internal transcribed spacers and topoisomerase II gene for the accurate identification of *Candida* species.

Methods: We designed Dual Specificity Oligo (DSO) primers for multiplex PCR. Multiplex PCR was followed by agarose gel electrophoresis to test 8 type strains (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*) and 96 clinical isolates (*C. albicans* 51 isolates, *C. parapsilosis* 10 isolates, *C. glabrata* 10 isolates, *C. tropicalis* 9 isolates, *C. krusei* 6 isolates, *C. guilliermondii* 5 isolates, *C. lusitaniae* 5 isolates) of *Candida* spp.

Results: With multiplex PCR using DSO primers, the eight *Candida* type strains each could be easily differentiated and all 96 clinical isolates were identified as the same species as were identified by the conventional method.

Conclusion: Multiplex PCR followed by electrophoresis can be useful for the simple and rapid identification of *Candida* species in routine laboratories.

(Korean J Clin Microbiol 2006;9(2):119-124)

Keywords: *Candida* species identification, Multiplex PCR, Internal transcribed spacers, Topoisomerase II

Address reprint requests to : Mi-Kyung Lee, M.D., Department of Laboratory Medicine, Chung-Ang University College of Medicine, 65-207 Hangangro-3-ga, Yongsan-gu, Seoul 147-755, Korea.
TEL: +82-2-748-9837 FAX: +82-2-797-3471 E-mail: cpworld@cau.ac.kr