

# 칸디다혈증 환자에서 분리된 *Candida albicans* 균주의 중합효소연쇄반응 및 Southern 교잡법을 이용한 형별 분석

서울 보훈병원 가정의학과<sup>1</sup>, 전남대학교 의과대학 진단검사의학교실<sup>2</sup>

박주열<sup>1</sup> · 신종희<sup>2</sup> · 양성진<sup>2</sup> · 오봉준<sup>2</sup> · 조 덕<sup>2</sup> · 기승정<sup>2</sup> · 신명근<sup>2</sup> · 서순팔<sup>2</sup> · 양동욱<sup>2</sup>

## DNA Fingerprinting of *Candida albicans* Strains Isolated from Candidemic Patients by Polymerase Chain Reaction and Southern Hybridization Methods

Ju Yeoul Park, M.D.<sup>1</sup>, Jong Hee Shin, M.D.<sup>2</sup>, Sung Jin Yang, M.D.<sup>2</sup>, Bong Joon Oh, M.D.<sup>2</sup>, Duck Cho, M.D.<sup>2</sup>, Seong Jung Kee, M.D.<sup>2</sup>, Myung Gun Shin, M.D.<sup>2</sup>, Soon Pal Suh, M.D.<sup>2</sup> and Dong Wook Ryang, M.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Family Medicine, Seoul Veterans Hospital, Seoul

<sup>2</sup>Department of Laboratory Medicine, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

**Background :** Although several molecular typing methods have been used to investigate *C. albicans* infections, there remains no "gold standard" method by which relatedness of *C. albicans* strains is determined. In this study, two DNA fingerprinting methods were compared for genotyping of clinical strains of *C. albicans* isolated from candidemic patients.

**Materials and Methods :** Twenty-nine strains of *C. albicans* isolated from various clinical specimens (14 from blood, 7 from catheter, 4 from respiratory tract secretion, and 4 from urine) of 14 candidemic patients were analyzed. Primer 1245 and 1246 were employed for IR PCR and Southern blot hybridization method was used for C2 fingerprinting, with Ca3 and C1 as primers, after the fragmentation of DNA with *EcoRI*

**Results :** IR PCR method separated 29 isolates into 9 (1245 primer), 7 (1246 primer) and 14 (combination of two primers) types, whereas C1 fingerprinting identified 16 different types. By combining the IR PCR and C1 fingerprinting methods, total of 16 different genotypes were identified among 29 isolates from 14 patients, which is the same result obtained by the C1 fingerprinting only. Using both methods, blood and non-blood isolates from each patient produced identical genotypes for 10 patients and different genotypes for 1 patient. In three patients, isolates from blood and other site of each patient showed identical patterns by IR PCR fingerprinting, but appeared different (n=1) or similar (n=2) by C1 fingerprinting. Overall, for 87% (13/15) of patients, isolates collected from catheter (6 of 7 patients), urine (4 of 4 patients), or respiratory (3 of 4 patients) were identical or similar to the corresponding blood isolates.

**Conclusion :** Our study shows that C1 fingerprinting method is more discriminatory than IR PCR for the molecular typing of *C. albicans* isolates. For the majority of patients, blood and other site isolates had identical or similar genotypes.

**Key Words :** *Candida albicans*, Candidemia, IR PCR, C1 fingerprinting, Southern hybridization

## 서 론

접수 : 2004년 6월 22일, 승인 : 2004년 9월 25일  
교신저자 : 신종희, 광주광역시 동구 학동 8번지  
전남대학교병원 진단검사의학과  
Tel : 062)220-5342, Fax : 062)224-2518  
E-mail : shinjh@chonnam.ac.kr

*Candida albicans*는 칸디다혈증의 가장 흔한 원인균이며(1,2), 전체 진균혈증 원인균의 50-70%를 차지한다(3). *C. albicans*는 인체 피부나 점막의 상재균으로 흔히 존재

하는데(4), 칸디다혈증은 환자의 점막내 상재균이 혈류로 들어오거나 혹은 오염된 수액, 의료기기, 혹은 의료진의 손 등 병원 환경에서 살아남은 균이 다양한 경로를 통해서 혈류로 들어와 발생한다(3). 입원 환자에서 칸디다혈증이 발생하면 입원기간이 평균 한 달 정도 연장되며 평균 치명율은 40%이다(2,5). 이처럼 심각한 문제로서 대두되고 있는 칸디다혈증을 예방하기 위해서는 발병경로에 대한 분자역학적 연구가 필요하다.

최근 개발된 다양한 분자생물학적 타이핑 방법은 칸디다 감염의 발생기전과 역학적 연구를 가능하게 하였는데, *C. albicans*에 대해서 가장 적합하다고 인정된 방법은 아직 정립되지 않은 상태이다. 칸디다에 대한 감염의 역학 조사나 아형의 구분에는 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석, multilocus enzyme electrophoresis, repetitive DNA probe를 이용한 southern 교잡법, random amplified polymorphic DNA (RAPD)법, interrepeat polymerase chain reaction (IR PCR)법, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 이용한 핵형 분석(electrophoretic karyotyping) 혹은 염색체 DNA의 제한 효소 분석법 등이 시도되고 있다(6-12). 이러한 방법들은 각기 칸디다 균주의 타이핑에 있어 민감하고 분별력이 높은 것으로 보고되고 있으나 이러한 방법을 동시에 사용하여 유용성을 비교한 연구는 그리 많지 않다.

본 연구에서는 칸디다혈증 환자에서 분리된 *C. albicans* 균주를 대상으로 IR PCR법 및 C1 probe를 이용한 Southern 교잡법(C1 fingerprinting법)에 의한 균 형별 검사를 시도하여 칸디다혈증 환자의 혈액과 비혈액 검체에서 분리된 *C. albicans* 균주의 유전학적 연관성을 규명하고, 아울러 *C. albicans* 균주의 역학적 분류에 있어 두 가지 방법의 유용성을 알아보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대 상

2000년 1월부터 2002년 12월까지 3년간 전남대학교병원에서 칸디다혈증으로 진단된 환자 14명에서 분리된 *C. albicans* 29주를 대상으로 하였다. 혈액과 혈액 이외의 검체에서 *C. albicans*의 균 수집이 가능하였던 대상 환자는 총 14명으로서 모두 입원 환자였는데, 이 중 4명은 미숙아였으며, 환자별 기저질환은 다양하였다(Table 1). 대상 균주는 각 환자별로 혈액과 혈액 이외의 검체에서 각 2-3주씩(13명 2주 및 1명 3주) 수집된 균주이었는데, 29주 중 14주는 14명의 환자의 혈액에서 각각 1주씩 분리

된 균주이었고 나머지 15주는 혈액 이외 검체에서 분리된 균주로서 요에서 4주, 카테터에서 7주 및 호흡기에서 4주 분리되었다. *C. albicans* 균종은 동정에는 발아판 시험, API 20C 및 ATB 32C system (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) 검사 성적 및 cornmeal agar와 CHROMagar (Gemini, UK)에서 48시간 배양 후 형태관찰 등을 이용하여 동정하였다(13,14).

### 2. *C. albicans* genomic DNA의 추출

칸디다 genomic DNA의 추출은 Soll 등의 방법(15)을 변형하여 실시하였다. 먼저 순수 배양된 집락 1개를 YPD (2% glucose, 2% Bactopeptone, 1% yeast extract, Difco, Detroit, MI, USA) 액체 배지에 부유시켜 30℃에 18시간 동안 배양한 후, 500  $\mu$ L의 세척액(1 M sorbitol)을 첨가하여 6000 rpm에서 10분간 원심하였다. 세척 후 원심된 세포는 500  $\mu$ L의 lyticase 용해액(1 M sorbitol, 50 mM potassium phosphate, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.2 mg lyticase)에 부유시켜 30℃에서 2시간 동안 반응시켜 spheroplast를 만든 후 SDS 용해액(50 mM EDTA, 2 mg SDS)으로 옮기고 70℃에서 1시간 동안 방치하여 DNA가 유리되도록 하였다. 유리된 DNA는 ethanol에 침전시켜 50  $\mu$ L의 TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) 완충액에 녹인 다음 UV spectrophotometer (Nanodrop Technology, Centreville, DE, USA)으로 정량하여 사용하였다.

### 3. Interrepeat PCR (IR PCR) 분석

IR-PCR을 위한 IR primer는 prokaryotic primer 쌍으

Table 1. Clinical Characteristics of 14 Patients with *C. albicans* Candidemia

Patient code	Age	Sex	Underlying disease
A	67 y	F	Septic shock
B	49 y	F	Acute respiratory distress syndrome
C	24 d	M	Prematurity, VLBW
D	69 y	F	Acute renal failure
E	78 y	F	Toxic shock syndrome
F	75 y	F	Pneumonia, septic phlebitis
G	61 y	M	Esophageal rupture
H	43 y	F	Acute pyelonephritis
I	68 y	M	Acute drug intoxication
J	2 y	M	Congenital heart disease
K	45 y	M	Acute respiratory distress syndrome
L	9 d	M	Prematurity, VLBW
M	10 d	F	Prematurity, VLBW
N	14 d	F	Prematurity, VLBW

Abbreviations: M, male; F, female; VLBW, very low birth weight

로 primer 1245 (5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3')과 primer 1246 (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3')을 사용하여 Bartie 등의 법(6)을 변형하여 시행하였다. PCR 반응액은 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U SuperTaq Polymerase, 각각의 dNTP 200 μM씩, 50 mM KCl 및 0.1% Triton X-100에 칸디다 genomic DNA 150 ng을 넣어 총 50 μL의 양으로 시행하였다. PCR은 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer model 9600, Branchburg, NJ, USA)를 사용하여 시행하였는데, 온도 조건은 94℃에서 5분간 predenaturation 시킨 뒤, 94℃에서 1분 denaturation, 25℃에서 2분 annealing, 그리고 74℃에서 2분간 extension을 한 주기로 40회 실시하고 74℃에서 5분간 postextension 시켰다. PCR 산물의 확인은 0.8% Nusieve agarose gel에 PCR 산물 20 μL를 loading 한 후 4℃에서 5시간 동안(100V) 전기 영동하여 확인하였다. IR PCR 전기영동 결과는 하나의 주요 band가 다른면 다른 DNA형으로 간주하였다.

#### 4. C1 probe을 이용한 Southern 교잡법(C1 fingerprinting)

##### 1) C1 Probe 제작

*C. albicans* 표준균주인 ATCC 90028 균주로 부터 추출한 genomic DNA로부터 다형성 부분인 C1 region을 증폭하여 PCR 클로닝을 실시하였다(16). PCR 반응액은 0.5 μM primer C1-1 (ACA AGA TAG CTA GAG CTC AGA AG), primer C1-2 (CCG CAA ATT CCT TAA CTA TG), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 U high fidelity enzyme, 각각의 dNTP 200 μM, 50 mM KCl 및 0.1% Triton X-100에 genomic DNA 300 ng을 넣어, 94℃에서 5분간 predenaturation 시킨 뒤, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분간을 한 주기로 30회 실시하고 72℃에서 10분간 postextension 시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR 2.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 혼합한 후, T4 DNA ligase을 이용하여 14℃에서 16시간동안 반응하여 접합(ligation) 시키고, 이 반응산물을 *Echerichia coli* TOP 10 숙주세포에 형질전환(transformation) 시켰다.

형질전환은 접합된 반응산물과 숙주세포인 TOP 10 세포를 혼합하여 얼음 속에서 30분간 방치한 후, 42℃에서 30초간 heat shock을 주어 시행하였으며, 형질전환된 세포는 LB (Luria Bertani)-ampicillin (100 μg/ml) 혼합배지에서 37℃에 16시간 배양하여 선별하였다. 선별된 집락은 Plasmid DNA Purification kit (Generalbiosystem,

Seoul, Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 추출한 후, *EcoRI* (Kosco, USA)으로 절단하여 0.8% agarose gel 상에서 998 bp 밴드를 관찰하고, 염기서열을 분석하여 확인하였다. 염기서열은 형광 dNTP가 들어있는 Big dye Terminator cycle sequencing kit (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여 설명서대로 PCR 증폭한 후 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer/Applied Biosystems)을 이용하여 자동 분석하였다. 염기서열을 확인한 998 bp의 *EcoRI* 단편은 Nick Translation system (Invitrogen)의 DNA polymerase I과 DNase I mixture 이용하여 15℃에서 1시간 동안 방치하여 α-<sup>32</sup>P-dCTP labelled C1 단편 probe를 합성하였다.

##### 2) 교잡 반응

대상이 된 29주의 *C. albicans* genomic DNA는 각각 5-10 μg을 *EcoRI* (20 U)으로 37℃에서 2시간 분해처리한 후 0.8% agarose gel에서 하루 밤 동안(35 V) 전기영동 시켰다. 전기영동이 끝난 겔은 denaturation 용액(0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl)에서 genomic DNA를 변성시킨 후 중화 용액(0.5 M Tris-Cl, pH 8.0, 1.5 M NaCl)에 옮겨 15분간 방치하여 중화시킨 후, 20배의 SSC 완충액(3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate)하에 나일론 막에 16-20 시간동안 capillary transfer하였다. 나일론 막은 U.V. cross-linker (1.5 J/cm<sup>2</sup>)에서 DNA를 고정하여 칸디다 C1 단편 probe에 교잡반응을 시켰다. 교잡반응은 pre-hybridization 용액(50% formamide, 5×SSC, 5×Denhard's sol, 0.1% SDS, 100 μg/mL denatured salmon sperm DNA)에 UV cross-linking 된 막을 2시간 방치 후, Nick Translation system (Invitrogen)에 의해 합성된 α-<sup>32</sup>P-dCTP labelled probe로 65℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 교잡반응이 끝난 막은 65℃에서 1시간 동안 세척 후 -70℃에서 XAR-S 필름(Eastman Kodak Co., Wilmington, Del, USA)에 노출시켜 육안 관찰하였다. 균주의 C1 fingerprinting 양상의 판정은 모든 band가 같으면 동일형으로, 전체 band중 1개 혹은 2개의 band만 다른면 유사한 형으로, 3개 이상의 band가 다른면 다른 DNA형의 균으로 간주하였다(15, 16).

## 결 과

### 1. IR PCR법에 의한 DNA fingerprinting

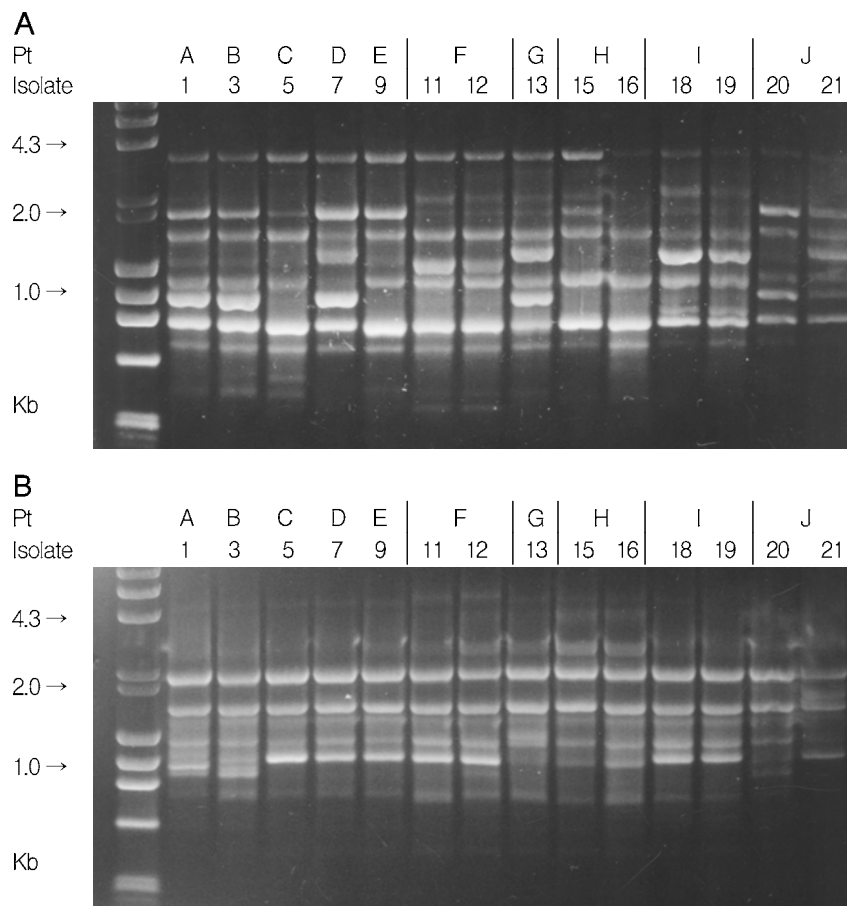
*C. albicans* 29주에 대해 두 가지 primer를 이용하여 IR PCR 분석을 시행한 결과, 모든 균주에서 3개 이상의

band를 보였고, 특히 0.5 kb와 4 kb의 사이에서 약 3-10 개사이에서 서로 크기가 다양하게 나타나 구분이 가능하였다(Fig. 1, 2). 임의로 추출한 5주에 대해 균의 DNA 추출 및 IR PCR 분석을 세 번씩 각기 시행하여 그 재현성을 검증하였는데, 약하게 염색된 band는 재현성에 문제가 있었으나 진하게 나타나는 주요 band는 매 실험마다 분명하게 관찰할 수 있어 재현성이 확인되었다. 따라서 IR PCR 양상은 주요 band를 위주로 분석하였다. Fig. 1A는 10명(환자 A-J)에서 분리된 14주의 primer 1245에 의한 IR PCR fingerprinting 양상으로, 2명(환자 A와 B)의 균주가 A1형, 2명(환자 C와 E) 균주가 A2형으로 구분되었고 나머지 균주는 각기 환자별로 다른 형으로 구분되었다. Fig. 1B는 동일 균주에 대한 primer 1246을 이용한 IR PCR 소견으로서 균주마다 공통적으로 나타나는 band 수에 비해 다형성을 보이는 band가 상대적으로 적었고, 5

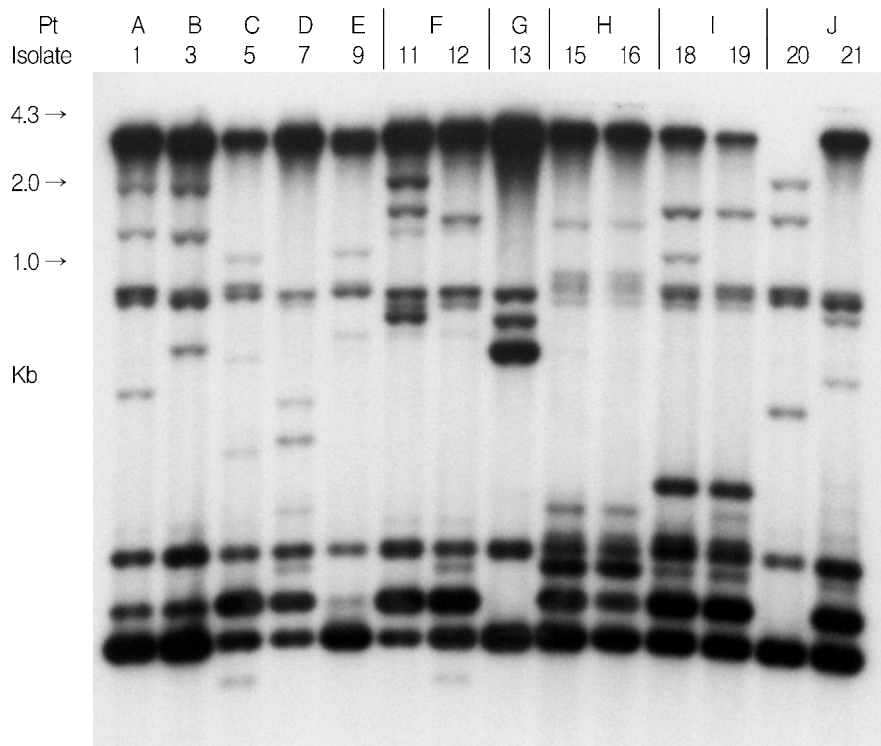
명(환자 C, D, E, F 및 I)의 다른 환자들로부터 유래한 균주가 모두 B2형으로 구분되는 등 primer 1245를 이용한 경우보다 더 변별력이 적었다. 총 29주는 primer 1245에 의한 IR PCR 분석에 의해 9가지형, primer 1246에 의해서는 7가지형으로, 그리고 두 primer를 조합할 경우 14가지형으로 구분되었다(Table 2).

## 2. C1 fingerprinting

*C. albicans* 균주에 대한 C1 fingerprinting을 실시한 바 23 kb와 2 kb 사이에 12-19개의 DNA band가 관찰되었고 5.4 kb, 3.3 kb 및 2.0 kb의 3개 band를 제외하고는 각 band는 균마다 매우 다양한 양상을 보였다(Fig. 2). 임의로 추출한 5주에 대해 균의 DNA 추출 및 Southern 교잡법 분석을 세 번씩 각기 시행하여 그 재현성을 검증하였는데, 각 band는 신호 강도에 상관없이 재현성을 보였



**Fig. 1.** Representative IR PCR profiles of *C. albicans* isolates from 10 patients (patients A to J), amplified with the primer 1245 (A) and 1246 (B). See Table 2 for detailed information on each isolate. Most of the isolates from each patient showed unique IR PCR pattern with primer 1245 except for four patients (type A1, patients A and B; type A2, patients C and E), but only 7 types were identified by IR PCR with primer 1246.



**Fig. 2.** Representative Southern blot hybridization patterns of *C. albicans* chromosomal DNAs cut by *EcoRI* hybridized by  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP labeled C1 probe (C1 fingerprinting) for some selected *C. albicans* isolates from 10 patients (patients A to J). Most of the isolates from each patient showed unique C1 fingerprinting pattern. Thus, C1 fingerprinting appears to be more discriminating than IR PCR in typing *C. albicans* isolates.

다. Fig. 2는 환자 A-J번까지의 10명에서 분리된 14주의 C1 fingerprinting 양상으로, 각 균주는 환자별로 서로 다른 형으로 구분되었고, 서로 다른 환자에서 분리된 균주가 동일형을 나타낸 적은 없었다. 또 H 환자의 경우는 동일인에서 분리된 균주가 동일 유형이었으나 2명 환자(F와 J)의 두 균주는 각각 다른 형이었고, I 환자의 경우 혈액과 카테터에서 분리된 균주가 두 band만 차이를 나타내어 유사한 형으로 판정하였다. 전체적으로 총 40주의 *C. albicans*는 C1 fingerprinting법에 의해 16가지 서로 다른 형으로 구분되었고 2명에서 카테터 혹은 호흡기에서 분리된 균주가 혈액 분리 균주와 서로 유사한 형으로 구분되어 IR PCR법에 비해 변별력이 더 우수함을 알 수 있었다. 따라서 IR PCR법과 C1 fingerprinting의 두 방법을 조합하였을 때 총 16형으로 구분되어 C1 fingerprinting법을 단독으로 시행한 성적과 일치하였다. 전체적으로 14명에서 분리된 균주는 각기 환자마다 다른 형을 보였으며, 동일형의 균주가 서로 다른 사람에서 분리된 경우는 없었다.

### 3. 동일인의 혈액과 다른 검체에서 분리된 균주의 유형

Table 2는 14명의 환자의 혈액과 그 외 검체에서 분리된 29주에 대한 IR PCR 및 C1 fingerprinting 성적이다. 동일인의 혈액과 그 외 검체에서 분리된 균주는 10명(71%) 환자에서 두 가지 방법 모두에 의해 환자별로 동일한 형을 보였으며 한 명(환자 J)에서는 두 방법 모두에 의해 다른 유형으로 구분되었다. 그러나 3명(C, F 및 I)의 환자에서 분리된 균주는 IR PCR법에 의해서는 환자별로 모두 동일형이었으나, C1 fingerprinting법에 의해서는 2명(환자 C와 I)에서는 유사한 유형, 그리고, 1명(환자 F)에서는 다른 형으로 구분되었다. 따라서 두 가지 방법을 모두 조합하여 판정할 때 2명 환자를 제외한 12명에서 각 환자의 카테터, 노 혹은 호흡기에서 분리된 균주는 혈액에서 분리된 균주와 유사하거나 동일한 유형이었다.

두 가지 방법에 의한 성적을 조합하여 검체별로 각 환자의 혈액균주와 비교해 보았다. 7명에서는 혈관 카테터에서 균주가 분리되었는데, 5명에서는 각각 혈액분리 균주와 동일한 유형을 보였으나, 1명(환자 I)은 유사한 유형을 보였고, 또 다른 1명(환자 F)에서는 서로 다른 유형을

Table 2. Typing Results for *C. albicans* Isolates from Blood and Other Body Sites of 14 Patients

Patient code	Isolate No.	Source	Interval (days)*	IR PCR genotype		Southern C1 fingerprinting†
				Primer 1245	Primer 1246	
A	1	Blood	-4	A1	B1	C1
	2	Urine		A1	B1	C1
B	3	Blood	-4	A1	B2	C2
	4	Urine		A1	B2	C2
C	5	Blood	-3	A2	B3	C3a
	6	Respiratory		A2	B3	C3b
D	7	Blood	+3	A3	B3	C4
	8	Catheter		A3	B3	C4
E	9	Blood	+3	A2	B3	C5
	10	Catheter		A2	B3	C5
F	11	Blood	0	A4	B3	C6
	12	Catheter		A4	B3	C7
G	13	Blood	+5	A5	B4	C8
	14	Respiratory		A5	B4	C8
H	15	Blood	-8	A6	B5	C9
	16	Respiratory		A6	B5	C9
	17	Urine	-4	A6	B5	C9
I	18	Blood	+5	A7	B3	C10a
	19	Catheter		A7	B3	C10b
J	20	Blood	0	A1	B6	C11
	21	Respiratory		A1	B7	C12
K	22	Blood	-7	A8	B5	C13
	23	Urine		A8	B5	C13
L	24	Blood	0	A9	B7	C14
	25	Catheter		A9	B7	C14
M	26	Blood	+1	A2	B5	C15
	27	Catheter		A2	B5	C15
N	28	Blood	+2	A1	B3	C16
	39	Catheter		A1	B3	C16

\*The interval between the isolation of *C. albicans* from blood culture and other body sites in each patient, which is given as number of days before (-) or after (+) the first positive blood culture.

†The differences denoted a or b are insufficient to classify the isolate as different, sharing all of the bands except one or two bands.

보였다. 4명에서는 요에서 혈액배양 양성이 나타나기 4-7 일전에 균주가 분리되었는데, 이 4주는 모두 각 환자의 혈액에서 분리된 균주와 동일한 유형을 보였다. 4명 환자에서는 혈액배양 양성 전후로 호흡기 검체에서 균주가 분리되었는데, 2명(환자 G와 H)에서는 혈액 균주와 동일한 형이었던 반면, 한 명(환자 J)에서는 혈액 균주와는 다른 유형, 그리고 또 한 명(환자 C)에서는 유사한 유형이었다.

## 고 찰

*C. albicans*는 건강인에서도 흔히 발견되는 인체 상재 균이지만, 동시에 칸디다혈증과 같은 심각한 감염의 원인 균이 되기도 한다. 본 연구에서는 두 가지 DNA fingerprinting법을 이용하여 14명의 칸디다혈증 환자의 혈액과 기타 검체에서 연속 분리된 29주의 *C. albicans*를 대상으로 균 분류를 시도하고 균주간의 유전학적 상관성을 알아보았다.

본 연구에서는 먼저 *C. albicans*의 균의 분자역학적 형

별 분석에 있어서 IR PCR법과 C1 fingerprinting법의 유용성을 알아보았다. IR PCR법은 균의 염색체에 존재하는 반복적인 DNA 염기서열(repeat DNA sequences) 사이에 존재하는 다양한 길이의 segment를 증폭함으로써 *C. albicans*의 타이핑에 유용하다고 알려져 있다(6, 17). 즉, oligonucleotide primer가 반복적인 염기서열 부분의 5' 혹은 3' 끝에서 교잡되어 바깥 부분을 향하여 증폭함으로써 반복적인 염기서열 사이에 존재하는 internal spacer sequences를 증폭한다. IR PCR법의 분별력은 전체 염색체 DNA 분해법, 핵형 분석법 혹은 *C. albicans* 특이 probe를 이용한 Southern 교잡법과 비교할만하다고 알려져 있다(6, 17, 18). 본 연구에서는 IR PCR을 위한 primer로서 primer 1245와 1246 2가지를 선택하였는데, 이는 Bartie 등(6)이 보고한 4개의 primer (primer 1245, 1246과 1251 및 M13 primer)를 이용하여 예비 시험한 결과, 변별력과 재현성이 다른 2개 primer 보다 더 우수하다고 판단되었기 때문이었다. 본 연구에서 39주의 *C. albicans*를 IR PCR 분석한 결과, primer 1245에 의해 9가지형, primer 1246에 의해서는 7가지형, 두 primer를 조합할 경우 14가지형으로 구분된 반면, C1 fingerprinting 분석에 의해서는 16형으로 더 세분되어 IR PCR 분석은 *C. albicans* 균 분류에 있어 유용하긴 하지만 분별력에 있어 한계성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 IR PCR법은 다른 PCR법과 마찬가지로 특별한 염기서열을 알지 못해도 적용 가능하며 시행이 빠르고 용이하였고 probe와 Southern blotting을 사용하지 않아 경비와 시간 등을 절감할 수 있는 점까지 고려하면 *C. albicans* 균주의 역학적 분류에 있어 선별검사로 먼저 이용하는 것이 좋으리라 생각되었다.

*EcoRI* 등의 high-frequency-cleavage 제한효소를 이용한 분석(restriction enzyme analysis, 이하 REA)는 칸디다 균종의 분자역학적 연구에 처음 시도된 방법으로서 초기에 널리 사용되었다. 그러나, 표준 REA를 시행한 gel을 ethidium bromide로 염색하였을 때 모든 DNA 조각들이 염색되므로 band 수가 너무 많아 band 사이를 감별하기가 어려워지는 단점이 있다. Southern 교잡법은 이를 보완하기 위해 도입되었는데, 특이한 탐식자(probe)를 이용하여 판별에 필요한 최소한의 절편만 선택하여 검출하며 *C. albicans* 균주의 역학적 연구에 우수한 방법으로 알려져 있다. *C. albicans* 탐식자로는 Ca3 probe 및 C1 probe가 자주 이용되어 왔다(15, 16, 19), Ca3 probe는 전체 11 kb로서 7개의 *EcoRI* 절편으로 구성되는데, 이중 C 절편은 *SacI* 분해에 의해 다시 C1과 C2로 나뉘며, 이 중

C1 단편은 약 1 kb의 크기로서 이를 이용하여 fingerprinting을 시행했을 때 나타나는 *C. albicans* 균주의 매우 다양한 변화를 나타내게 하는 부분으로 증명된 바 있다(15, 16). 본 연구에서는 Ca3의 C1 단편을 대상으로 probe를 제작하여 Southern 교잡법을 시행하여 보았다. 14명에서 분리된 총 29주는 C1 fingerprinting법에 의해 16가지 형으로 구분되어 환자마다 서로 다른 균주로 구분되었다. 또 C1 fingerprinting법을 단독으로 시행한 성적은 IR PCR과 C1 fingerprinting의 두 방법의 결과를 조합한 성적과 일치하였다. 본 연구에서 IR PCR법은 사용이 용이한 반면, minor band에서 재현성이 없어 실제 판독에 있어 약간의 어려움이 있었다. 반면, C1 fingerprinting은 분해상이 보다 더 선명하여 판독이 용이하였고 재현성이 우수하였다. 따라서 *C. albicans*의 균주의 분석에 있어서 IR PCR 분석보다는 C1 fingerprinting 분석이 더 유용하며 가장 분별력이 좋은 방법으로 생각된다.

Pfaller 등(20)은 미국내 21개 병원 152명 환자의 혈액에서 분리된 다양한 칸디다 균주를 대상으로 핵형분석과 *SfiI* 제한효소 분석을 시행하였는데, 각 환자들은 자기 자신의 균주에 의해 감염이 되었다고 하였다. Voss 등(21)도 악성 혈액종양 환자에서 인체 각 부위와 혈액에서 분리된 균을 PFGE 분석을 시행하였는데, 특히 요와 혈관 카테터에서 분리된 균의 PFGE 양상이 혈액에서 분리된 균이 동일하였고, 따라서 이 부위에 정착된 균주들이 혈류 감염과 연관된다고 하였다. 현재 칸디다혈증의 발생 기전에 대해서 두 가지 주요 경로가 설명되고 있는데, 하나는 소화기관내에 정착된 균들이 손상된 장 점막을 통해 혈류로 나오는 경로이며, 또 하나는 혈관 카테터를 통해 혈류로 들어오는 경로이다(22, 23). 본 연구에서는 두 가지 DNA fingerprinting법을 이용하여 동일인의 혈액과 요, 카테터 혹은 호흡기 검체에서 분리된 균주가 대부분 동일하거나 유사한 유형임을 확인할 수 있었다. 즉, 본 연구에서 각 환자의 혈액에서 분리된 균주는 혈액배양 양성 전에 뇨(4명 중 4명) 혹은 호흡기(4명 중 3명)에서 분리된 균주와 유사하거나 동일한 유형으로서 뇨 혹은 호흡기에서 토착화된 균주가 혈류감염의 원인균이 될 수 있음을 시사하였다. 또한 카테터에 분리된 7주 중 6주가 혈류감염 균주와 동일 유형을 나타내어 혈관 카테터도 이들 혈류감염의 통로가 되었을 가능성을 확인할 수 있었다.

Marco 등(19)은 칸디다혈증 환자를 대상으로 동일 환자의 요, 호흡기 등에서 분리된 균주의 C1 fingerprinting 양상을 비교하였는데, 1/3의 환자에서 균주간에 한 두

band를 제외하고는 동일한 양상(microevolution)이 관찰되었고, 따라서 C1 fingerprinting은 동일 클론 세포에서 나타나는 microevolution을 증명하는데 유용하다고 하였다(15). Shin 등(24)은 카테터 관련 칸디다혈증 환자의 혈액과 각종 인체부위에서 분리된 균주를 PFGE와 C1 fingerprinting법으로 동시에 분석한 결과, 카테터 균주에서만 microevolution이 일어남이 관찰되어 microevolution을 통해 비병원성 *C. albicans* 균주가 숙주방어 기전을 극복하고 혈류감염을 유발할 수 있는 안정된 유전자형으로 전환될 가능성을 제시하였다. 본 성적에서는 12명 중 2명에서 각각 호흡기 검체와 카테터에서 분리된 균주를 동일인의 혈액에서 분리된 균주와 비교할 때 서로 한 두 band만이 다른 microevolution이 검출되었다. 이 균주들은 IR PCR법에 의해서는 동일 패턴을 보여, 균주의 microevolution은 C1 fingerprinting법에 의해서만 검출이 됨을 알 수 있었다. 본 연구에 사용한 C1단편은 *C. albicans*의 반복적인 염기 부분인 RPS의 한 부분을 포함하고 있는데, 이 RPS elements가 관여된 염색체 reorganization에 의해 microevolution이 일어난다고 설명되고 있다(16).

요약하면, 본 연구에서는 칸디다혈증 환자에서 분리된 *C. albicans* 균주를 대상으로 두 가지 DNA fingerprinting법을 이용하여 타이핑을 시도 해 보았는데, *C. albicans* 균주의 역학적 분석에 있어서 IR PCR 분석은 선별법으로 유용하나, C1 fingerprinting법이 분별력이 더 좋고 microevolution까지 검출할 수 있는 우수한 방법으로 생각되었다. 또 칸디다혈증 환자의 카테터, 요 혹은 호흡기 검체에서 분리되는 균주는 대부분 혈액에서 분리된 균주와 동일하거나 유사한 유형을 보여 동일 클론 균주임을 알 수 있었다.

## 요 약

**목 적 :** 최근 *Candida albicans*에 의한 감염의 분자역학을 이해하기 위해 다양한 균 형별 검사가 시도되고 있으나, 가장 적합한 방법은 아직 정립되어있지 않다. 본 연구는 칸디다혈증 환자의 임상검체에서 분리된 *C. albicans* 균주들을 대상으로 두 가지 DNA fingerprinting법을 이용하여 균 분류를 시도하고 그 성적을 비교하여 보았다.

**재료 및 방법 :** *C. albicans* 칸디다혈증으로 진단된 환자 14명의 각종 임상검체(혈액 14주, 카테터 7주, 요 4주 및 호흡기 4주)에서 분리된 *C. albicans* 29주를 대상으로 하였다. Interrepeat (IR) PCR을 이용한 분석에는 primer

1245 및 1246의 두 가지를 이용하였고, C1 fingerprinting법은 염색체 DNA를 *EcoRI*으로 분해한 후 Ca3의 C1 단편을 probe로 이용하여 Southern 교잡법으로 실시하였다.

**결 과 :** 14명에서 분리된 총 29주는 IR PCR를 이용한 분석 결과, primer 1245에 의해 9가지 형, primer 1246에 의해서는 7가지 형, 두 primer를 조합할 경우 13가지 형으로 구분된 반면, C1 fingerprinting법에 의해 16가지 형으로 구분되었다. 두 가지 방법의 결과를 조합할 때 29주는 총 16가지 형으로 구분되어 C1 fingerprinting법을 단독으로 시행한 성적과 일치하였다. 두 가지 방법 모두에 의해 10명의 혈액과 기타 검체에서 분리된 균주는 환자별로 동일한 유형으로 구분된 반면, 1명에서 분리된 균주는 서로 다른 유형이었다. 반면, 3명에서 분리된 균주는 환자별로 모두 동일한 IR PCR 유형을 보였으나, C1 fingerprinting법에 의해서는 다르거나(1명), 유사한(2명) 유형을 보였다. 두 가지 방법을 조합하여 판정할 때 각 환자의 혈액에서 분리된 균주는 대부분 카테터(7명중 6명), 뇨(4명 중 4명) 혹은 호흡기(4명 중 3명)에서 분리된 균주와 유사하거나 동일한 유형이었다.

**결 론 :** *C. albicans* 균주의 형별 분석에는 IR PCR법에 비해 C1 fingerprinting법이 분별력이 더 우수한 방법으로 생각되었으며, 칸디다혈증 환자의 카테터, 요 혹은 호흡기 검체에서 분리되는 균주는 대부분 혈액에서 분리된 균주와 동일하거나 유사한 유형을 보임을 알 수 있었다.

## 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R04-2002-000-00036-0) 지원으로 수행되었음.

## 참 고 문 헌

- 1) Beck-Sagué C, Jarvis WR: *Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. J Infect Dis* 167:1247-51, 1993
- 2) Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzowski H, Vartivarian S: *The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different Candida species. Clin Infect Dis* 24:1122-8, 1997
- 3) Pfaller MA: *Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs and modes of transmission. Clin Infect Dis* 22:S89-94, 1996
- 4) Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP: *Hospital-acquired candidemia. The attributable*



- mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med* 148:2642-5, 1988
- 5) 신종희, 임우현, 신동현, 서순팔, 양동욱: 임상검체와 의료진에서 분리된 *Candida Species*의 분석. *감염* 31: 481-6, 1999
  - 6) Bartie KL, Williams DW, Wilson MJ, Potts AJ, Lewis MA: PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplastic candidosis and other oral conditions. *J Clin Microbiol* 39:4066-75, 2001
  - 7) Sullivan DJ, Henman MC, Moran GP, O'Neill LC, Bennett DE, Shanley DB, Coleman DC: Molecular genetic approaches to identification, epidemiology and taxonomy of non-*albicans* *Candida* species. *J Med Microbiol* 44:399-408, 1996
  - 8) Pujol C, Joly S, Lockhart SR, Noel S, Tibayrenc M, Soll DR: Parity among the randomly amplified polymorphic DNA method, multilocus enzyme electrophoresis, and Southern blot hybridization with the moderately repetitive DNA probe *Ca3* for fingerprinting *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 35:2348-58, 1997
  - 9) Shin JH, Kook H, Shin DH, Hwang TJ, Kim M, Suh SP, Ryang DW: Nosocomial cluster of *Candida lipolytica* fungemia in pediatric patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19:344-9, 2000
  - 10) Robert F, Lebreton F, Bougnoux ME, Paugam A, Wassermann D, Schlotterer M, Tourte-Schaefer C, Dupouy-Camet J: Use of random amplified polymorphic DNA as a typing method for *Candida albicans* in epidemiological surveillance of a burn unit. *J Clin Microbiol* 33:2366-71, 1995
  - 11) Shin JH, Shin DH, Song JW, Kee SJ, Suh SP, Ryang DW: Electrophoretic karyotype analysis of sequential *Candida parapsilosis* isolates from patients with persistent or recurrent fungemia. *J Clin Microbiol* 39:1258-63, 2001
  - 12) Gottfredsson M, Cox GM, Perfect JR: Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. *Pathology* 30:405-18, 1998
  - 13) Warren NG, Hazen K: *Candida*, *cryptococcus* and other yeasts of medical importance. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. p 1185, Washington DC, American Society for Microbiology, 1999
  - 14) 신종희, 조 덕, 김수현, 변동익, Nolte FS, 양동욱: 혈액배양에서 CHROMagar *Candida*를 이용한 *Candida species*의 동정. *임상병리학회지* 17:128-36, 1997
  - 15) Lockhart SR, Fritch JJ, Meier AS, Schroppel K, Srikantha T, Galask R, Soll DR: Colonizing populations of *Candida albicans* are clonal in origin but undergo microevolution through *C1* fragment reorganization as demonstrated by DNA fingerprinting and *C1* sequencing. *J Clin Microbiol* 33: 1501-9, 1995
  - 16) Pujol C, Joly S, Nolan B, Srikantha T, Soll DR: Microevolutionary changes in *C. albicans* identified by complex *Ca3* fingerprinting probe involve insertion and deletions of the full-length repetitive sequence *RPS* at specific genomic sites. *Microbiology* 145:2635-46, 1999
  - 17) van Belkum A, Melchers W, de Pauw BE, Scherer S, Quint W, Meis JF: Genotypic characterisation of sequential *Candida albicans* isolates from fluconazole-treated neutropenic patients. *J Infect Dis* 169: 1062-70, 1994
  - 18) Diaz-Guerra TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, Rodriguez-Tudela JL: Comparison of four molecular typing methods for evaluating genetic diversity among *Candida albicans* isolates from human immunodeficiency virus-positive patients with oral candidiasis. *J Clin Microbiol* 35:856-61, 1997
  - 19) Marco F, Lockhart SR, Pfaller MA, Pujol C, Rangel-Frausto MS, Wiblin T, Blumberg HM, Edwards JE, Jarvis W, Saiman L, Patterson JE, Rinaldi MG, Wenzel RP, Soll DR: Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe *Ca3*. *J Clin Microbiol* 37:2817-28, 1999
  - 20) Pfaller MA, Rhine-Chalberg J, Barry AL, Rex JH: Strain variation and antifungal susceptibility among bloodstream isolates of *Candida* species from 21 different medical institutions. *Clin Infect Dis* 21: 1507-9, 1995
  - 21) Voss A, Hollis RJ, Pfaller MA, Wenzel RP, Doebbeling BN: Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. *J Clin Microbiol* 32:975-80, 1994
  - 22) Rex JH: Editorial response: catheters and candidemia. *Clin Infect Dis* 22:467-70, 1996
  - 23) Cole GT, Halawa AA, Anaissie EJ: The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 22:S73-88, 1996
  - 24) Shin JH, Park MR, Song JW, Shin DH, Jung SI, Cho D, Kee SJ, Shin MG, Suh SP, Ryang DW: Microevolution of *Candida albicans* strains during catheter-related candidemia. *J Clin Microbiol* 42: 4025-31, 2004