

Molecular Typing of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Korean Patients

So Hae Park¹, Sung-il Cho¹ and Soo Myung Hwang^{2*}

¹Department of Public Health, The Graduate School of Public Health, Seoul National University, Seoul; ²Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan, Korea

Cryptococcosis is generally caused by *Cryptococcus neoformans*, the opportunistic agent which has two species such as *C. neoformans* and *C. gattii*. Both *C. neoformans* and *C. gattii* species contain a number of genetically diverse subgroups that can be differentiated by various molecular typing methods. We conducted a molecular epidemiological analysis of 30 clinical isolates of the *C. neoformans* from cryptococcosis patients who had been hospitalized between 2008 and 2010 in medical centers located in Seoul and Busan in Korea. To determine the genetic diversity, 30 strains of *C. neoformans* were typed using PCR fingerprinting with the microsatellite specific primer of the phage M13 and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) of orotidine monophosphosphate pyrophosphorylase (*URA5*) gene. All isolates were identified as serotype A, mating type *MATa* and molecular type VNI. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles obtained by using two primers revealed a single pattern. Our study shows that 30 strains of clinical *C. neoformans* are genetically homogeneous, with all of the isolates were molecular type VN1, serotype A, mating type *MATa*.

Key Words: *Cryptococcus neoformans*, Molecular type, PCR-fingerprinting, *URA5*-RFLP, RAPD

서 론

*Cryptococcus neoformans*는 협막을 보유한 효모양 진균으로 사람과 동물의 폐, 중추신경계 및 전신에 감염을 일으키며 면역기능저하 환자에 흔히 감염되지만 선행질환이 없는 환자에서도 감염될 수 있다. 장기이식, 항암치료, 후천성면역결핍증(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 등으로 인하여 면역기능저하 환자가 증가하면서 *Cryptococcus*에 의한 기회감염 발생이 증가되고 있다 (1, 2).

Cryptococcosis의 주요 원인균인 *Cryptococcus species*는 *C. neoformans*와 *C. gattii* 2종으로 분류되며. 이들 균종의 다당체 협막 성분의 항원성과 생태학적 특성 차이에

의하여 *C. neoformans*는 변종 var. *grubii*(혈청형 A)와 var. *neoformans*(혈청형 D) 그리고 hybrid형 AD, *C. gattii*는 혈청형 B와 C형으로 나누어진다 (3, 4). 또한 분자유전학적 특성에 의하여 *C. neoformans*는 VNI-VNIV형, *C. gattii*는 VGI-VGIV형의 각각 4종류의 유전자형으로 분류된다 (4, 5). *C. neoformans* var. *grubii* 혈청형 A에는 유전자형 VNI 또는 VNII이 존재하며, 이 중에서 VNI 유전자형은 전세계적으로 널리 분포되어 있으며 특히 비둘기 배설물을 비롯하여 조류 분변에 오염된 토양 그리고 썩은 나무 등이 이 균종의 자연 서식처로 잘 알려져 있다 (6). 이에 비교하여 *C. gattii* 혈청형 B 또는 C형은 오세아니아 지역을 중심으로 열대와 아열대 지역에서만 제한적으로 분리되며 자연 서식처는 오스트레일리아 원산 *Eucalyptus* 나무로 알려져 있으며 (7), 일부 열대 지역을 제외하고

Received: May 2, 2013/ Revised: May 17, 2013/ Accepted: May 21, 2013

*Corresponding author: Soo Myung Hwang, Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea.

Phone: +82-51-510-0740, Fax: +82-51-510-0749, e-mail: smhwang@cup.ac.kr

©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/>).

AIDS 환자에서 *C. gattii*에 의한 감염증은 거의 없는 것으로 보고되었다 (8, 9). 그러나 최근 연구보고에 의하면 기 후에 따른 제한적 분리 균종인 *C. gattii*가 온대 지역인 캐나다 밴쿠버, 북아메리카 및 일부 아시아 지역에서 분리되고 있으며, 지역에 따른 유전자형의 특성이 보고됨으로써 역학적 연구가 활발히 진행되고 있다 (10~12). *Cryptococcus*의 인체감염은 자연환경에서 basidiospore를 흡입함으로써 감염되는 것으로 알려져 있으나 생태학적, 역학적 관련성은 여전히 의문으로 남아있다 (1).

*C. neoformans*는 heterothallic basidiomycetes로 두 종류의 mating type이 존재하며 mating type 관련 유전자 좌위에 기능이 다른 대립형질 alpha (*MATa*)와 a (*MATa*)에 의하여 조절된다. 일반적으로 환경이나 임상검체에서 분리되는 *C. neoformans*의 mating type은 대부분이 *MATa*이며, 드물게 *MATa/a*인 diploid 균주도 분리된다 (13, 14).

C. neoformans 균종에 관한 분자역학적인 연구방법으로는 M13 phage의 microsatellite 특이염기서열(M13 primer)과, (GACA)₄ 또는 (GTG)₅ 반복서열을 이용한 PCR fingerprint 분석법, orotidine monophosphate pyrophosphorylase (*URA5*) 유전자의 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 분석법, random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석법, amplified fragment length polymorphisms (AFLP), rDNA intergenic space regions (IGS) I과 II 분석, multi-locus sequence typing (MLST) 등이 이용되고 있으며, 이들 분석법에 의하여 8종류의 유전자형이 알려져 있다 (4, 5, 15). 우리나라에서는 *Cryptococcus* 균종의 분리율이 저조하며, 2008년 이후 이 균종에 관한 분자역학적 연구가 없는 실정이다.

본 연구에서는 2008년에서 2010년 사이에 서울과 부산 지역의 종합병원 임상검체에서 분리된 *C. neoformans* 균주를 사용하여 혈청형, mating type, M13 primer PCR-fingerprinting, *URA5*-RFLP 그리고 2종류의 random primer를 이용한 RAPD법에 의한 분자생물학적 특성을 분석하여 우리나라에서 분리되는 *C. neoformans* 균주와 다른 나라에서의 분리된 균주와 비교할 수 있는 분자역학적 기초 자료를 얻고자 실시하게 되었다.

재료 및 방법

실험균주

서울 및 부산 지역 종합병원 2곳에서 2008년에서 2010

년 사이 분리된 임상균주 총 30주를 사용하였다(Table 1). 여러 종류의 임상가검물에서 분리된 30균주는 각 병원 미생물검사실에서 *C. neoformans*로 동정된 균주로써, Sabouraud dextrose agar (SDA, BBL, Sparks, MD, USA)로 옮긴 다음 다시 재 배양한 후에 사용하였다. *C. neoformans*의 재 동정을 위하여 API 20C AUX system (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)을 이용한 당 동화 시험과 Christensen's urea broth (Difco, Detroit, MI, USA)를 이용한 urease 시험 양성인지를 확인하였고, 멜라닌 색소생성에 의한 갈색 집락을 확인하기 위하여 Staib's bird seed media (BSM)을 제조하여 사용하였다 (16). 실험에 사용된 *C. neoformans* 표준균주는 CBS 10085 (*C. neoformans* serotype A, VNI형), CBS 10084 (*C. neoformans* serotype A, VNII형), CBS10080 (*C. neoformans* serotype AD, VNIII형), CBS 10079 (*C. neoformans* serotype D, VNIV형), 4종류를 사용하였다.

혈청형과 변종확인 시험

C. neoformans 변종의 확인은 협막 다당체 성분의 항혈청을 이용한 혈청형 분석과 생화학적 반응 시험을 실시하여 결정하였다. 혈청형 분석은 *C. neoformans* 협막의 다당체 항원에 대한 항혈청을 이용한 slide agglutination test (Crypto Check Iatron RM 304-K kit; Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)를 실시하였다. 변종확인 생화학적 검사는 Kwon-Chung법 (17)에 따라 canavanine-glycine bromthymol blue (CGB)를 제조하여 사용하였다. CGB 배지에 함유된 glycine을 탄소원으로 이용할 수 있는 glycine decarboxylase의 생성유무를 관찰하는 것으로, 최종 동정된 균주들을 CGB 배지에 접종하고 30℃에서 24~48시간 배양한 다음, CGB 배지의 색깔이 원래 배지의 색깔인 녹색에서 청색으로 색깔 변화를 보이면 양성, 색깔 변화가 없거나 균이 자라지 않으면 음성으로 판정하였으며, glycine decarboxylase 생성균주인 *C. gattii*는 양성반응, 이 효소를 생성하지 않는 *C. neoformans* var. *grubii* 또는 var. *neoformans*는 음성반응으로 변종을 확인하였다.

균체 DNA 분리

C. neoformans 균체 DNA 분리는 Yamamoto (18) 방법을 응용하여 실시하였다. Brain Heart Infusion broth (BHI, BBL™)에서 각 실험균주를 30℃, 48시간 배양한 후 원심 분리하여 약 100 µl pellet를 수집하여 100 mM Tris-HCl

Table 1. Characteristics of *C. neoformans* isolates used in this study

No.	Strain	Gender	Age	Source	Serotype	Mating type	Molecular type	Year	Location
1	sh98	M	58	Blood	A	α	VNI	2008	Seoul
2	sh99	F	75	Bronchial fluid	A	α	VNI	2008	Seoul
3	sh100	M	73	CSF ^a	A	α	VNI	2008	Seoul
4	sh107	M	48	Tissue	A	α	VNI	2008	Seoul
5	sh108	M	62	Abdominal fluid	A	α	VNI	2008	Seoul
6	sh109	M	35	CSF	A	α	VNI	2009	Seoul
7	sh110	M	77	Pleural fluid	A	α	VNI	2009	Seoul
8	sh111	F	70	Bronchial fluid	A	α	VNI	2009	Seoul
9	sh112	M	80	CSF	A	α	VNI	2009	Seoul
10	sh113	F	27	Blood	A	α	VNI	2009	Seoul
11	sh114	F	70	Blood	A	α	VNI	2009	Seoul
12	sh115	F	68	Abdominal fluid	A	α	VNI	2009	Seoul
13	sh116	F	51	Tissue	A	α	VNI	2009	Seoul
14	sh117	M	57	Blood	A	α	VNI	2009	Seoul
15	sh119	F	60	Urine	A	α	VNI	2009	Seoul
16	sh120	F	68	Blood	A	α	VNI	2009	Seoul
17	sh121	F	67	Bronchial fluid	A	α	VNI	2010	Seoul
18	sh122	F	65	Blood	A	α	VNI	2010	Seoul
19	sh123	F	63	Tissue	A	α	VNI	2010	Seoul
20	sh124	F	61	Sputum	A	α	VNI	2010	Seoul
21	sh126	M	49	Blood	A	α	VNI	2010	Seoul
22	sh127	M	66	Blood	A	α	VNI	2010	Seoul
23	sh128	F	54	Ascitic fluid	A	α	VNI	2010	Seoul
24	sh79	F	74	CSF	A	α	VNI	2008	Seoul
25	sh102	F	68	Blood	A	α	VNI	2009	Seoul
26	sh103	M	70	CSF	A	α	VNI	2009	Seoul
27	sh104	M	78	Sputum	A	α	VNI	2009	Busan
28	sh105	F	54	Blood	A	α	VNI	2009	Busan
29	sh106	F	77	Blood	A	α	VNI	2009	Busan
30	sh118	M	55	Ascitic fluid	A	α	VNI	2009	Busan

^aCSF, cerebrospinal fluid

buffer (TE pH 8.0, 1 mM EDTA)로 두 번 세척하였다. 각 검체에 250 µl 100 mM TE (pH 9.0, 40 mM EDTA), 50 µl 10% sodium dodecyl sulfate와 200 µl benzyl chloride를 가하여 혼합한 후 50℃에서 30분 동안 가볍게 진탕하면서 방치한 다음 1,0000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층 액

을 분리하였다. 상층 액에 3 M sodium acetate 50 µl를 가한 후 0℃에서 10분간 방치한 후 250 µl isopropanol를 가하여 -70℃ 냉동실에서 1시간 방치하여 DNA 침전물을 얻었다. 침전된 DNA를 70% ethanol로 세척하여 건조한 후 40 µl 10 mM TE (pH 8.0)로 용해하여 사용하였다.

Mating type 분석

Mating type 분석은 Chaturvedi법 (14)에 따라 *C. neoformans* 혈청형 A의 mating type alpha (a)와 a형의 특이 primer (Table 2)을 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit (Bioneer Co. Daejeon, Korea)를 사용하여, DNA 시료 (75 ng) 1 µl, MATa primer (10 pmol)를 각각 1 µl 넣고 증류수로 최종부피 20 µl를 맞추었다. PCR 반응조건은 95℃에서 3분간 초기 반응, 94℃ 1분, 57.5℃ 1분, 72℃ 1분의 과정으로 30회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 7분 연장으로 PCR을 종결하였다. 또한 MATa primer를 사용하여 동일한 조건으로 PCR 반응을 실시하였다. 증폭된 DNA 시료는 2% agarose gel을 통하여 전기영동을 실시하였고, 증폭산물의 크기에 따라 mating type, MATa (101 bp) 또는 MATa (117 bp)형을 확인하였다.

Molecular type 분석

Molecular type 분석은 M13 primer를 이용한 PCR fingerprint법과 URA5 유전자-RFLP 분석법으로 실시하였다. M13 phage의 microsatellite 특이염기서열의 primer을 이용한 PCR fingerprint 분석은 Meyer 등 (15)의 방법을 응용하여 다음과 같이 실시하였다. PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit (Bioneer Co.)를 사용하여, DNA 시료(25 ng) 1 µl, M13 primer (Table 2) 10 pmol를 1 µl 넣고, 증류수로 최종부피 20 µl를 맞추었다. PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 초기반응, 93℃ 20초, 50℃ 1분, 72℃ 20초의 과정으로 40회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 5분

연장으로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, 증폭산물의 크기를 표준균주의 결과와 비교 확인하였다.

URA5 유전자-RFLP 분석은 URA5 유전자의 특이 primer (Table 2)를 사용하여 실시하였다 (5). PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit (Bioneer Co.)를 사용하여, DNA 시료(75 ng) 1 µl, 두 종류의 primer (10 pmol)를 각각 1 µl씩 넣고 증류수로 최종부피 20 µl를 맞추었다. PCR 반응조건은 94℃에서 4분간 초기반응, 94℃ 45초, 61℃ 1분, 72℃ 2분의 과정으로 35회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 10분 연장으로 PCR을 종결하였다. URA5 유전자 PCR 산물을 1.5% agarose gel 상에서 확인한 후 gene clean kit (Bioneer Co.)를 사용하여 증폭된 600 bp DNA를 분리하였다. RFLP 분석은 600 bp DNA PCR 산물에 2종류의 제한효소 *Sau* 96I과 *Hha* I (BioLabs, Ipswich, MA, USA)를 각각 첨가하여 37℃에서 6시간 반응시킨 후 2.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, DNA 밴드 유형을 표준균주의 결과와 비교 확인하였다.

RAPD 분석

RAPD 분석은 2종의 random primer, OPH-02와 OPH-12 (Table 2)를 사용하여 실시하였다 (19). PCR 반응 혼합액은 AccuPower PCR premix kit (Bioneer Co.)를 사용하여, DNA 시료(75 ng) 1 µl, 한 종류의 primer (10 pmol)를 1 µl 넣고 증류수로 최종부피 20 µl를 맞추었다. PCR 반응조건은 94℃에서 4분간 초기반응, 92℃ 30초, 34℃ 1분, 72℃ 1분의 과정으로 35회 반복하였고, 마지막으로 72℃에서 5분 연장으로 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA 시료는

Table 2. List of primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Reference
M13	GAGGGTGGCGTTCT	(15)
MATa F	CTTCACTGCCATCTTCACCA	(14)
MATa R	GACACAAAGGGTCATGGCCA	(14)
MATa F	CGCCTTCACTGCTACCTTCT	(14)
MATa R	CGCCTTCACTGCTACCTTCT	(14)
URA5 F	ATGTCCTCCCAAGCCCTC GACTCCG	(5)
URA5 R	TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC	(5)
OPH-02	TCGGACGTGA	(19)
OPH-12	ACGCGCATGT	(19)

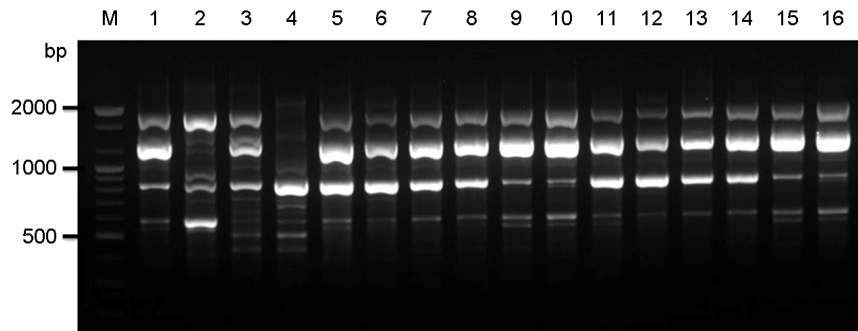


Figure 1. PCR-fingerprint profiles amplified with the primer M13. Lane #1~#4, *C. neoformans* molecular type reference strains VNI, VNII, VNIII, and VNIV; Lane #5~#16, selected clinical strains (sh98, sh99, sh100, sh107, sh108, sh109, sh110, sh111, sh104, sh105, sh106, and sh118); M, molecular marker (100 bp DNA ladder).

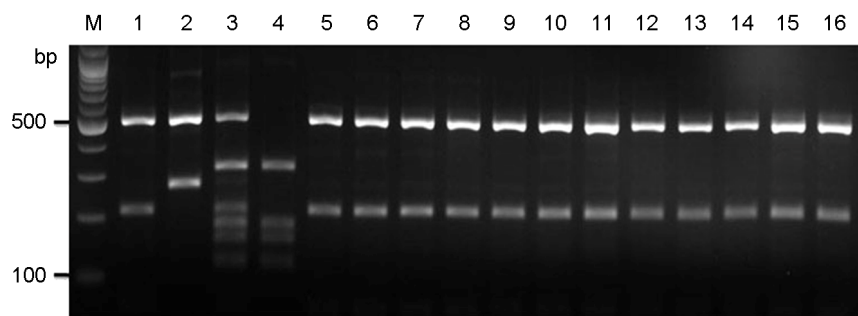


Figure 2. UR45-RFLP profiles identified after double digestion with the restriction enzymes HhaI and Sau 96I. Lane #1~#4, *C. neoformans* molecular type reference strains VNI, VNII, VNIII, and VNIV; Lane #5~#16, selected clinical strains (sh98, sh99, sh100, sh107, sh108, sh109, sh110, sh111, sh104, sh105, sh106, and sh118); M, molecular marker (100 bp DNA ladder).

2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여, 증폭산물의 크기를 비교 확인하였다.

결 과

Cryptococcus neoformans 혈청형 및 Mating type 확인

서울 및 부산 지역 2곳의 종합병원에서 2008년에서 2010년 동안 여러 종류의 가검물에서 분리 동정된 *C. neoformans* 30균주의 생화학적 성상을 재확인한 결과, 30주 모두 *C. neoformans*임을 확인하였다. 협막 다당체 항원 성분의 혈청형(serotype) 분석결과에서는 모두 혈청형 A이었으며, 변종 확인 생화학적 검사결과에서 CGB 배지에서 음성을 나타냄으로써 임상균주 *C. neoformans*는 모두 *C. neoformans* var. *grubii*(혈청형 A)로 확인되었으며 *C. gattii* 균주는 검출되지 않았다. *C. neoformans* 30주의

mating type을 *MATa*와 *MATα* 두 종류의 특이적 primer를 이용하여 PCR법을 실시한 결과 모두 101 bp가 검출되어 *MATα*임을 확인하였다.

Molecular type

M13 primer에 의한 PCR fingerprinting의 결과는 Fig. 1과 같다. *C. neoformans* 4종류의 유전자형 표준균주(VNI, VNII, VNIII 및 VNIV)를 이용하여 임상균주 30주와의 결과를 분석한 결과, 임상균주 30주 모두는 표준균주 VNI형과 동일한 패턴을 나타냄으로써 VNI 유전자형임을 확인하였다. 또한 UR45 유전자를 증폭하여 *Sau* 96I과 *Hha* I 제한효소를 이용하여 RFLP 분석한 결과(Fig. 2)에서 30주 모두 표준균주 VNI형과 동일한 밴드를 나타냄으로써 *C. neoformans* var. *grubii* VNI 유전자형임을 확인하였다.

RAPD 분석

Random primer 2종류, OPH-02와 OPH-12를 이용하여 RAPD 분석결과는 Fig. 3과 같다. Primer OPH-02를 이용한 RAPD profile을 분석결과(Fig. 3A), 임상균주 간의 동일한 패턴으로 각 균주의 차이가 없었으며, primer OPH-12를 이용한 결과에서도(Fig. 3B) 균주 간에 동일한 패턴의 결과를 나타내었다. RAPD 결과에서 임상균주는 모두 동일한 패턴을 나타냄으로써, 실험에 사용된 *C. neoformans*는 VNI 유전자형으로 subtype도 동일한 것임을 확인하였다.

고 찰

Cryptococcosis는 AIDS 환자를 비롯하여 면역기능이 현저히 떨어진 사람에게 기회감염을 일으키는 것으로 잘 알려져 있다 (1, 2). 최근에 *C. neoformans* 균종의 분류는 *C. neoformans*와 *C. gattii*로 나누어지며, 이들 균종의

유전적 다양성으로 *C. neoformans*에는 VNI-VNIV형, *C. gattii*에는 VGI-VGIV형의 각각 4종류의 유전자형이 존재한다 (20). 전 세계적으로 *C. neoformans*, VNI 유전자형, 혈청형 A 균종이 면역기능저하 환자에서 주로 질병을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다 (21). Meyer 등 (22)은 *C. neoformans*에 의한 감염증은 면역기능저하 환자에서 78.3%, 면역기능정상 환자에서 21.7%로 발병되는 것으로 보고하였고, *C. neoformans* 감염증 중에서 *C. neoformans* VNI형, 혈청형 A 균주가 면역기능저하 환자의 83.9%에서 발병되는 것으로 보고하였다. *C. neoformans*와 이들 변종들로 인해 야기되는 임상질환과 지역적인 분포 사이에는 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 전 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다 (10, 21). AIDS 환자에서 *Cryptococcus* 감염의 원인균은 주로 *C. neoformans* var. *grubii*, 혈청형 A으로 알려져 있으나, 브라질에서는 *C. neoformans* var. *grubii*와 *C. gattii* 모두 원인균으로 보고되었다 (23). 우리나라에서는 Hwang 등 (24)은 1993년에서 2005년 사이 분리된 임상균주 51주와 환경균주 7주의 혈

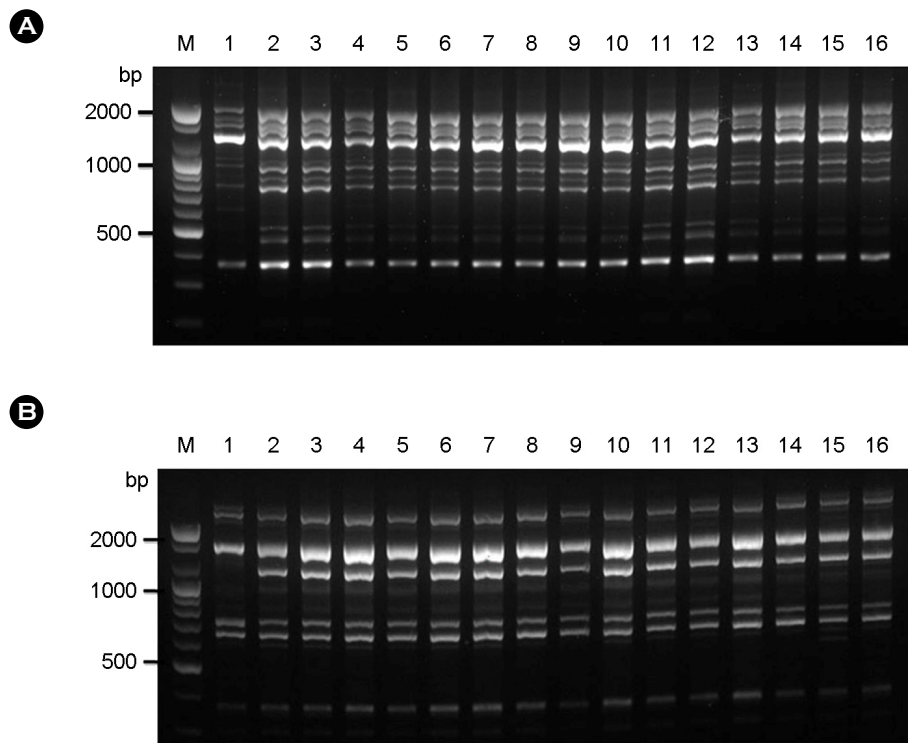


Figure 3. RAPD profiles amplified with the primer OPH-02 (A) and OPH-12 (B). Lane #1, *C. neoformans* molecular type reference strains VNI; Lane #2~#16, selected clinical strains (sh98, sh99, sh100, sh107, sh108, sh109, sh110, sh111, sh112, sh114, sh115, sh104, sh105, sh106, and sh118); M, molecular marker (100 bp DNA ladder).

형형을 분석한 결과 혈청형 A가 55주, B 2주, D 1주이었으며, 환경균주는 모두 혈청형 A로 보고한 바 있으며, 최근 Choe 등 (25)은 1990년에서 2008년까지 우리나라에서 분리된 78주의 *C. neoformans*의 특성을 분석한 결과 75주는 *C. neoformans* 혈청형 A, VNI형, 3주는 *C. gattii* 혈청형 B이었으며 그 유전자형은 VGII(2주)와 VGIII(1주)임을 보고하였다.

최근에 미생물의 분자유전학적 특성을 밝히기 위한 다양한 분석법이 소개됨으로써 *C. neoformans* 균종에 관한 분자유전학적 연구도 활발히 진행되고 있다. 지역적으로 이들 균종의 분자유전학적 특성을 살펴보면 *C. neoformans* 혈청형 A, VNI형이 아시아, 아프리카, 그리고 센트랄 아메리카 지역에서 차지하는 비율은 각각 77%, 72.6% 및 78%로서 주종을 이루고 있으며, 유럽, 오세아니아, 북아메리카 지역에서는 VNI형이 각각 45%, 31%, 및 41%로서 상대적으로 분리율이 낮다. 유럽 지역에서는 VNI형 대신에 VNIII와 VNIV형이 각각 26%와 20%를 차지하고 있어 *C. neoformans* 균종이 지역 간의 큰 차이가 있음이 보고되었다 (22). *C. gattii* 유전자형의 분리율을 살펴보면 아시아 지역은 *C. gattii* VGI형이 15%로 주종을 이루며, 아프리카 지역에서는 VGIV형이 6%, 센트랄 아메리카 지역에서는 VGII형이 11%로 우위를 차지하고 있다. 오세아니아 지역에서는 VGI형이 43%, 북아메리카는 VGII형이 26%로 지역적 특성을 잘 나타내고 있다 (22). 우리나라에서는 2012년 Hwang (26)의 연구보고에 의하면 1993년에서 2010년 동안 분리 동정된 임상균주 *C. neoformans* 125균주 중에서 *C. gattii* 분리와 분자생물학적 특성을 분석한 결과 1993년, 1999년 및 2006년에 각각 1균주씩 총 3균주가 확인되었으며, 혈청형은 모두 B형이었고 유전자형은 각각 VGI, VGII 및 VGIII형을 나타내었다. Mihara 등 (27)은 일본 나가사키 지역에서 1996년에서 2010년 사이에 분리된 35주 임상균주 *C. neoformans*의 유전자형 분석을 한 결과에서 32주는 *C. neoformans* VNI형, 3주는 VNII형으로 분리됨을 보고하였다. 또한 Chen 등 (4)은 1980년에서 2006년까지 분리된 *C. neoformans* 129균주의 분자유전학적 특성을 분석한 결과 120주는 모두 *C. neoformans* 혈청형 A, VNI형이었으며, 9주는 *C. gattii* 혈청형 B, VGI형으로 보고하였다. 본 연구에서는 Hwang (26)의 논문에 사용되지 않은 2008년에서 2010년 사이에 일부 종합병원에서 분리된 임상균주 30주를 이용하여 분자생물학적 특성을 살펴본 결과 모두 *C. neoformans* 혈청

형 A, VNI형으로 확인되었으며, *C. gattii*는 분리되지 않았다. 이와 같은 결과는 동아시아 지역인 일본과 중국에서 분리된 *C. neoformans* 균종의 유전자형 특성이 유사함을 확인하였으며 *C. gattii* 균종은 기후와 지역적 특성에 따라 우리나라를 비롯하여 온대 지역 아시아 지역에서 아직은 그 분리율이 매우 저조함을 확인할 수 있었다. 그러나 지금까지 아열대 및 열대 기후조건과 자연 서식처의 제한적 특성을 갖고 있던 *C. gattii* 균종이 북아메리카 온대 지역에서의 분리율 증가와 다양한 유전자형 출현은 전세계적으로 역학연구의 중요과제로 생각된다.

C. neoformans mating type은 MATa와 MATα 두 종류가 존재하며 이 균종의 생태학적 특성과 병원성 관련 연구에 중요하다. 임상균주 또는 환경균주에 있어서 대부분이 (~95%) MATα로 주종을 이루며, mating type에 관계없이 적절한 환경에서 균사를 만들거나 눈으로 볼 수 있는 basidiospore를 형성하는 것으로 알려져 있다. 또한 mating type 결정 유전자는 잠재적 병원성 인자로서의 영향을 나타내는 것으로서, 동물실험 결과 MATα 균주가 MATa 균주 보다 병원성이 더 강한 것으로 보고되었다 (13, 28). 기존의 연구와 본 실험의 결과에서 *C. neoformans* 임상균주는 모두 MATα형을 나타냄으로써 MATα *Cryptococcus* 균종이 우세함을 재확인하였다.

Cryptococcus 균종의 분자유전학적 분석방법으로 여러 가지 방법이 사용되고 있는데, 이중에서 M13 primer 및 (GACA)₄ 반복서열에 의한 PCR fingerprint법, random amplification polymorphic DNA (RAPD) 분석법, amplified fragment length polymorphism (AFLP), *URA5* 또는 phospholipase B (*PLB1*) 유전자 RFLP 분석법, multi-locus sequence typing (MLST) 등 널리 이용되고 있다 (29, 30). 이중에서 M13 phage 특이 primer PCR-fingerprint법과 *URA5* 유전자 RFLP 분석법은 *C. neoformans* 유전자형을 확인할 수 있는 방법으로 잘 알려져 있다. Random primer를 이용한 RAPD 분석법은 *C. neoformans*의 분자유전학 연구에 보다 손쉽게 응용할 수 있는 방법으로 유전자형의 subtype 결정, 변이 균종 출현, 임상균주와 환경균주 간의 상관성 등을 연구하는데 많은 도움이 되고 있다 (5, 19). 본 실험에서 2종류의 random primer, OPH-02와 OPH-12를 사용하여 RAPD 분석을 한 결과에서 임상균주 30주 모두 동일한 패턴으로, 균주 간의 차이가 없음을 확인하였다. Hwang (19)은 2000년에서 2005년 사이 부산 지역에서 분리된 임상균주 7주와 환경균주 5주의 *C. neoformans*

은 모두 혈청형 A이었으나, RAPD 분석결과 두 종류의 다른 패턴이 확인되어 균종 간의 차이가 있음을 보고한 바 있다. Yamamoto 등 (18)은 나가사키 지역에서 분리된 *C. neoformans* 21주의 RAPD 분석결과에서 4종류의 RAPD 패턴이 존재하는 것을 보고하였다. RAPD 분석법은 변이 균종의 유전적 특성을 쉽게 발견할 수 있는 방법으로 그 이용가치가 높은 실험이며 random primer의 선별과 지속적인 반복실험의 결과는 다양한 변이 균종을 확인하는데 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

C. neoformans 균종은 면역기능저하 환자에서 주된 기회감염균이며 면역기능정상인에서도 감염을 일으키는 병원성 진균이다. 본 실험에 사용된 임상균주가 분리된 환자의 평균연령은 62.7세로 고령화에 따른 영향을 보여주고 있으며, 데이터는 제공하지 않았지만 기저질환이 존재한 경우가 80%로서, 기저질환과 *Cryptococcus* 감염의 상관성에 관한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 우리나라 종합병원 2곳에서 2008년에서 2010년 사이에 분리된 임상균주 30주는 일본 나가사키 지역 (27)과 중국 지역 (4)에서 일정기간 동안 분리된 균종의 분리율에 비하여 상대적으로 높은 분리율을 나타내고 있다. 그러므로 *Cryptococcus* 균종의 감염에 관한 다양한 연구가 이루어져야 될 것으로 생각되며 감염역학의 기초 자료를 얻기 위해서는 임상진단, 미생물의 분리 동정에 의한 균주 보관 및 역학연구에 관한 관리시스템이 전국적으로 이루어져서 지속적인 데이터 구축이 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Heiman J, Kozel TR, Kwon-Chung KJ, Perfect JR, Casadevall A. *Cryptococcus* from human pathogen to model yeast. Washington D. C. USA: ASM Press, 2011.
- 2) Matsumoto MT, Fusco-Almeida AM, Baeza LC, Melhem Mde S, Medes-Giannini MJ. Genotyping, serotyping and determination of mating-type of *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2007;49:41-7.
- 3) Liaw SJ, Wu HC, Hsueh PR. Microbiological characteristics of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* in Taiwan: serotypes, mating types, molecular types, virulence factors, and antifungal susceptibility. Clin Microbiol Infect 2010;16: 696-703.
- 4) Chen J, Varma A, Diaz MR, Litvintseva AP, Wollenberg KK, Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus neoformans* strains and infection in apparently immunocompetent patients, China. Emerg Infect Dis 2008;14:755-62.
- 5) Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerg Infect Dis 2003;9:189-95.
- 6) Bennett JE, Kwon-Chung KJ, Howard DH. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. Am J Epidemiol 1977;105:582-6.
- 7) Ellis DH, Pfeiffer TJ. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. J Clin Microbiol 1990;28:1642-4.
- 8) Kuroki M, Phichaichumpon C, Yasuoka A, Chiranairadul P, Chosa T, Sirinirund P, et al. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from an endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. Yeast 2004;21:809-12.
- 9) Pappalardo MC, Melhem MS. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2003;45:299-305.
- 10) Datta K, Bartlett KH, Marr KA. *Cryptococcus gattii*: emergence in western North America: exploitation of a novel ecological niche. Interdiscip Perspect Infect Dis 2009;2009:176532
- 11) Byrnes EJ 3rd, Li W, Ren P, Lewit Y, Voelz K, Fraser JA, et al. A diverse population of *Cryptococcus gattii* molecular type VGIII in southern Californian HIV/AIDS patients. PLoS Pathog 2011;7:e1002205.
- 12) Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. FEMS Yeast Res 2008;8:930-8.
- 13) Yan Z, Li X, Xu J. Geographic distribution of mating type alleles of *Cryptococcus neoformans* in four areas of the United States. J Clin Microbiol 2002;40:965-72.
- 14) Chaturvedi S, Rodeghier B, Fan J, McClelland CM, Wickes BL, Chaturvedi V. Direct PCR of *Cryptococcus neoformans* MATalpha and MATa pheromones to determine mating type, ploidy, and variety: a tool for epidemiological and molecular pathogenesis studies. J Clin Microbiol 2000;38:2007-9.
- 15) Meyer W, Marszewska K, Amirmostofian M, Igreja RP, Hardtke C, Methling K, et al. Molecular typing of global isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* by polymerase chain reaction fingerprinting and randomly amplified polymorphic DNA-a pilot study to standardize techniques on which to base a detailed epidemiological survey. Electrophoresis 1999;20:1790-9.

- 16) Staib F. The green colour effect (GCE) of the killer strain *Cryptococcus laurentii* CBS 139 on Staib agar. *Mycoses* 1999; 42:103-6.
- 17) Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved Diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotype B and C). *J Clin Microbiol* 1982;15:535-7.
- 18) Yamamoto Y, Kohno S, Koga H, Kakeya H, Tomono K, Kaku M, *et al.* Random amplified polymorphic DNA analysis of clinically and environmentally isolated *Cryptococcus neoformans* in Nagasaki. *J Clin Microbiol* 1995;33:3328-32.
- 19) Hwang SM. Molecular characterization of clinical and environmental strains of *Cryptococcus neoformans* isolated from Busan, Korea. *J Bacteriol Virol* 2010;40:91-8.
- 20) Kwon-Chung KJ, Varma A. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*? *FEMS Yeast Res* 2006;6:574-87.
- 21) Illnait-Zaragozi MT, Martínez-Machín GF, Fernández-Andreu CM, Boekhout T, Meis JF, Klaassen CH. Microsatellite typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* isolates from Cuba shows multiple genetic lineages. *PLoS One* 2010;5:e9124.
- 22) Meyer W, Trilles L. Genotyping of the *Cryptococcus neoformans*/*C.gattii* species complex. *Australian Biochemist* 2010;41:12-5.
- 23) Ohkusu M, Tagonan N, Takeo K, Kishida E, Ohkubo M, Aoki S, *et al.* Serotype, mating type and ploidy of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from patients in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:299-302.
- 24) Hwang SM, Oh KS, Lee KW. Serotype and enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Korea. *Korean J Microbiol* 2006;42:257-64.
- 25) Choi YH, Ngamskulrungron P, Varma A, Sionov E, Hwang SM, Carriconde F, *et al.* Prevalence of the VNlc genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea. *FEMS Yeast Res* 2010;10: 769-78.
- 26) Hwang SM. Molecular typing of clinical *Cryptococcus gattii* isolates in Korea. *J Bacteriol Virol* 2012;42:152-5.
- 27) Mihara T, Izumikawa K, Kakeya H, Ngamskulrungron P, Umeyama T, Takazono T, *et al.* Multilocus sequence typing of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV associated cryptococcosis in Nagasaki, Japan. *Med Mycol* 2013;51:252-60.
- 28) Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Distribution of α and α mating types of *Cryptococcus neoformans* among natural and clinical isolates. *Am J Epidemiol* 1978;108:337-40.
- 29) Diaz MR, Boekhout T, Kiesling T, Fell JW. Comparative analysis of the intergenic spacer regions and population structure of the species complex of the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* 2005;5:1129-40.
- 30) Brandt ME, Hutwagner LC, Kuykendall RJ, Pinner RW. Comparison of multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular subtyping of *Cryptococcus neoformans*. The Cryptococcal Disease Active Surveillance Group. *J Clin Microbiol* 1995;33:1890-5.