

한국의 임상과 자연환경에서 분리된 *Cryptococcus neoformans*의 혈청형과 효소생성능

황수명* · 오광석¹ · 이경원²

부산가톨릭대학교 보건과학대학 임상병리학과, ¹한국해양수산연수원 안전교육팀

²연세대학교 의과대학 진단검사의학과

한국의 임상검체와 자연환경에서 분리된 *Cryptococcus neoformans* 58주에 대한 혈청형과 세포외효소 생성능에 관한 생물학적 특성을 조사하였다. 환자로부터 분리된 임상균주 51주 중 48주는 혈청형 A (94.1%)였으며 2주는 혈청형 B (3.92%), 그리고 나머지 1주는 혈청형 D (1.96%)였다. 자연환경에서 분리된 7주는 비둘기 분변에서 분리된 것들이며 모두 혈청형 A였다. 모든 균주는 proteinase와 phospholipase를 생성하였고, 또한 API-ZYM system을 이용한 19종류의 효소생성능 시험에서는 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -glucosidase, 그리고 β -glucosidase를 생성하였으나, N-acetyl- β -glucosaminidase는 39주(67.2%)에서만 생성하였다. 혈청형 B로 동정된 2주와 혈청형 A로 동정된 균주 중 1주는 β -glucuronidase를 생성하였다. 본 연구에 사용된 총 21종류의 효소생성능시험을 기초로하여 생물형을 구분하였는데, 모두 4가지의 유형을 나타내었고, 또한 임상과 환경균주에서 혈청형과 생물형 특성간의 유의한 상관성을 나타내었다.

Key words □ API-ZYM, *Cryptococcus neoformans*, enzymatic profile, serotypes

*Cryptococcus neoformans*는 협막을 갖고 있는 효모양 진균으로 전 세계적으로 널리 분포하고 있으며, 호흡기를 통하여 폐, 중추신경계 및 전신에 침투하여 감염을 일으킨다(1). 특히 최근 들어서는 장기이식에 의한 면역억제제 사용의 증가, AIDS 등 면역기능저하환자 증가의 결과로 cryptococcus 감염증의 발생도 증가하는 추세에 있다(3, 13).

*C. neoformans*는 다당체협막 성분의 항원성 차이에 의하여 4 종류의 혈청형, A, B, C 및 D로 나누어지며, 또한 생물·화학적, 생태학적 특성 그리고 유전적 변이성 차이에 의하여 *C. neoformans* var. *neoformans* (혈청형 A와 D)와 *C. neoformans* var. *gattii* (혈청형 B와 C)라는 2 변종으로 알려져 있었는데(5, 17), 최근에는 유전적 특성 등의 연구결과에 의하여 기존의 *C. neoformans* var. *neoformans* (혈청형 A와 D)를 *C. neoformans* var. *grubii* (혈청형 A)와 *C. neoformans* var. *neoformans* (혈청형 D)로 분류되어 명명하고 있다(10).

C. neoformans var. *grubii* (혈청형 A)와 *C. neoformans* var. *neoformans* (혈청형 D)는 전 세계적으로 다양한 환경의 병원소에서 분리되는데, 특히 비둘기 분변 및 조류 분변에 오염된 토양, 그리고 썩은 나무 등에서 자주 분리된다(23, 29). 이에 반해 *C. neoformans* var. *gattii* (혈청형 B와 C)는 열대와 아열대 지역에서 제한적으로 분리되며, 병원소는 오스트레일리아 원산의 교

목인 *Eucalyptus* 나무라고 알려져 있다(9, 24). *Cryptococcus* 인체 감염증의 대부분은 혈청형 A로 보고되고 있으며, 지역적 특성에 따라 다소 차이를 나타내고 있으나(2, 12), 생태학적, 역학적 관련성은 여전히 의문으로 남아있다. *C. neoformans* 혈청형의 감별은 이러한 관련성을 연구하기 위한 한 방법으로 제시되고 있으며, 또한, 효소생성능 시험을 기초로 한 생물형의 감별은 *C. neoformans*의 병원성과 독성인자(virulence determinant)를 연구하는 중요한 자료는 물론 분자생물학적 결과와 함께 cryptococcus 감염증의 역학적 연구에 기초자료로 이용되고 있다(4).

전 세계적으로 *C. neoformans*에 관한 분자역학적인 연구가 활발하게 진행되고 있음에도 불구하고, 우리나라에서는 이 균종에 관한 연구는 몇몇의 의학적인 보고 예만이 있을 뿐, 생태학적, 역학적인 연구는 거의 없는 실정이다(8, 30). 본 연구에서는 1993년부터 10 여년 동안 임상검체에서 분리된 균주와 자연환경(특히, 비둘기 분변)에서 분리된 균주를 이용하여, 이들의 혈청형과 효소생성능을 이용한 생물형의 특성을 분석함으로써 한국에서 분리된 *C. neoformans*의 생태학적, 역학적 기초 자료로 활용하고자 본 연구를 실시하게 되었다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

전국 각 지역에 있는 병원에서 2000년 이전에 분리한 임상균주 20주(11)와 2001년 이후에 분리한 31주 그리고, 부산지역의

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-51-510-0563, Fax: 82-51-510-0568
E-mail: smhwang@cup.ac.kr

비둘기서식처를 비롯한 자연환경에서 1993년에 분리한 환경균주 2주(11)와 2002년에 분리한 환경균주 5주(22)를 포함한 총 58균주를 대상으로 하였다.

임상에서 분리된 51주(뇌척수액 38주, 혈액 8주, 농 2주, 객담 1주, 림프액 1주, 기관지액 1주)는 각 병원 미생물 검사실에서 *C. neoformans*로 동정된 균주로서, 목집염색에 의한 협막관찰, API 20C AUX System (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)을 이용한 당 동화시험과 Christensen's Urea Broth (Difco, USA)를 이용한 urease시험 양성, nitrate 환원시험 음성, 37°C 성장능 시험 양성인지를 재확인하였고, 선택배지 Esculin Based Media (EBM)와 Bird Seed Media (BSM)을 이용한 phenol oxidase 생성여부로 최종 동정하였다(7, 27).

환경균주는 비둘기 분변으로부터 Hwang (11)의 방법을 따라 분리하였는데, 분리방법은 약 2.0 g의 비둘기 분변에 10 ml의 멸균 식염수를 가하고, 용액이 균질해 질 수 있도록 20분간 진탕한 후 1500×g에서 5분간 원침하였다. 상층액 100 µL를 균일하게 EBM와 BSM에 접종하고, 30°C에서 2일~10일간 배양한 후에, 균주의 phenol oxidase 활성의 결과로 나타나는 멜라닌 색소생성, 즉 갈색 집락만을 취하여 Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco, USA)로 옮긴 다음 다시 재배양한 후에 임상분리균주와 동일한 방법을 거쳐 최종 동정하였다.

변종확인시험

C. neoformans 변종의 확인은 세 가지 생화학적 반응 시험을 통하여 결정하였는데, 첫 번째 시험은 Canavanine-glycine-bromthymol Blue (CGB)배지에서 glycine을 탄소원으로 이용할 수 있는 glycine decarboxylase의 생성유무에 성장능을 관찰하는 것으로, 최종 동정된 균주들을 CGB배지에 접종하고 30°C에서 24~48시간 배양한 다음, CGB배지의 색깔이 원래 배지의 색깔인 녹색에서 청색으로 색깔 변화를 보이면 양성으로 판정하였다(16).

두 번째 시험은 D-proline 동화시험으로, Carbon Base Agar (CBA, Difco, USA)에 분리된 균주를 접종하고, 유일한 질소원 중의 하나인 D-proline이 첨가된 디스크를 CBA 배지에 놓아 디스크 주위에만 접종한 균주가 자라면 양성으로 판정하였다(21).

세 번째 시험은 Kwon 등(18)의 EDTA를 이용한 urease 억제 시험법으로, 최종 동정된 균주들을 Yeast Extract-Glucose-Peptone Agar (YEPG)에 100 µM EDTA를 첨가한 배지인 YEPGE에 접종하고 30°C에서 48시간 배양한 후, 자란 집락을 멸균 증류수 2 mL에 spectrophotometer (Jasco Co., Ishiawa-cho, Japan)를 이용하여 흡광도(A_{600}) 0.8~1.0이 되도록 맞춘 다음(균주 수, 약 $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^8$ /mL), 진탕 혼합한 뒤 혼합액 1 mL를 취해 Rapid Urea Broth (RUH broth, Difco™, USA)를 2배 되도록 분주한 뒤 ice bath에서 적당 시간 방치하였다. 다시 이 RUH broth를 37°C shaking water bath에 넣고 매 시간 마다 자홍색(magenta red color)이 나타나면 음성, 그리고 황색(yellow color)이 나타나면 양성으로 판정하였다.

위 세 가지 시험 모두에 양성이면 *Cryptococcus neoformans*

var. *gattii*(혈청형 B와 C)로, 모두 음성이면 *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* 또는 var. *neoformans*(혈청형 A, 또는 D)로 변종을 확인하였다.

혈청형감별시험

혈청형의 감별은 협막성 다당체 항원을 확인하는 slide agglutination test (Crypto Check Iatron RM 304-K kit; Iatron Laboratories, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 분리 균주들은 30°C에서 Yeast Extract Malt Extract Agar (YMA, Difco, USA)에 배양하였고, 48시간 후에 McFarland scale pattern 2 (약 6×10^8 CFU/mL)에 맞춰 멸균식염수에 부유하였다. 각 seric factor (F1, F5, F6, F7, 그리고 F8) 한 방울씩을 agglutination glass slide에 먼저 떨어뜨리고, 각 seric factor 당 50 µL의 *C. neoformans* 부유액을 떨어뜨려 혼합하였다. 혼합액이 균질화 될 수 있도록 2분간 교반하면서 슬라이드에서 작은 응집이 생기는 것을 직접 관찰하여 다음과 같이 판정하였다 : 혈청형 A, F1와 F7에 응집; 혈청형 B, F1과 F5에 응집; 혈청형 C, F1과 F6에 응집; 혈청형 D, F1과 F8에 응집; 그리고 혈청형 AD, F1, F7, 그리고 F8에 응집.

효소생성능시험

첫 번째 효소생성능시험은 API-ZYM system (bioMerieux Vitex, Inc., France)을 이용하였는데, 이 방법은 반정량미량검출법으로써 효소의 활성을 연구하기 위해 개발된 제품으로 미량의 검체를 사용하여 총 19종류의 효소반응에 관하여 신속하게 알아 볼 수 있도록 만들어진 제품이다. API-ZYM strip에 균주 접종 및 결과 판정 방법은 제조사의 방법을 약간 변형하여 시행하였는데, 먼저 균액의 농도를 McFarland scale pattern 2 (약 6×10^8 CFU/mL)에 맞춘 다음 65 µL를 취해 각 cupule에 접종하고, 접종이 모두 끝난 panel은 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 다음 ZYM A 시약 1방울과 ZYM B 시약 1방울을 각 cupule에 떨어뜨리고 5분 동안 색깔 변화의 정도를 육안으로 관찰하여, 각 색깔 변화의 정도에 따라 0~4점까지의 점수를 부여하였다 : 음성 반응일 경우에는 0점, 1점은 중간 반응일 때, 반응이 최고로 강할 때는 4점을 부여하였고, 2~4점까지를 양성반응으로 보았다.

두 번째 효소생성능시험은 Aoki 등(1)의 방법을 이용하여 proteinase의 생성을 확인하였다. 확인방법은 0.1%(w/v) Bovine serum albumin (BSA)과 0.01%(w/v) Polypeptone (Pp)이 첨가된 Yeast carbon base (YCB, Difco™, USA) agar를 사용하여 proteinase의 활성을 측정하였는데, SDA 배지에서 30°C, 3일간 배양한 각 균주를 YCB-BSA-Pp agar에 바늘을 이용하여 소량 접종하고 다시 30°C에서 10일간 배양하였다. 배양이 끝난 YCB-BSA-Pp agar에 10% Trichloroacetic Acid (TCA)를 이용하여 2 시간 동안 고정하고, Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB)로 염색하여 집락 주위에 투명대가 형성되면 양성으로 판정하였다.

세 번째 효소생성능시험은 Polak(25)의 방법을 이용하여 phospholipase의 생성을 확인하였다. 확인방법은 Egg-yolk이 첨가된 Heart infusion agar에 균을 접종하고, 30°C에서 5일간 배양하

여 집락 주위에 침전대가 형성되면 양성으로 판정하였다.

통계분석

API-ZYM system을 이용하여 각 생물형의 패턴을 분류하였는데, 이 system의 경우 육안으로 판정한 score에 따라 시험결과가 작성되는 것인 만큼 각 생물형 패턴 분류의 보다 객관적인 신뢰성을 얻기 위하여 통계분석을 실시하였다. 통계분석은 유의수준을 $p \leq 0.05$ 로 하여 일원배치분산분석(ANOVA)을 실시하였는데, API-ZYM system의 시험결과로 나타난 19종류의 효소 반응에 관한 score의 평균값을 조건으로 하였으며, 각 생물형의 패턴을 변수로 하여 유의도를 검증하였다. 통계학적 분석은 '한글 SPSS (SPSS for Window ver 10.1, SPSS Datasolution Inc, Korea)'를 이용하였다.

결 과

균주분리

분리된 총 58균주에서, 임상에서 분리된 균주가 51주(87.9%), 환경에서 분리된 균주가 7주(12.1%)였다. 임상균주의 경우 뇌척수액에서 분리된 균주가 38주(65.5%)로 가장 많았으며 그 다음으로 혈액 8주(13.8%), 농 2주(3.4%) 순이었다. 부산지역 환경에서 분리된 7주는 모두 비둘기 분변으로부터 분리된 균주였다. 모든 균주는 phenol oxidase 양성으로 선택배지인 EBM과 BSM에서 모두 갈색의 집락을 형성하였다(Table 1).

변종의 확인

CGB, D-proline, Urease/EDTA 시험을 이용한 변종확인시험에서 1993년과 1999년 임상검체(뇌척수액)에서 분리된 2주(3.5%)가 *C. neoformans* var. *gattii*로 확인되었으며, 임상균주 49주(84.5%) 중 48주(82.8%)는 *C. neoformans* var. *grubii*로, 1주(1.6%)는 var. *neoformans*로 확인되었고, 환경에서 분리된 7주(12.0%)는 모두 *C. neoformans* var. *grubii*로 확인되었다(Table 2).

혈청형 감별

한국에서 분리된 *C. neoformans* 총 58주의 혈청형은 A형, B형, 그리고 D형의 순서로 나타났으며 C형은 나타나지 않았다. 혈청형 A형은 55주(94.9%)로 가장 많이 나타났는데, 이중 임상에서 분리된 균주는 48주(82.8%), 환경에서 분리된 균주는 7주(12.1%)이었다. 이어서 혈청형 B형로 나타난 균주는 2주(3.5%)였는데, *C. neoformans* var. *gattii*로 변종이 확인된 균주였으며, D형은 1주(1.6%)로 가장 작았다(Table 3).

효소생성능

API-ZYM system을 이용한 첫번째 효소생성능시험에서는 모든 균주들이 alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -glucosidase, β -glucosidase를 생성하였으며, β -glucuronidase는 3주(CNS 3, 18, 51)만이, N-acetyl- β -gluco-

saminidase는 41주(CNS 1, 8-11, 13-15, 18, 20-21, 23-24, 27-31, 33-39, 40-50, 53-54, 56-58)만이 생성하였다. 두 번째와 세 번째 효소생성능시험으로 실시한 proteinase와 phospholipase 시험에서는 모든 균주들이 양성을 보였다.

생물형의 구분

API-ZYM system, proteinase 및 phospholipase 시험 결과(activity)를 양성·중등도·음성만을 기준으로 하였을 때 총 4가지의 생물형의 패턴을 구분할 수 있었는데, 패턴 구분에 있어서 가장 핵심적인 효소는 API-ZYM system No. 2, 15, 18이었다. 분류한 생물형 패턴은 패턴 I (INN형)이 16주, 패턴 II (INP형)가 39주, 패턴 III (PIP형)이 1주, 그리고 패턴 IV (PPN형)가 2주였다. 생물형 패턴 분류의 경우 양성·중등도·음성에 관한 최종 결과만을 기준으로 한 분류이므로 이에 관한 분류의 신뢰성을 높이기 위하여, 각 패턴별 균주의 API-ZYM system 결과판독치(score)에 관한 평균수치를 기초로 생물형 패턴은 종속변수로, API-ZYM score는 독립변수로 하는 일원배치분산분석을 시행하였고, 이때 proteinase와 phospholipase는 통계분석에서 제외하였다. 통계분석 결과 각 생물형 패턴별로 API-ZYM system No. 6 ($p=0.001$), No. 11 ($p=0.000$), No. 12 ($p=0.0005$), 그리고 No. 15~18 ($p=0.000$)에서 각각 유의한 차이가 있음을 발견할 수 있었으며, 또한 패턴분류의 가장 핵심적이었던 3가지의 효소에서는 API-ZYM system No. 2를 제외한 2종류의 효소(API-ZYM system No. 15, 18)에서 유의한 차이가 있음을 발견할 수 있어 양성·중등도·음성을 기준 한 생물형 패턴분류는 신뢰할 수 있는 결과라는 것을 확인할 수 있었다(Table 4).

한국에서 분리된 *C. neoformans* 혈청형과 생물형의 분포

한국에서 분리된 *C. neoformans* 58주의 혈청형과 생물형의 분포 상황을 살펴보면, 생물형 I을 나타내는 균주는 총 16주(27.6%)이었으며, 이중 혈청형 A이면서 임상에서 분리된 균주는 10주(17.3%), 환경에서 분리된 균주는 5주(8.6%)이었고, 혈청형 D이면서 임상에서 분리된 균주는 1주(1.7%)이었다. 생물형 II를 나타내는 균주는 총 39주(67.2%)로 가장 많았는데, 이중 혈청형 A이면서 임상에서 분리된 균주는 37주(63.8%), 환경에서 분리된 균주는 2주(3.4%)였으며, 나머지 혈청형 B, C, D는 나타나지 않았다. 생물형 III을 나타내는 균주는 총 1주(1.7%)로 혈청형 A이면서 임상에서 분리된 균주였다. 생물형 IV를 나타내는 균주는 총 2주(3.5%)로 혈청형 B이면서 임상에서 분리된 균주였다(Table 5).

고 찰

*C. neoformans*는 환경의 병원소에서 흡입을 통하여 인간과 동물의 호흡계와 신경계에 질환을 일으키는 다당체 혐박을 갖고 있는 효모양 진균 중의 하나이다(19). 면역기능저하 환자에게서 기회적 진균증 감염으로 그 발생빈도가 문제시 되고 있다. *C. neoformans*와 그 변종들로 인해 야기되는 임상질환과 지역적인

Table 1. The sources of 58 *C. neoformans* isolates in Korea

Strain No.	Year of isolation	Type of isolate	Source of isolate	Geographic source of isolate	Remark
CNS01	1993	C	CSF	Seoul	
CNS02	1993	C	CSF	Seoul	
CNS03	1993	C	CSF	Busan	
CNS04	1993	C	CSF	Busan	
CNS05	1993	C	CSF	Busan	
CNS06	1993	E	Pigeon excreta	Busan	
CNS07	1993	E	Pigeon excreta	Busan	
CNS08	1996	C	CSF	Busan	
CNS09	1996	C	CSF	Busan	
CNS10	1996	C	CSF	Busan	
CNS11	1999	C	CSF	Busan	Isolates of Reference [11]
CNS12	1999	C	CSF	Busan	
CNS13	1997	C	CSF	Seoul	
CNS14	1997	C	CSF	Seoul	
CNS15	1997	C	CSF	Seoul	
CNS16	1997	C	Blood	Seoul	
CNS17	1997	C	CSF	Seoul	
CNS18	2000	C	CSF	Seoul	
CNS19	2000	C	CSF	Seoul	
CNS20	2000	C	CSF	Busan	
CNS21	2001	C	CSF	Busan	Current study Isolates
CNS22	2002	E	Pigeon excreta	Busan	
CNS23	2002	E	Pigeon excreta	Busan	
CNS24	2002	E	Pigeon excreta	Busan	Isolates of Reference [22]
CNS25	2002	E	Pigeon excreta	Busan	
CNS26	2002	E	Pigeon excreta	Busan	
CNS27	2002	C	Blood	Busan	
CNS28	2003	C	Sputum	Daegu	
CNS29	2003	C	CSF	Daegu	
CNS30	1997	C	Pus	Gangu	
CNS31	1998	C	Pus	Gangu	
CNS32	2002	C	CSF	Gangu	
CNS33	2002	C	Blood	Gangu	
CNS34	2003	C	Tracheal aspirate	Gangu	
CNS35	2003	C	Blood	Busan	
CNS36	2003	C	Blood	Daegu	
CNS37	2003	C	CSF	Daegu	
CNS38	2003	C	CSF	Busan	
CNS39	2003	C	CSF	Busan	
CNS40	2005	C	Blood	Busan	
CNS41	2005	C	CSF	Daegu	
CNS42	1995	C	CSF	Seoul	Current study Isolates
CNS43	1995	C	CSF	Seoul	
CNS44	1995	C	CSF	Seoul	
CNS45	1995	C	CSF	Seoul	
CNS46	1996	C	CSF	Seoul	
CNS47	1996	C	CSF	Seoul	
CNS48	1997	C	CSF	Seoul	
CNS49	1997	C	CSF	Seoul	
CNS50	1999	C	CSF	Seoul	
CNS51	1999	C	CSF	Seoul	
CNS52	1999	C	CSF	Seoul	
CNS53	1999	C	CSF	Seoul	
CNS54	2005	C	Blood	Seoul	
CNS55	2005	C	CSF	Seoul	
CNS56	2005	C	Lymph node	Seoul	
CNS57	2004	C	CSF	Busan	
CNS58	2003	C	Blood	Ulsan	

※ Abbreviation : C, clinical isolate ; E, environmental isolate ; CSF, cerebro spinal fluid

Table 2. Differential test results for the variety of *C. neoformans* isolates

Type of isolate	No.(%) of isolates	Variety differential test			Identification of varieties
		CGB	D-proline	Urease/EDTA ^a	
Clinical	48(82.8)	negative	negative	negative	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> ^b
	1(01.6)	negative	negative	negative	<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ^c
	2(03.5)	positive	positive	positive	<i>C. neoformans</i> var. <i>gattii</i>
Environmental	7(12.0)	negative	negative	negative	<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> ^b
Total	58(100)	-	-	-	-

^aInhibition of urease activity by EDTA, ^bIsolates were identified as serotype A, ^cIsolate was identified as serotype D

Table 3. Serotypes of 58 *C. neoformans* isolates in Korea

Type of isolate	Total No.(%) of isolates	No. (%) of isolates			
		Serotype A	Serotype B	Serotype C	Serotype D
Clinical	51(87.9)	48(82.8)	2(3.5)	-	1(1.6)
Environmental	7(12.1)	7(12.1)	-	-	-
Total	58(100)	55(94.9)	2(3.5)	-	1(1.6)

Table 4. Biotype pattern obtained from enzymatic profile assayed by the API-ZYM score mean value from 58 *C. neoformans* isolates in Korea

API-ZYM no.	API-ZYM score mean±SD & enzyme activity								p-value
	Score	Activity	Score	Activity	Score	Activity	Score	Activity	
No. 2	1.50±0.52	I	1.54±0.64	I	2.50±0.71	P	2.00±0.00	P	0.163
No. 3	2.79±0.70	P	2.92±0.74	P	3.00±0.00	P	4.00±0.00	P	0.294
No. 4	2.43±0.51	P	2.74±0.55	P	2.50±0.71	P	3.00±0.00	P	0.216
No. 5	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 6	2.86±0.66	P	2.82±0.64	P	2.00±2.83	P	4.00±0.00	P	0.001
No. 7	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 8	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 9	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 10	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 11	3.71±0.73	P	3.90±0.31	P	4.00±0.00	P	4.00±0.00	P	0.000
No. 12	2.36±0.74	P	2.54±0.60	P	2.00±0.00	P	2.50±0.71	P	0.005
No. 13	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 14	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 15	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	1.50±2.12	I	3.00±1.41	P	0.000
No. 16	3.29±0.83	P	3.51±0.56	P	3.50±0.71	P	3.00±1.41	P	0.000
No. 17	2.79±0.97	P	3.03±0.36	P	3.00±0.00	P	2.50±0.71	P	0.000
No. 18	0.00±0.00	N	2.90±0.88	P	3.00±1.41	P	0.00±0.00	N	0.000
No. 19	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
No. 20	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	0.00±0.00	N	-
PT	-	P	-	P	-	P	-	P	-
PL	-	P	-	P	-	P	-	P	-
Biotype pattern	Pattern I (INN type, n=16)		Pattern II (INP type, n=39)		Pattern III (PIP type, n=1)		Pattern IV (PPN type, n=2)		-

※ **Abbreviation :** API-ZYM score, 0 point (negative), 1 point (intermediated color change), 4 point (strong color change), 2-4 point (positive) ; SD, Standard deviation ; Activity, N (negative), P (positive), I (Intermediate) ; API-ZYM system No. 2 (alkaline phosphatase), No. 3 (esterase C4), No. 4 (esterase lipase C8), No. 5 (lipase C14), No. 6 (leucine arylamidase), No. 7 (valine arylamidase), No. 8 (cystine arylamidase), No. 9 (trypsin), No. 10 (Chymotrypsin), No. 11 (acid phosphatase), No. 12 (naphthol-AS-BI-phosphohydrolase), No. 13 (α-galactosidase), No. 14 (β-galactosidase), No. 15 (β-glucuronidase), No. 16 (α-glucosidase), No. 17 (β-glucosidase), No. 18 (N-acetyl-β-glucosaminidase), No. 19 (α-mannosidase), No. 20 (α-fucosidase) ; PT, proteinase ; PL, phospholipase ; n, No. of sample ; p value, level of significance by ANOVA (p<0.05) ; Bold letter, the kernel enzyme and enzyme activity of biotype patterns.

분포 사이에는 유의한 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있으며, 전 세계적으로 많은 연구가 진행되고 있다(3, 9).

C. neoformans 에 관한 선행연구를 살펴보면, 먼저 우리나라의

경우에 1986년 Kim 등(14)이 한국의 임상에서 분리된 10균주 모두가 *C. neoformans* 혈청형 A라고 보고한 바 있고, 일본의 경우 에 Ikeda 등(12)이 임상에서 분리된 62주 모두가 Kim의 결과

Table 5. Correlation between biotype and serotype in 58 *C. neoformans* isolates in Korea

Biotype pattern	Type of isolate	Serotype and isolates						Total no. (%)
		Serotype A		Serotype B		Serotype D		
		Strain No.	No. (%)	Strain No.	No. (%)	Strain No.	No. (%)	
I	C	CNS 01, 02, 05, 12, 19, 29, 31, 42, 52, 55	10 (17.3)	-	-	CNS 04	1 (1.7)	11 (19.0)
	E	CNS 06, 07, 22, 25, 26	5 (8.6)	-	-	-	-	5 (8.6)
II	C	CNS 08, 09, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 27, 28, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 53, 54, 56, 57, 58	37 (63.8)	-	-	-	-	37 (63.8)
	E	CNS 23, 24	2 (3.4)	-	-	-	-	2 (3.4)
III	C	CNS 18	1 (1.7)	-	-	-	-	1 (1.7)
	E	-	-	-	-	-	-	-
IV	C	-	-	CNS 03, 51	2 (3.5)	-	-	2 (3.5)
	E	-	-	-	-	-	-	-
Total	C	-	48 (82.8)	-	2 (3.5)	-	1 (1.7)	51 (87.9)
	E	-	7 (12.1)	-	-	-	-	7 (12.1)

※ Abbreviation : C, clinical isolate ; E, environmental isolate

와 같이 *C. neoformans* 혈청형 A라고 보고하였다. 본 연구에서는 임상에서 분리된 51주 중 48주(84.5%)가 *C. neoformans* var. *grubii* (혈청형 A) 로, 1주(1.6%)는 var. *neoformans* (혈청형 D) 로 분류되었고, 환경에서 분리된 7주는 모두 var. *grubii* (혈청형 A)로 나타나, var. *neoformans* 의 분류가 세분화되기 이전의 결과라는 점을 감안하더라도 약간 상이한 결과를 나타내었다. 한편, *C. neoformans* var. *gattii* (혈청형 B)로 동정된 2주의 경우에 1주는 이미 2002년도에 Hwang (11)이 보고한 바 있고, 다른 1주(CNS 51)의 경우에 간암환자에게서 분리된 것으로서, 이것은 Bennett 등(2)이 var. *gattii* 에 의한 감염은 남부 캘리포니아 지역을 제외하고는 드물며, Kuroki 등(15)이 태국과 베트남, 호주, 브라질 그리고 중부 아프리카 지역에서 출현빈도가 높다고 한 선행 연구결과를 비추어 볼 때 좀 더 전향적인 분자역학적인 연구가 필요할 것으로 사료되어 계속 연구 수행 중에 있다. 하지만, 2002년 이후 한국에서 *C. neoformans* var. *gattii* 를 분리해 내었다는 보고는 아직까지 없어 이 점에서 생태·역학적으로 중요한 의의를 가지는 결과라고는 볼 수 있겠다.

C. neoformans 혈청형 A는 세계 각지에서 우점종으로 분리되고 있으며, 혈청형 B의 경우에는 대만, 베트남, 호주, 브라질 그리고 아프리카 중부 등의 열대 또는 아열대 지방에서 분리율이 높다고 알려져 있고, 혈청형 D의 경우에 유럽이 다른 지역에 비해 더 많이 분리된다고 알려져 있다(2,9). 본 연구에서도 혈청형 A의 분리빈도는 총58주 중 55주(94.9%)로 상당히 높아 선행연구결과와 동일하였으며, 혈청형 B의 경우에 2주로 3.5%의 분리율을 보였다. 혈청형 D의 경우에 1주가 분리되어 1.6%의 분리율을

보였는데, 이 점 역시도 혈청형 B와 마찬가지로 분자역학적인 연구가 진행 중에 있다.

효소생성능시험은 균종의 감별과 여러 가지 독성인자들을 결정짓기에 용이한 방법이라고 알려져 있다. 19가지 효소 반응을 이용하는 API-ZYM system의 결과에 따라 총 4가지 패턴의 생물형으로 구분하였는데, API-ZYM system의 경우 정량적인 검출법이 아닌 반정량미량검출법이므로 본 연구에서는 생물형 구분의 유의성을 검증하기 위하여 통계학적인 분석을 실시하였다. 각 생물형 간에 7가지 효소(API-ZYM system No. 2, 3, 4, 6, 11, 12, 15, 16, 17, 18)반응에서 API-ZYM score의 평균치 간에 유의한 차이를 나타내었으며, Roberta 등(26)이 AIDS 환자에게서 분리한 20주와 비둘기 분변에서 분리한 21주를 이용한 시험에서 각각 15가지 및 14가지 효소에서 유의한 차이가 있다고 한 것과 비교되었다(Table 5).

C. neoformans 가 생성하는 proteinase, esterases, 그리고 lipase 등과 같은 효소 단백질들은 여타 병원체들과의 병독성과 관련이 깊기 때문에 중요하다. 최근 Chen 등(4)은 이 균종이 생성하는 extracellular phospholipase가 포유류의 세포막을 파괴함으로써 숙주의 조직 내 침투가 용이하게 만든다고 보고하였다. 또한, Muller와 Sethi (20)는 *C. neoformans*가 생성하는 proteinase가 숙주 조직에 침투하기 시작할 때 작용하는 독성 메커니즘을 보조하는 물질일 것이라고 추정 한 바 있다. 본 연구에서 분리한 모든 균주는 proteinase와 phospholipase를 생성하였으며, 이러한 결과는 병인론적 측면에서 매우 중요한 자료로 사용될 수 있으리라 사료된다.

*C. neoformans*는 면역기능저하 환자에게서 기회적 감염을 유발하는 주 원인균으로서, 특히 AIDS 환자의 경우 5-10%가 감염되어 생명을 위협하는 진균증을 유발한다고 알려져 있다(3, 28). 2006년 2월 13일, 우리나라 질병관리본부의 인터넷문서(http://dis.cdc.go.kr/prevalence/Prevalence_view.asp)에 따르면, 2005년 한 해 동안 680명의 에이즈 감염자가 새로이 발생했으며, 2004년(610명)에 비해 11.5%가 늘어났으며, 이는 1985~1994년까지 10년 동안 발생한 환자수 410명보다 더 많은 것으로 나타났다. 사정이 이러 하지만, 임상과 환경에서 분리된 *C. neoformans*의 역학적인 연구는 분리비율이 낮고 어렵다는 점 등의 이유로 몇몇 임상적인 보고 사례 이외에는 우리나라에서 분석된 예는 그리 많지 않은 것이 사실이다. 본 연구는 최근 10년 동안 특히 서울과 부산에서 분리된 *C. neoformans*의 가장 기본적인 혈청형과 생물형을 우선 살펴봄으로써 한국에서 분리된 *C. neoformans*의 생태·역학적인 연구에 일조할 것으로 기대한다. 또한 임상과 환경에서 분리된 *C. neoformans* 균주상호간의 분자역학적 연구를 지속적으로 진행함으로써, 예방지침과 효과적인 치료법의 디자인을 위한 합리적인 체제가 도입되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- Aoki, S., K.S. Ito, K. Nakamura, K. Ninomiya, and V. Vitto. 1994. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *J. Mycolopathol.* 128, 143-150.
- Benett, J.E., K.J. Kwon-Chung, and D.H. Howard. 1977. Epidemiologic differences among serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 105, 582-586.
- Casadevall, A., L. Freundlich, L. March, and M.D. Scharff. 1992. Extensive allelic variation in *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1080-1084.
- Chen, L.C., L.A. Pirofski, and S. Casadevall. 1997. Extracellular proteins of *Cryptococcus neoformans* and host antibody response. *Infect. Immun.* 65, 2599-2605.
- Cherniak, R. and J.B. Sundstrom. 1994. Polysaccharide antigens of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 62, 1507-1512.
- Chung, S.M., E.Y. Lee, C.K. Lee, D.W. Eom, B. Yoo, and H.B. Moon. 2004. A Case of *Cryptococcal tenosynovitis* in a patient with Wegener's granulomatosis. *J. Kor. Rheumatism Association* 11, 66-71.
- Edberg, S.C., S.J. Chaskes, E. Aiture-Werber, and J.M. Singer. 1980. Esculin-based medium for isolation and identification of *Cryptococcus neoformans*. *J. Clin. Microbiol.* 12, 332-335.
- Ellis, D.H., and T.J. Pfeiffer. 1990. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1642-1644.
- Franzpot, S.P., J.S. Hamdan, B.P. Currie, and A. Casadevall. 1997. Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* in Brazil and the United States: Evidence for both local genetic differences and a global clonal population structure. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2243-2251.
- Franzpot, S.P., I.F. Salkin, and A. Casadevall. 1999. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2243-2251.
- Hwang, S.M. 2002. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* strains Isolated in Korea. *J. Microbiol.* 40, 166-169.
- Ikeda, R., T. Shinoda, Y. Fukazawa, and L. Kaufman. 1982. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 16, 22-29.
- Ito-Kuwa, S., K. Nagamura, S. Aoki, K. Ninimiya, J. Kato, and V. Vidotto. 1994. Serotyping of *Cryptococcus neoformans* isolated from AIDS patients. *Shigaku (Odontology)*. 82, 360-364.
- Kim, S.J., S.O. Kim, S.H. Lee, Y.S. Chong, and J.S. Suk. 1986. A study on the mating types and serotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* and production of serodiagnostic antigen and antiserum for cryptococcosis. *Kor. J. Microbiol.* 21, 127-131.
- Kuroki, M., C. Phichaichumpon, A. Yasuoka, P. Chiranairadul, T. Chosa, P. Sirinirund, T. Miyazaki, H. Takeya, Y. Higashiyama, Y. Miyazaki, Y. Ishida, and S. Kohno. 2004. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* from endemic region of HIV-associated cryptococcosis in Thailand. *Yeast* 21, 809-812.
- Kwon-Chung, K.J., I. Polacheck, and J.E. Bennett. 1982. 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.* 15, 535-537.
- Kwon-Chung, K.J. and J.E. Bennett. 1984. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 120, 123-130.
- Kwon-Chung, K.J., B.L. Wickes, J.L. Booth, H.S. Vishniac, and J.E. Bennett. 1987. Urease inhibition by EDTA in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 55, 1751-1754.
- Lewis, J.L. and S. Rabinovich. 1972. The wide spectrum of cryptococcal infections. *Am. J. Med.* 53, 315-322.
- Muller, H.E. and K.K. Sethi. 1972. Proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans* against human plasma proteins. *Med. Microbiol. Immunol.* 158, 129-134.
- Nishikawa, M.M., O.D. Sant'anna, M.S. Lazera, and B. Wanke. 1996. Use of D-proline assimilation and CGB medium for screening Brazilian *Cryptococcus neoformans* isolates. *J. Med. Vet. Mycol.* 34, 365-366.
- Oh, K.S. and S.M. Hwang. 2005. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* from environmental sources in Busan. *Mycobiology* 33, 188-193.
- Pal, M. 1997. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* from avian excreta in Kathumandu, Nepal. *Rev. Iberoam. Micol.* 14, 181-183.
- Pfeiffer, T.J. and D.H. Ellis. 1992. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from Eucalyptus tereticornis. *J. Med. Vet. Mycol.* 30, 407-408.
- Polak. 1992. Virulence of *Candida albicans* mutants. *Mycoses.* 35, 9-16.
- Roberta, L., S. Buonomo, K. Nakamura, S. Aoki, and V. Vidotto. 1998. Enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* strains by using the API-ZYM system. *Rev. Iberoam. Micol.* 15, 136-140.
- Staib, F. 1999. The green colour effect (GCE) of the killer strain *Cryptococcus neoformans* CBS 139 on Staib agar. *Mycoses.* 42, 103-106.
- Vidotto, V., M. Melhim, S. Pukinskas, S. Aoki, C. Carrara, and A. Pugliese. 2005. Extracellular enzymatic activity and serotype of *Cryptococcus neoformans* strains isolated from AIDS patients in Brazil. *Rev. Iberoam. Micol.* 22, 29-33.
- Walter, J.E. and E.G. Coffee. 1968. Distribution and epidemiologic significance of the serotypes of *Cryptococcus neoformans*. *Am. J. Epidemiol.* 87, 167-172.

30. Won, D.I., K.W. Lee, H.S. Kim, and Y.S. Chong. 1998. Clinical Feature of Cryptococcosis Patients and Evaluation of the Diagnostic Tests. *K. J. Infect. Dis.* 30, 61-68.

(Received October 17, 2006/Accepted December 11, 2006)

ABSTRACT : Serotype and Enzymatic Profile of *Cryptococcus neoformans* Isolates from Clinical and Environmental Sources in Korea

Soo Myung Hwang*, Kwang Seok Oh¹, and Kyung Won Lee² (Department of Clinical Laboratory Science, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea. ¹Maritime Safety Team, Korea Institute of Maritime and Fisheries Technology, Busan. ²Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea)

Fifty eight *Cryptococcus neoformans* strains isolated from clinical and environmental sources in Korea were examined for their serotypes and extracellular enzyme activities. Among the 51 strains isolated from clinical sources, 48 strains were serotype A (94.1%), 2 strains were serotype B (3.92%), and 1 strain was serotype D (1.96%). All seven environmental strains isolated from pigeon excreta were identified as serotype A. All isolates of *C. neoformans* were positive for the production of extracellular proteinase and phospholipase. In the API-ZYM system, all fifty eight isolates produced alkaline phosphatase, esterase C4, esterase lipase C8, leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrazase, α -glucosidase and β -glucosidase. Thirty nine isolates (67.2%) of *C. neoformans* produced N-acetyl- β -glucosaminidase. Two isolates, serotype B, and only one serotype A produced β -glucuronidase. Analysis of enzymatic profiles to 21 enzymes revealed four biotypic patterns among the 58 strains. The enzymatic patterns of *C. neoformans* isolated from clinical and environmental sources represented a significant relationship with the serotypes.