



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.


저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 석사학위 논문

크립토크코스증의 임상 양상과  
국내 분리 균주의 항진균제 감수성  
분석

The logo of Ajou University is a large, faint watermark in the background. It is circular and contains the text '아주대학교' (Ajou University) in Korean and 'AJOU UNIVERSITY' in English. In the center, there is a stylized flame or leaf symbol, and the year '1973' is written below it.

아주대학교 대학원

의학과/의학전공

강은정

크립토크코스증의 임상 양상과  
국내 분리 균주의 항진균제 감수성  
분석

지도교수 최영화

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2013년 2월

아주대학교 대학원

의학과/의학전공

강은정

강은정의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 최영화 인

심사위원 이위교 인

심사위원 주인수 인

아주대학교 대학원

2013년 12월 14일

## 크립토코쿠스증의 임상 양상과 국내 분리 균주의 항진균제 감수성 분석

배경 : 크립토코쿠스증은 면역 저하자들의 주요 기회 감염증으로 *Cryptococcus neoformans*와 *Cryptococcus gattii*가 주요 원인균주이다. 분자역학연구를 통해 *C. neoformans*는 VNI, VNII, VNIII, VNIV, *C.gattii*는 VGI, VGII, VGIII, VGIV의 각각 4가지 아형이 있고 아형 별로 지역적 분포와 항진균제 감수성이 다르다고 알려져 있다. 이에 크립토코쿠스증의 임상 양상과 국내 크립토코쿠스균주의 항진균제 감수성에 대해 분석하였다.

대상 및 방법 : 아주대학교 병원에서 1995년부터 2011년 까지 17년 동안 크립토코쿠스증으로 진단된 43명의 환자를 대상으로 임상적 특성을 분석하였다. 항진균제 감수성 검사는 국내 7개 병원의 임상 검체에서 분리한 78개의 균주를 대상으로 하였다. 고전적인 CLSI microdilution test와 자동화기기인 Vitek-2 system을 이용하여 검사하였고 추가적으로 두 방법의 일치도를 평가하였다.

결과 : 본원에서 진단된 환자는 총 43명 이었고(2.68 cases/year) 남녀비는 약 1.7:1, 평균 발병 나이는 56세 였다. 전체 환자 중 HIV 감염자는 6.9%를 차지하고 그 외 다양한 면역저하의 요인이 있었으며 기저질환이 없던 자도 20.9% 있었다. 사망률은 전체 32.5%(14/42)였고, 수막염 33%(6/18), 균혈증을 동반한 폐렴은 75%(3/4)로 나타났다. Broth microdilution방법으로 항진균제 감수성 검사를 하였을 때 fluconazole, amphotericin B, voriconazole에서 MIC<sub>90</sub>과 MIC 범위는 각각 8 µg/ml(1-16 µg/ml), 0.5 µg/ml(0.06-0.5 µg/ml), 0.125 µg/ml(0.03-0.25 µg/ml)

이었다. Vitek 2 system 방법으로 시행 하였을 때 fluconazole, amphotericin B, flucytosine의 MIC<sub>90</sub>과 MIC 범위는 각각 2 µg/ml(1-8 µg/ml), 0.5 µg/ml(0.25-0.5 µg/ml), 1 µg/ml(1-32 µg/ml) 이었다. Fluconazole에 대한 vitek-2 system과 broth microdilution test의 essential agreement, categorical agreement가 각각 91.8%, 95.8% 였고 very major, major, minor discrepancy가 0%, 0%, 0.41% 로 나타났다. Amphotericin B를 검사하였을 때에는 불일치 항목이 없었다.

결론 : 크립토코쿠스가 원인이 되어 나타나는 질환은 수막염, 폐렴, 폐결절, 균혈증, 피부 감염, 뇌농양, 복막염 순으로 나타났다. 면역 저하자들이 다수이나 정상인에서도 발생하였고 사망률은 32.5%로 높았다. 기본적인 치료제인 fluconazole, amphotericin B, flucytosine, voriconazole에 대한 내성 균주의 빈도는 낮았다. Vitek-2 system은 microdilution test를 대체할 수 있는 신뢰할 만한 검사로 생각된다.

---

핵심어 : 크립토코쿠스증, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, 임상양상, 항진균제 감수성 검사, CLSI broth microdilution test, Vitek 2 system

## 차 례

국문요약.....	i
차례.....	iii
그림차례.....	iv
표 차례.....	v
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	3
A. 크립토크쿠스의 임상 양상 조사 .....	3
B. 항진균제 감수성 검사.....	3
1. 대상 균주.....	3
2. CLSI broth microdilution.....	4
3. 자동화기기를 이용한 감수성 검사, vitek 2 system.....	4
4. CLSI Broth microdilution test와 Vitek 2 system의 일치도 평가.....	5
C. 통계 분석.....	5
III. 결과.....	6
A. 임상적 특징.....	6
B. 항진균제 감수성 검사.....	9
1. CLSI Broth microdilution test .....	9
2. Vitek 2 system.....	12
3. CLSI Broth microdilution test와 Vitek 2 system의 일치도 .....	13
IV. 고찰.....	14
V. 결론.....	16
참고문헌.....	17
ABSTRACT.....	24

그림 차례

Fig. 1. Distribution of MICs for fluconazole, amphotericin B and voriconazole by CLSI broth microdilution test..... 11

Fig. 2. Distribution of MIC of flucytosine by Vitek-2..... 13





표 차례

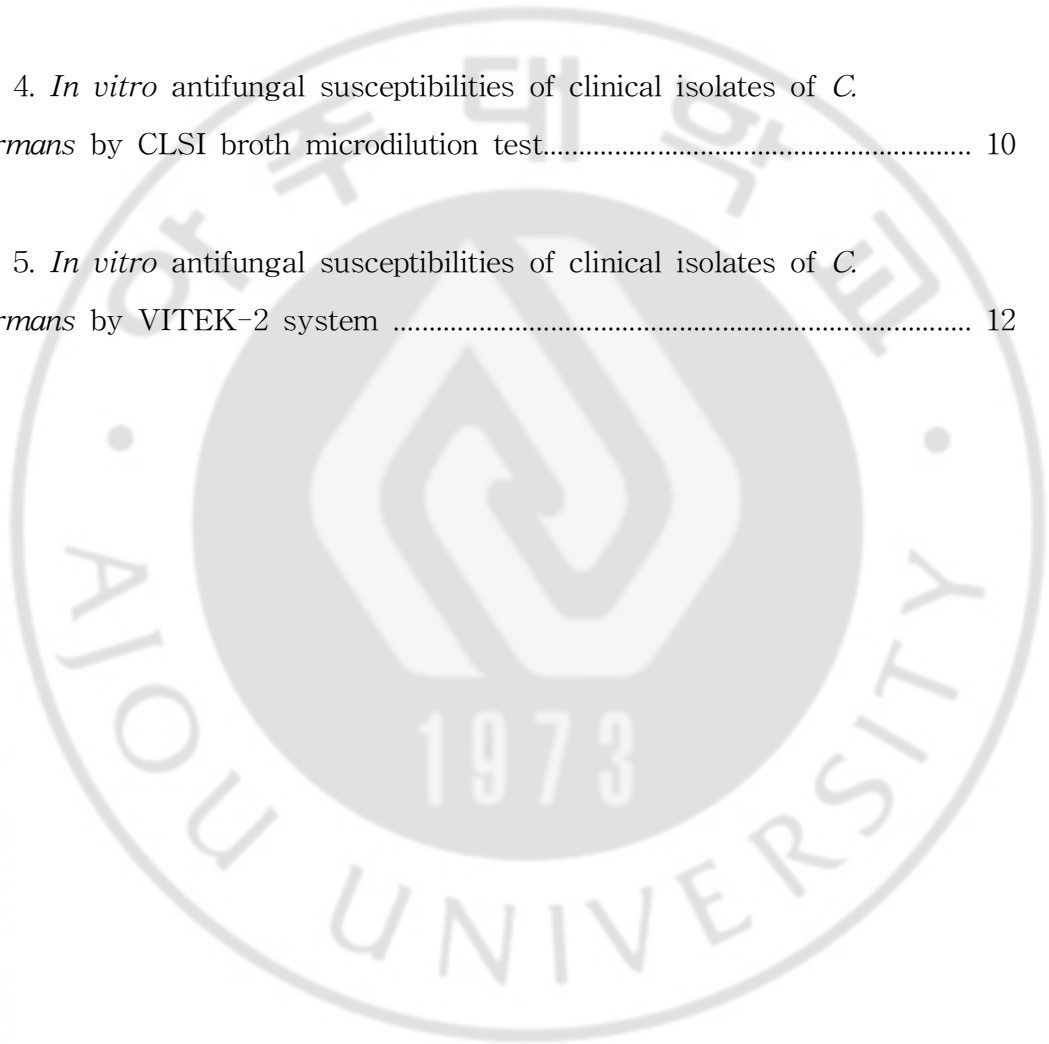
Table 1. Baseline characteristics of patients with cryptococcosis..... 7

Table 2. Distribution of underlying diseases among the patients with cryptococcosis..... 8

Table 3. Mortality of cryptococcosis according to the disease entity..... 8

Table 4. *In vitro* antifungal susceptibilities of clinical isolates of *C. neoformans* by CLSI broth microdilution test..... 10

Table 5. *In vitro* antifungal susceptibilities of clinical isolates of *C. neoformans* by VITEK-2 system ..... 12



## I. 서론

크립토코쿠스는 두꺼운 협막을 가진 효모양 진균으로 *Cryptococcus neoformans*와 *Cryptococcus gattii* 2가지 균종이 주로 인체 감염을 일으키는 것으로 알려져 있다. 감염경로는 호흡기를 통해 들어와서 과중성으로 호흡기, 피부, 전신 크립토코쿠스증과 크립토코쿠스 수막염을 일으킨다. 크립토코쿠스증은 1980년대 이후 HIV 감염자들이 많아지면서 이들에게서 심한 면역저하 상태를 시사하는 기회 감염증으로 나타났으며 1990년대에 azole계 항진균제와 HAART(Highly active anti-retroviral therapy)의 도입으로 HIV관련 크립토코쿠스증의 빈도가 감소하였다고 하나(Jarvis와 Harrison, 2007; Hajjeh 등, 1999; Chen 등, 2000; Kaplan 등, 2000; Mirza 등, 2003) 아직도 매년 전세계적으로 약 1백만 명의 크립토코쿠스 수막염이 발생한다(Park 등, 2009). 의료 선진국에서는 HIV관련 크립토코쿠스증의 발생 빈도는 감소하였지만, 크립토코쿠스 감염에 취약한 장기이식, 악성종양, 면역질환 등의 면역 저하 인구가 증가하면서 여전히 중요한 기회 감염증으로 보고되고 있다(Casadevall A와 Perfect J, 1998). 크립토코쿠스증은 주로 면역 저하자들의 기회감염증으로 나타나나 일부 정상 면역인에게서도 발병하며 *C. neoformans* 보다는 *C. gattii*에 의해 발병하는 것으로 알려져 있다.

크립토코쿠스증의 치료는 감염부위에 따라 조금씩 차이가 있지만 기본적으로 amphotericin B/Liposomal amphotericin B와 flucytosine으로 치료하고 이후 fluconazole로 장기간 유지하는 것이고 대체약제로 intraconazole, voriconazole, posaconazole 등이 있다. 향상된 의료 기술과 HAART를 포함한 치료에도 불구하고 크립토코쿠스 수막염의 사망율은 20-40%로 최근 수년간 감소 없이 높게 유지되고 있으며 더욱이 적절한 치료를 받지 못한 경우에는 2주 이내 사망률이 100%이다(Perfect, 2010; Dromer 등, 2007; Lortholary 등, 2006; Bicanic 등, 2007). 크립토코쿠스증은 적절한 치료에도 불구하고 단기 치료 시 재발률이 높고

치료 약제가 제한되어 있으며 치료 실패가 많다. 이에 국내 임상 분리 균주들을 대상으로 감수성 검사를 하여 국내 치료 지침에 기본 자료로 제시하고자 한다.

현재 *C. neoformans*는 VNI, VNII, VNIII, VNIV, *C. gattii*는 VGI, VGII, VGIII, VGIV의 각각 네 가지 아형이 알려져 있는데 (Boekout 등, 2001; Bovers 등, 2008; Meyer 등, 2009) 전 세계적으로 *C. neoformans* VNI type이 가장 많지만, 각 지역별로 아형 별 분포 비율이 다르게 나타난다. 아시아, 유럽, 아프리카, 라틴 아메리카는 *C. neoformans*의 VNI type이 가장 많고 그 외의 아형의 빈도는 지역마다 다르다. 아시아의 경우 VNI type이 거의 대부분이고 VGI type이 두 번째로 많고 나머지 type들은 소수이다. 오스트레일리아와 북미지역에서는 *C.gattii*가 *C.neoformans*보다 많은데, 전자는 VGI type이 후자는 VGII type이 더 많다.

최근 연구들에서는 각 아형별로 항진균제의 감수성이 다르다는 보고가 있다 (Khan 등, 2007; Trilles 등, 2011; Iqbal 등, 2010; Sionov 등, 2010). 현재까지의 국내 보고 자료에 의하면 국내 임상균주에 대한 분자 역학적 분석을 해본 바가 있고,(Choi 등, 2010) 본 연구에서는 이를 토대로 대상 균주에 대한 항진균제 감수성 검사를 시행 해보고자 하였다.

크립토크쿠스의 항진균제 감수성 검사(Antifungal susceptibility testing, AFST)의 기준이 되는 방법은 1997년 발표된 CLSI법과 AFST of the European Committee for antimicrobial susceptibility testing(EUCAST)가 있다. 하지만 이 두 가지 방법은 시간과 인력이 많이 소모되어 시행하기에 어려움이 있어(Borghgi 등, 2010) 실제 임상에서는 자동화기기를 도입하여 검사하고 있다. 하지만 자동화 기기인 vitek 2 system과 기준 검사의 일치도에 대한 정보는 많지 않아 본 연구에서 추가적으로 vitek 2 system과 microdilution test에 대한 일치도를 조사해 보았다.

## II. 재료 및 방법

### A. 크립토코쿠스의 임상 양상 조사

1995년부터 2011년 까지 아주대학교 병원에서 크립토코쿠스증을 진단받은 43명의 환자를 대상으로 하였다. 의무기록 및 임상 병리 검사실의 전산 기록을 후향적으로 분석하였다. 환자들은 한국 표준 질병코드에 따른 진단명이나 임상 병리 검사 결과 상 크립토코쿠스증으로 등록된 자들이었다. 치료 결과는 치료 종결 후 재발의 증거 없이 유지된 경우를 완치, 재발 및 치료 중 사망하거나 지속적인 악화로 가망 없이 퇴원하였던 경우를 부정적 결과, 치료 중 추적 관찰 소실된 경우를 미상으로 정의하였다.

### B. 항진균제 감수성 검사

#### 1. 대상 균주

1990년부터 2008년 까지 국내 7개 병원에서 크립토코쿠스증으로 진단된 환자의 임상 검체에서 분리한 총 78개의 균주를 대상으로 하였다. 임상 검체는 뇌척수액 43개, 혈액 28개, 소변 2개, 흉수, 복수, 림프절, 객담이 각각 1개씩이었다. 각각의 균주는 yeast peptone dextrose에서 계대 배양하여 20% glycerol가 담긴 cryotube에 넣어 영하 70°C에서 보관하였다. 실험 전 32°C에서 YPD에 두번 계대 배양하여 사용하였다. 균주들은 MATa였고 75주는 serotype A로 M13 fingerprinting typing으로 분석하였을 때 VNI이었고 3주는 serotype B로 2주는 VGIIb, 1주는 VGIII였다.

## 2. CLSI broth microdilution

Clinical Laboratory Standard Institute(CLSI) M27-A3 document를 참조하여 broth microdilution 항진균제 감수성 검사를 시행하였다. 모든 균주를 fluconazol(Diflucan<sup>®</sup>, Pfizer, 2mg/ml, 50ml), amphotericin B(Bristol\_Myers Squibb, 50mg), voriconazole(Vfend<sup>®</sup>, pfeizer, 200mg)에 대하여 두 차례씩 실험하였다. 각각의 약물의 농도는 fluconazole 1.00-64 µg/ml, amphotericin B 0.03-16 µg/ml, voriconazole 0.0-16 µg/ml이 되도록 연속 배수 희석하여 well에 넣었다. 최종 균농도는  $0.5-2.5 \times 10^3$  CFU/mL로 맞추었고, 96 well plate의 1번에서 11번 well에 100 µl씩 분주하였다. *C. parapsilosis* ATCC 22019를 quality control strain으로 사용하였다. 균이 접종된 96 well plate는 32°C에서 48시간 배양 후 두 명의 실험자가 각각 결과를 판독하였다. 두 실험자간의 판독 결과가 상이한 경우 그 결과 값에 대하여 함께 상의하여 결정하였다. 육안 판독과 분광광도계(595 nm)로 성장억제 정도를 판정하였다. Fluconazole 용액과 voriconazole은 50% 이상 성장이 억제된 well을, amphotericin B는 100% 성장이 억제된 well을 최소 억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)로 판정하였다.

## 3. 자동화기기를 이용한 감수성 검사, vitek 2 system

배양한 검체를 튜브에 넣고 vortex mixing한 후 2.0 McFaland로 표준 탁도를 맞춰 vitek 2 system의 사용 방법에 따라 감수성 검사를 진행하였다. Vitek 2 system에서 사용되는 항진균제 카드에는 amphotericin B가 1-32 µg/ml, fluconazole이 1-16 µg/ml, flucytocine이 4-64 µg/ml의 농도로 연속배수 희석되어있다. Voriconazole은 *C. neoformans*에 대한 vitek 2 system의 breakpoint가 확립되어 있지 않아서 검사하지 않았다(Borghgi 등, 2010).

#### 4. Broth microdilution test와 Vitek 2 system의 일치도 평가

표준 검사 방법과 새로운 검사 방법이 얼마나 일치하는 지를 통해 새로운 검사 방법의 신뢰도를 평가할 수 있다. Fluconazole과 amphotericin B의 vitek 2 system의 MIC 값과 microdilution test의 MIC 값을 비교하여 일치도를 분석하였다. Essential agreement (EA)는 두 방법의 MIC값이 2배 연속 희석 농도 내에(two-fold dilutions) 있을 확률이고 categorical agreement(CA)는 검사 방법 각각의 breakpoint의 기준에 따라 감수성 결과를 읽었을 때 같은 범주에 속하는 확률이다. Major discrepancy는 표준 방법에서 감수성(S)으로 판정한 것을 새로운 검사에서 내성(R)으로 판정한 빈도로서 차이를 보였던 경우의 수를 표준 검사상 감수성을 보인 균주의 수로 나누어 계산한다. Very major discrepancy는 표준 방법에서 내성으로 읽은 것을 새로운 검사에서 감수성으로 판정한 경우이다. 표준 검사상 내성 혹은 감수성으로 판정한 것으로 새로운 검사에서 중등도 내성(I)으로 판정하거나 혹은 그 반대의 경우를 minor discrepancy로 정의한다.

#### C. 통계분석

Statistical Package for the Social Sciences software(SPSS, Chicago, IL, USA)를 사용하여 통계 분석을 하였고 P 값이 0.05 이하인 것을 통계학적으로 유의한 것으로 판단하였다

### III. 결과

#### A. 임상적 특징

아주대학교 병원에서 1995년부터 2010년까지 크립토크쿠스증으로 진단된 환자는 총 43명이었고(2.68 cases/year) 남녀비는 약 1.7:1, 평균 발병 나이는 56세이다(표 1). 전체 환자를 기저질환 별로 분류하였을 때, HIV 감염이 3명으로 6.9%를 차지했고 그 외의 기저 질환은 면역억제제 사용 11.6%(5/43), 악성종양 16.2%(7/43), 당뇨 13.9%(6/43), 간경화 13.9%(6/43)였다. 전체 환자의 23.9%(9/43)에서 기저질환이 없었고, 23.2%(10/43)에서 고혈압 등과 같은 비교적 면역력과의 관련성이 적은 기저 질환만 있었다. 기저질환이 없거나 면역 관련성이 적은 기저질환을 가진 환자군을 정상 면역(immune-competent)인으로 분류하여 면역 상태에 따른 크립토크쿠스증의 침범 부위는 표 2에 나타내었다. 크립토크쿠스 폐렴의 진단은 증상과 영상학적 검사에서 폐렴의 징후를 보이면서 객담, 혈액에서 양성 소견을 보이거나 조직진단이 나온 경우로 정의하였다. 병리학 적 진단이 없으나 진료 당시 임상주의 판단으로 진단하여 항진균제를 처방한 2례를 폐렴 진단에 포함하였다. 전체 사망률은 32.5%(14/43)였으며 질환별 사망률은 수막염 33%(6/18), 폐렴은 균혈증을 동반한 경우 75%(3/4), 동반하지 않은 경우 28.5% 이었다(표 3). 진단 당시 나이와 치료 결과는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. (긍정적 결과 군의 평균 나이; 52.8세, 부정적 결과 군의 평균 나이; 62.7세,  $p=0.105$ )

**Table 1. Baseline characteristics of patients with cryptococcosis**

<b>Baseline characteristics</b>	
Total cases(male:female)	43 cases (27:16)
Age(mean +/- SD, range) year	56.07 ± 17.817
Underlying disease- case(%)	
Malignancy	7 (16.2)
-Hematologic	3 (6.9)
-Solid	4 (9.3)
Diabetes mellitus	6 (13.9)
Liver cirrhosis	6 (13.9)
Immunosuppressant user	5 (11.6)
Autoimmune disease	4 (9.3)
Acquired immunodeficiency syndrome	3 (6.9)
Transplantation	1 (2.3)
Others	10 (23.2)
None	9 (20.9)

Transplantation :kidney

Others : Hypertension only 5, Hypertension+hypothyroidism 1, Hepatitis B virus carrier 1, Parkinson (69yr-old) 1, complete atrioventricular block, Chronic obstructive pulmonary disease 1



**Table 2. Distribution of clinical diagnosis among the patients according to their immune status**

Clinical Diagnosis-cases	Immune-compromised (cryptococemia)	Immune-competent (cryptococemia)	Total(%)
Meningoencephalitis	11 (1)	7 (1)	18 (41.8)
Pneumonia	6 (3)	5 (1)	11 (25.5)
Solitary pulmonary nodule	2 (0)	3 (0)	5 (11.6)
Primary sepsis	2 (2)	1 (1)	3 (6.9)
Skin infection	2 (0)	0	2 (4.6)
Peritonitis	1 (1)	0	1 (2.3)
Others	2 (0)	1 (0)	3 (6.9)
<b>Total</b>	<b>24 (7)</b>	<b>19 (3)</b>	<b>43</b>

others: brain cryptococcoma 2, nasal cryptococcoma 1

**Table 3. Clinical outcome of cryptococcosis according to the clinical diagnosis**

Disease	Positive result (%)	Negative result (%)	Unknown (%)	Total(%)
Meningoencephalitis	11 (61)	6 (33)	1(5.5)	18(41.8)
Pneumonia	6 (54)	5 (45)	0	11(25.5)
Pneumonia sepsis	1	3		4
Pneumonia only	5	2		7
Solitary pulmonary nodule	5 (100)	0	0	5 (11.6)
Primary sepsis	0	3 (100)	0	3 (6.9)
Skin infection	1 (50)	0	1 (50)	2 (4.6)
Peritonitis	0	0	1 (100)	1 (2.3)
Others	2 (66)	0	1 (33)	3 (6.9)
<b>Total (n=43)</b>	<b>25 (58.1)</b>	<b>14 (32.5)</b>	<b>4 (9.3)</b>	<b>43</b>

positive result : cure, negative result: death or relapse, unknown: follow up loss

## B. 항진균제 감수성 검사

### 1. CLSI Broth microdilution test

Broth microdilution법을 이용한 항진균제 감수성 검사 결과는 표 4에 MIC 분포는 그림 1에 나타내었다. Fluconazole의 MIC는 1-16  $\mu\text{g/ml}$ , amphotericin B는 0.06-0.5  $\mu\text{g/ml}$ , voriconazole은 0.03-0.25  $\mu\text{g/ml}$  였다. 모든 균주가 voriconazole과 amphotericin B에 감수성을 보였다. 78균주 중 *C. neoformans* 한 균주(VNIc), *C. gattii* 한 균주(VGIIb) 총 2주(2.5%)가 fluconazole에 대한 MIC 16  $\mu\text{g/ml}$ 으로 dose-dependent susceptible을 보였다. 전체 균주 중에서 *C. gattii*는 3주가 있었고 fluconazole에 대한 MIC 값은 각각 4, 8, 16  $\mu\text{g/ml}$ 였다. *C. gattii*와 *C. neoformans*의 fluconazole과 voriconazole에 대한 MIC 분포는 통계학적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(fluconazole,  $p=0.121$ ; voriconazole,  $p=0.285$ ). Quality control strain인 *C. parapsilosis* ATCC 22019의 MIC 값은 CLSI M27-A3의 기준에 부합하였다.

Table. 4. *In vitro* antifungal susceptibilities of clinical isolates of *C. neoformans* by CLSI broth microdilution test

Antifungal agent	Serotype	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )			Geometric mean	Number(%)	
		Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>		S	SDD
Fluconazole	<i>C. neoformans</i> , <i>serotype A</i>	1-16	4	8	4.59	74	1
	<i>C. gattii</i> , <i>serotype B</i>	4-16	8	16	8	2	1
	Total	1-16	4	8	4.69	76 (97.4)	2 (2.5)
	<hr/>						
Amphotericin-B	<i>C. neoformans</i> , <i>serotype A</i>	0.06-0.5	0.25	0.5	0.24	75	0
	<i>C. gattii</i> , <i>serotype B</i>	0.125	0.125	0.125	0.125	3	0
	Total	0.06-0.5	0.25	0.5	0.23	78 (100)	0
	<hr/>						
Voriconazole	<i>C. neoformans</i> , <i>serotype A</i>	0.03-0.25	0.06	0.125	0.07	75	0
	<i>C. gattii</i> , <i>serotype B</i>	0.06-0.125	0.125	0.06	0.125	3	0
	Total	0.03-0.25	0.06	0.125	0.07	78 (100)	0

*C. neoformans* serotype A = 75 isolates, *C. gattii* serotype B = 3 isolates, Total 78 isolates

MIC<sub>50</sub>; MIC of 50 percentile of total isolates, MIC<sub>90</sub>; MIC of 90 percentile of total isolates, S; susceptible, SDD; dose-dependent susceptible

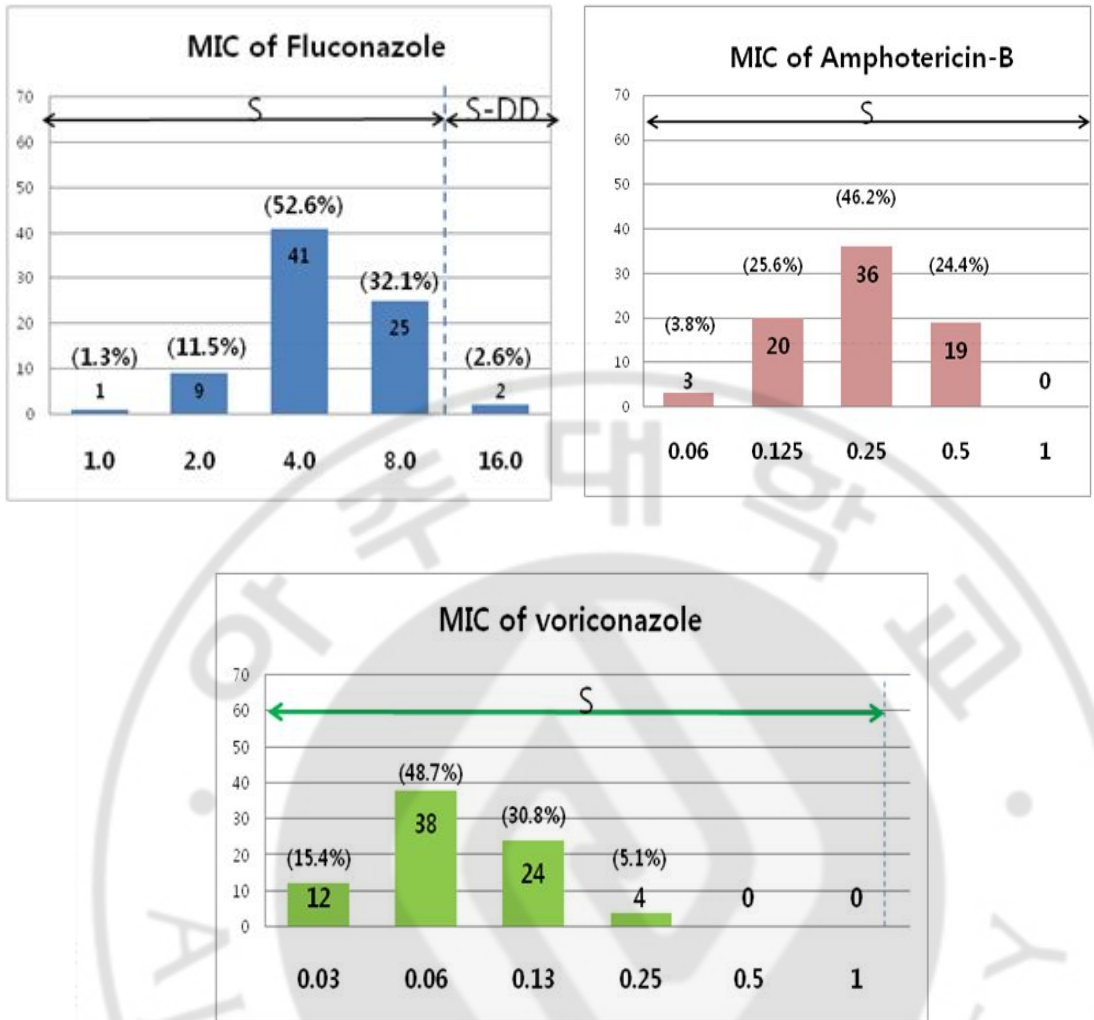


Fig.1 Distribution of MIC( $\mu\text{g/ml}$ ) for fluconazole, amphotericin B and voriconazole by CLSI broth microdilution test

2. 자동화기기를 이용한 감수성 검사, Vitek 2 system

Vitek 2 system으로 fluconazole, amphotericin-B, flucytosine에 대한 MIC값을 구하였으며 결과는 Table 5. 에 나타내었다. 총 검사 균주 수는 73주였다. MIC<sub>90</sub>은 fluconazole 2.0 µg/ml, amphotericin B 0.25 µg/ml, flucytosine ≤1 µg/ml 이었다. VGIIb type의 *C. gattii* 1주가 fluconazole에 dose-dependent susceptible(MIC = 8 µg/ml)을, VNIc type의 *C. neoformans* 1주가 flucytosine에 내성을 보였다(MIC =32 µg/ml) (그림 2).

Table 5. In vitro antifungal susceptibilities of clinical isolates of *C. neoformans* by Vitek 2

Antifungal agent	MIC(µg/ml)			Number(%)		
	Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	S	SDD-I	R
Fluconazole	≤1.0-8.0	2.0	2.0	72(98.6)	1(1.4)	0
Amphotericin-B	≤0.25-0.5	0.25	0.25	73(100)	0	0
Flucytosine	≤1.0-32	≤1.0	≤1.0	72(98.6)	0	1(1.4)

Total n= 73

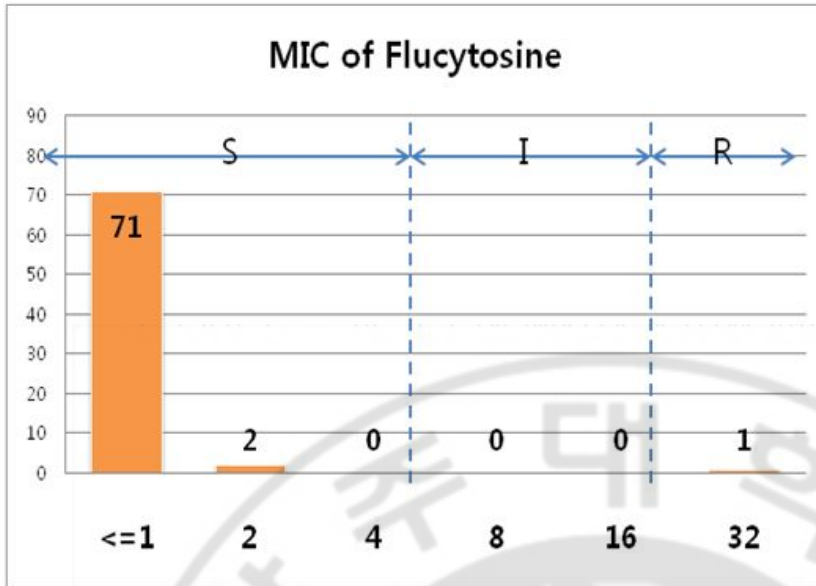


Fig 2. Distribution of MIC of flucytosine by Vitek 2

3. Vitek 2 system 과 CLSI broth microdilution법의 일치도

Vitek 2 system의 평가 항목별 성적은 fluconazole을 검사하였을 때 EA, CA가 각각 91.8%, 95.8% 였고 very major, major, minor discrepance가 0%, 0%, 0.41% 로 나타났다. Amphotericin B를 검사하였을 때에는 불일치 항목이 없었다.

#### IV. 고찰

크립토크쿠스증의 국외 자료를 보면 HIV관련 크립토크쿠스 수막염의 경우 매년 1백만 례가 발생한다. 이 중 62만 명이 3개월 내 사망하는데 사하라 이남지역에는 사망률이 70%에 육박하고 북미지역에는 9-20%로 지역별로 차이를 보였다(Desalermos 등, 2012). 1998년 원 등이 발표한 연구에서는 1983년부터 1995년까지 45명의 환자들이 단독 센터(3차 병원)에서 크립토크쿠스증을 진단 받았고(3.46 cases/year), 전체 사망률은 36%였으며 전체 크립토크쿠스증 중 96%가 크립토크쿠스 수막염이었다. 1999년 김신우 등이 발표한 크립토크쿠스 뇌수막염 연구에서는 치료 실패 47.6%, 연관 사망 50%이었다(김신우 등, 1999). 정수진 등은 일개 병원의 크립토크쿠스 수막염의 사망률을 18.2%, 재발된 경우는 13.1%로 보고한 바 있다(정수진 등, 2010). 본 연구에서는 수막염의 비율은 41.8%, 폐감염 25.5% 등으로 이전 보고에 비해 다른 부위 감염도 포함되어 좀 더 다양한 크립토크쿠스 감염증의 임상양상을 확인할 수 있었다. 크립토크쿠스증의 사망률도 전체 32.5%와 수막염 33%로 이전의 국내 연구와 유사하였다.

현재까지 발표된 국내 크립토크쿠스 균주의 항진균제 감수성 검사는 많지 않다. 이 등이(이경원 등, 2000) 22주의 *C. neoformans*로 실험하였을 때 fluconazole, flucytosine, amphotericin B의 MIC<sub>90</sub>과 MIC 범위는 8 µg/ml (0.5-16 µg/ml), 2 µg/ml(1-4 µg/ml), amphotericin B는 0.12 µg/ml(0.06-0.12 µg/ml) 이었다. 이 연구에서는 전체 균주의 4%가 fluconazole에 dose dependent susceptible을 보였고 내성 균주는 없었다. 다른 연구에서는 국내 35개의 *Cryptococcus* 균주의 CLSI disk diffusion 감수성 결과 상 fluconazole은 97.1%가 감수성 2.9%가 dose dependent susceptible이었고 voriconazole은 97.2%가 감수성 2.8%가 내성이었다(이미경 등, 2010).

본 연구에서는 fluconazole에 대한 내성 균주는 없었으며 2.5%에서 dose dependent susceptible를 보였다. Fluconazole에 대한 MIC값은 *C. neoformans*와

*C. gattii*가 통계학적인 차이를 보이지 않았는데, 아마도 *C. gattii*의 균주 수가 적었기 때문이라고 생각된다. Genotype VGII는 fluconazole에 대한 감수성이 다른 type에 비하여 좋지 않은 것으로 알려져 있는데(Trilles 등, 2011; Chong 등, 2010; Hagen 등, 2010), 본 실험에서 VGIIb type의 두주가 MIC 값 8, 16  $\mu\text{g/ml}$ 으로 전체 균주의 90 percentile 이상에 있는 것을 알 수 있었다.

Voriconazole은 가장 낮은 MIC 값을 보였고 *C. neoformans*와 *C. gattii* 모두에서 좋은 억제 능력을 보였다. Voriconazole에 내성을 보인 균주는 없었고 이러한 결과는 이전의 연구들과 일치하였다(Souza LK 등, 2009; van Duin 등, 2004; Thompson 등, 2009; Morgan 등, 2006). Voriconazole은 fluconazole과 구조적으로 유사한 triazole로, 경구 제형이 가능하고 bioavailability가 좋으며 부작용이 적은 약제이다. CSF 투과도에 대한 자료가 많지는 않으나, CSF 농도는 혈장 농도의 38-68% 정도이고, 뇌 실질 농도 1.2-1.9  $\mu\text{g/g}$ 으로 대다수의 진균에 대해 MIC<sub>90</sub>에 도달하는 것으로 알려져 있다(Kethireddy S와 Andes D, 2007; Johnson LB와 Kauffman CA, 2003)

Flucytosine에 대하여 *C. neoformans* serotype A 한 주가(1.4%) 내성을 보였는데 이는 flucytosine 치료 전 이 약물에 내성을 보인 균주가 1.2%, <2%라고 보고한 이전의 연구와 일치하는 결과이다(Chowdhary 등, 2011; Scholer 등, 1984).

2007년 5월에 발표된 미국 FDA(Food and Drug Administration) 기준에 따르면 상업화된 항균제 감수성 검사들은 EA와 CA가 모두 90% 이상이어야 하고 Very major discrepancy와 major discrepancy가 각각 1.5%, 3% 미만이면 새로운 검사법이 항진균제 감수성 검사 방법으로 적절하다고 판단하여 승인한다.(U.S FDA, 2007) Vitek 2 system은 EA, CA가 91.8%, 95.8% 그리고 very major, major, minor discrepancy가 0%, 0%, 0.41%으로 이 기준을 만족하였으므로 항진균제 감수성 검사의 실용적인 대안으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.



## V. 결론

본 연구에서는 일개 대학 병원에서 17년간 진단된 크립토코쿠스증 환자들에 대한 역학, 임상상, 치료 결과를 후향적으로 조사하였다. 크립토코쿠스증은 HIV 감염자 외에 다양한 면역 저하자에서 발병하고 정상 면역 환자에서도 발생할 수 있음을 확인하였다. 본 연구는 현재까지 국내에서 발표된 보고 중 가장 많은 수의 균주를 대상으로 감수성 검사를 진행하였고 분자역학정보를 기반으로 하여 *C. neoformans*뿐 아니라 적긴 하지만 *C. gattii*의 감수성 결과를 볼 수 있었다는 점에 의미가 있다. 국내 균주에서는 fluconazole, amphotericin B, voriconazole, flucytosine에 대한 내성이 드물었다. 또한 Vitek 2 system은 신뢰할 만한 대체 검사로 생각된다.

## 참고문헌

1. 김신우, 정숙인, 김연숙, 기현균, 김춘관, 김성민, 백경란, 이남용, 송재훈: 후천성면역결핍증이 아닌 환자에서 크립토코쿠스 수막염 25예의 임상상, 감염 31(6) 467-473, 1999
2. 이경원, 용동은, 신희봉, 김영아, 정윤섭: LY303366의 임상검체에서 분리된 *Candida spp.*, *Cryptococcus neoformans* 및 *Aspergillus spp.*에 대한 시험관내 항균력, 감염 32(4)274-279, 2000
3. 이미경, 유동근, 김명숙, 김미나, 이경원: Species Distribution and Antifungal Susceptibilities of Yeast Clinical Isolates from Three Hospitals in Korea, 2001 to 2007. 대한진단검사의학회지30:364-72, 2010
4. 정수진, 채운태, 진성준, 백지현, 진범식, 한상훈, 김창오, 최준용, 송영구, 김준명: 크립토코쿠스 수막염 : 일개 대학병원에서 최근 12년간의 경험. 감염과 화학요법 42(5):285-290, 2010
5. Bicanic T, Meintjes G, Wood R, Hayes M, Rebe K, Bekker LG, Harrison T: Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naive or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole. Clin Infect Dis 45:76-80, 2007
6. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, Dromer F, Meyer W: Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. Microbiology 147:891-907, 2001

7. Borghi E, Iatta R, Sciota R, Biassoni C, Cuna T, Montagna MT, Morace G: Comparative evaluation of the Vitek 2 yeast susceptibility test and CLSI broth microdilution reference method for testing antifungal susceptibility of invasive fungal isolates in Italy: the GISIA3 study. *J Clin Microbiol* 48(9):3153-7, 2010
8. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T: Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequencing. *Fungal Genet Biol*, 45: 400-421, 2008
9. Casadevall A, Perfect J. *Cryptococcus neoformans*. Washington DC:ASM Press, 1998
10. Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K, Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australian Cryptococcal Study Group. *Clin Infect Dis* 31:499-508, 2000
11. Choi YH, Ngamskulrungrroj P, Varma A, Sionov E, Hwang SM, Carriconde F, Meyer W, Litvintseva AP, Lee WG, Shin JH, Kim EC, Lee KW, Choi TY, Lee YS, Kwon-Chung KJ: Prevalence of the VN1c genotype of *Cryptococcus neoformans* in non-HIV-associated cryptococcosis in the Republic of Korea. *FEMS Yeast Res* 10(6): 769-78, 2010
12. Chong HS, Dagg R, Malik R, Chen S, Carter D: In vitro susceptibility

of the yeast pathogen *Cryptococcus* to fluconazole and other azoles varies with molecular genotype. *J Clin Microbiol* 48: 4115- 4120, 2010

13. Chowdhary A, Randhawa HS, Sundar G, Kathuria S, Prakash A, Khan Z, Sun S, Xu J: In vitro antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India, *J Med Microbiol* 60: 961-967, 2011

14. Desalermos A, Kourkoumpetis T, Mylonakis E: Update on the epidemiology and management of cryptococcal meningitis, *Expert Opin Pharmacother* 13(6):783-789, 2012

15. Dromer F, Mathoulin-Pelissier S, Launay O, French Cryptococcosis Study Group.: Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study. *PLoS Med* : 4(2):e21, 2010

16. Hagen F, Illnait-Zaragozi MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH, Boekhout T, Meis JF: *In vitro* antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12): 5139 - 5145, 2010

17. Hajjeh RA, Conn LA, Stephens DS, Baughman W, Hamill R, Graviss E, Pappas PG, Thomas C, Reingold A, Rothrock G, Hutwagner LC, Schuchat A, Brandt ME, Pinner RW: Cryptococcosis: population-based multistate active

surveillance and risk factors in human immunodeficiency virus-infected persons. Cryptococcal Active Surveillance Group. *J Infect Dis* 179:449-454, 1999

18. Iqbal N, DeBess EE, Wohrle R, Sun B, Nett RJ, Ahlquist AM, Chiller T, Lockhart SR, *Cryptococcus gattii* Public Health Working Group: Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. *J Clin Microbiol* 48 : 539-544, 2010

19. Jarvis JN, Harrison TS: HIV-associated cryptococcal meningitis, *AIDS* 21(16):2119-29, 2007

20. Johnson LB, Kauffman CA; Voriconazole: a new triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 1;36(5):630-7, 2003

21. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, Holmberg S, Jones JL: Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 30 (Suppl 1):S5-S14, 2000

22. Kethireddy S, Andes D; CNS pharmacokinetics of antifungal agents. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 3(4):573-81, 2007

23. Khan ZU, Randhawa HS, Kowshik T, Chowdhary A, Chandy R: Antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*

isolates from decayed wood of trunk hollows of *Ficus religiosa* and *Syzygiumcumini* trees in north-western India. *J Antimicrob Chemother* 60 : 312-316, 2007

24. Kwon-Chung KJ, Bennett JE: Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 120: 123-130, 1984

25. Souza LK, Souza Junior AH, Costa CR, Faganello J, Vainstein MH, Chagas AL, Souza AC, Silva MR: Molecular typing and antifungal susceptibility of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* species complex isolates in Goiania, Brazil. *Mycoses*. 53(1):62-7, 2010

26. Lortholary O, Poizat G, Zeller V, Neuville S, Boibieux A, Alvarez M, Dellamonica P, Botterel F, Dromer F, Chêne G: Long-term outcome of AIDS associated cryptococcosis in the era of combination antiretroviral therapy. *AIDS* 20:2183-2191, 2006

27. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, Fisher M, Gilgado F, Hagen F, Kaocharoen S, Litvintseva AP, Mitchell TG, Simwami SP, Trilles L, Viviani MA, Kwon-Chung J: Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 1-14, 2009

28. Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, Gardner T, Sattah M, de Leon GP, Baughman W, Hajjeh RA: The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active

surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992–2000. *Clin Infect Dis* 36:789–794, 2003

29. Morgan J, McCarthy KM, Gould S, Fan K, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Stamey K, Hajjeh RA, Brandt ME; Gauteng Cryptococcal Surveillance Initiative Group: *Cryptococcus gattii* infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002–2004. *Clin. Infect Dis* 43:1077–1080, 2006

30. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM: Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23:525–530, 2009

31. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, Harrison TS, Larsen RA, Lortholary O, Nguyen MH, Pappas PG, Powderly WG, Singh N, Sobel JD, Sorrell TC: Clinical Practice Guidelines for the Management of Cryptococcal Disease: 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.*1;50(3):291–322, 2010

32. Sionov E, Lee H, Chang YC, Kwon-Chung KJ: *Cryptococcus neoformans* overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes. *PLoS Pathog* 6(4): e1000848, 2010

33. Thompson GR 3rd, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF: Antifungal susceptibilities among different serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents*

*Chemother* 53 : 309 -311, 2009

34. Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazera M: Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol* 50(3):328-32, 2011

35. US FDA: Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Devices and Radiological Health Bacteriology Branch Division of Microbiology Devices Office of In Vitro Diagnostic Device (OIVD) Evaluation and Safety, 2007

36. van Duin D, Cleare W, Zaragoza O, Casadevall A, Nosanchuk JD: Effects of voriconazole on *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 2014-2020, 2004



## Analysis of clinical features of cryptococcosis and antifungal susceptibility of clinical isolates in Korea

Eun Jung Kang

Department of Medical Sciences  
Graduate School, Ajou University

(Supervised by Professor Young Hwa Choi)

**Background:** Cryptococcosis which is emerged as important opportunistic infection in immunosuppressed patient is caused by *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii*. *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* has four subtypes (VNI, VNII, VNIII, VNIV for *C. neoformans*, VGI, VGII, VGIII, VGIV for *C.gattii*). Each subtypes shows different geographic distributions and antifungal susceptibility. We analyzed clinical features of cryptococcosis and antifungal susceptibility of clinical isolates.

**Methods:** We analyzed retrospectively 43 cases of cryptococcosis diagnosed in Ajou University hospital from 1995 to 2011. For antifungal susceptibility data, 78 clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* was tested of each MIC via CLSI broth microdilution test and vitek 2 system. Additionally we investigated the reliability of vitek 2 system comparing to CLSI broth

microdilution test.

**Result:** Total 43 patients was diagnosed (2.68 cases/year) and male to female ratio was 1.7:1. Cryptococcosis occurred in various immunocompromised conditions and even immunocompetent hosts(20.9%). Overall mortality rate was 32.5%(14/42) and mortality rate of meningitis and pneumonia with septicemia were 33%(6/18) and 75%(3/4). MIC<sub>90</sub> and MIC range for fluconazole, amphotericin B, and voriconazole by broth microdilution test were 8 µg/ml(1-16 µg/ml), 0.5 µg/ml(0.06-0.5 µg/ml) and 0.125 µg/ml(0.03-0.25 µg/ml). MIC range and MIC<sub>90</sub> for fluconazole, amphotericin B, flucytosine by Vitek 2 system were 2 µg/ml(1-8 µg/ml), 0.5 µg/ml(0.25-0.5 µg/ml), 1 µg/ml(1-32 µg/ml). Essential agreement and categorical agreement of Vitek 2 system compared to broth microdilution test were 91.8%, 95.8% and very major, major and minor discrepancy were 0%, 0% and 0.41% respectively.

**Conclusion:** Cryptococcosis occurred in various immunocompromised conditions and even immunocompetent hosts as meningitis, pneumonia, pulmonary nodule, septicemia and skin infection. Despite of proper treatment overall mortality was high up to 32.5%. Resistant strain was few against fluconazole, amphotericin B, flucytosine and voriconazole. Vitek 2 system can be considered as reliable alternative antifungal susceptibility test.

---

Keyword : Cryptococcosis, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, epidemiology, antifungal susceptibility test, CLSI broth microdilution test, Vitek 2 system