임상에서 분리된 *Aspergillus fumigatus*의 MLST를 이용한 유전적 다양성 분석

건양대학교 의과학대학 한국의진균자원은행* 김영권*
질병관리본부 국립보건연구원 병원체자원관리 TF 이경민, 황규잠†

*교신저자: ykkim3245@konyang.ac.kr / 042-600-6371
†공동교신저자: kyuhwang@nih.go.kr / 043-719-6870

Abstract

Genetic Variation of *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates Using MLST Analysis

Korean Culture Collection of Medical Fungi, College of Medical Sciences, Konyang University
Kim Young Kwon
Pathogen Resource TF, Center for Infectious Diseases, NIH, CDC
Lee Kyeong Min, Hwang Kyu Jam

Background: Fungal infections caused by human pathogenic fungi are increasing globally, especially in elderly, children, and immune-suppressed or deficient patients. *Aspergillus fumigatus* is one of the well-known pathogenic fungi and causes aspergillosis in the human world. However, current identification and classification methods based on its phenotypic characteristics still have limitations. Presently, molecular biological tools using their DNA sequences are used for their genotype identification and classification.

Methodology: In order to analyze genetic variations of *A. fumigatus*, a total of seven housekeeping genes were amplified by PCR using specific primer pairs, and multi-locus sequence typing (MLST) assay was performed with a total of 31 *A. fumigatus* clinical isolates.

Results: Results of the Phylogenetic tree analysis showed that all *A. fumigatus* strains from respiratory specimens were classified into clusters A and B, and the rest of the strains from non-respiratory specimens were classified into clusters C and D. Consequently, although the sample size was too small, genetic characteristics of *A. fumigatus* clinical isolates, according to their clinical isolates (origin), were very similar and well-correlated with other clinical data.

들어가는 말

지금까지 알려진 진균은 약 25만 종으로 토양이나 식물 등, 자연환경에 흔히 존재하고 있으며, 그 중 약 300여종이 사람에게 감염을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다[1]. 전 세계적으로 진균에 의한 인체감염(fungal infection)은 어린이와 노인층, AIDS, 당뇨병, 장기이식 수술환자, 화학요법제 투여 환자 및 면역억제제의 장기간 사용 환자 등 면역력이 약해졌거나 억제된 사람들에게 주로 발병하며, 감염률 및 사망률이 전 세계적으로 꾸준한 증가 추세를 보이고 있다[2-3]. 공기를 통해 사람에게 감염되는 곰팡이들 중 가장 큰 비중을 차지하고 있는 아스페르길루스증(Aspergillosis)은 대부분 *A. fumigatus*에 의해 발병하는 것으로 알려져 있다. *A. fumigatus*에 감염되면 심할 경우 사망에까지 이르게 하는데, 항진균제를 투여함에도 불구하고 감염자의 사망률은 매우 높게 보고되고 있다[4]. 또한 *Aspergillus* 속은 인체의 피부감염, 외이 아스페르길루스증(otomycosis), 폐 아스페르길루스증, 심내막염과 같은 침습성 감염을 포함한 넓은 범주의 감염을 일으킨다. 폐 아스페르길루스증은 심각한 면역저하증 환자에게서 일어날 수 있는 침습성 폐아스페르길루스증

(invasive pulmonary aspergillosis, IPA)부터 경미한 면역저하증 환자에게서 일어나는 만성 괴사성 아스페르길루스증까지 그 감염범위가 매우 넓다[5]. 최근 IPA의 위험은 혈액 줄기세포 이식 환자와 백혈병 환자 등에서 훨씬 높은 것으로 보이는데, 치사율이 38.5%로 알려져 있다. 특히 *Aspergillus fumigatus*는 IPA의 가장 현저한 병인으로 작용하고 있으며, 그 뒤를 이어 발생률이 높은 것은 병원 환경에 따라 *A. terreus* 또는 *A. flavus*인 것으로 알려졌다[6-7]. 최근에 *A. ustus*와 다른 *Aspergillus*종인 *A. alliaceus*, *A. lentulus* 그리고 *A. udagawae*로 인해 발생하는 IPA가 보고되고 있다[8]. *Aspergillus* spp.의 종 분류방법은 배지, 광학현미경 또는 전자현미경을 이용한 형태학적 방법과 최근에는 분자생물학적 방법이 많이 사용되고 있다. 집락의 특징은 집락성장속도(colony growth rates), 배열(texture), 포자형성(sporulation)정도, 균핵(sclerotia) 또는 cleistothecia의 생성, 균사(mycelia)의 색, 포자형성 여부, soluble pigments, 삼출물(exudates), 집락뒷면(colony reverses)의 색조 생성 등이 있으며, 종 동정을 위한 배지의 종류 선택, 접종기술, 접종 조건은 형태학적 분류에 영향을 줄 수 있다[9-10]. 진균의 분류를 위해 최근에 사용되고 있는 분자생물학적 분석 기술의 하나인 Multi-locus sequence typing (MLST)은 염기서열 분석을 통해 얻어진 정보를 이용해 진균 균종 동정 및 단일한 순수 클론인지, 또는 혼합된 클론인지를 확인할 수 있다[11]. MLST에서 주로 사용되는 유전자는 다형성(polymorphism)과 microsatellite가 강한 유전자들로 약 10개 정도의 housekeeping 유전자를 대상으로 분석하며, 해당 유전자 부위 약 200~500 bp 정도 영역을 사용한다. 기존에 많이 사용되었던 MLEE (multi-locus enzyme electrophoresis)는 분석에 많은 수의 균주가 필요하고, 숨겨진 variation은 분석 할 수 없었으나 MLST는 이 부분까지도 찾아낼 수 있는 장점이 있기 때문에 기존의 phenotying이나 mating test를 통해서 동정하지 못했던 부분까지도 동정이 가능하다[11-12]. 따라서 본 연구에서는 환자의 임상정보를 포함한 *Aspergillus fumigatus*를 국내 수도권 3차병원 임상분리 균주를 수집하여 이에 대한 유전자형의 다양성 분석을 위하여 MLST 분석을 수행하였다. 이로부터 나온 결과와 임상정보에 대한 통합 분석을 함으로서 의료계의 진단과 치료에 도움이 되는 진단참고자료를 제공하고 유전적으로 다양한 변이균주를 찾아 국가 병원체 자원은행에 기탁함으로써 진균 감염병의 진행 역학을 연구하는데 기초자료를 제공하고자 하였다.

몸 말

국내 수도권 3차병원의 임상에서 분리 한 *Aspergillus fumigatus* 균주 31주를 대상으로 질병과 관련된 정보 연계성을 분석하기 위하여 환자의 성별, 연령별 정보와 검체 및 동반질환 정보를 수집하였다(Table 1). *Aspergillus fumigatus*가 분리된 검체는 객담과 같은 호흡기 검체가 26건으로 83.9%를 차지하였고 피부도찰 검체와 체액검체가 각각 2건으로 6.4%였으며, 검체원을 알 수 없는 검체가 1건(3.3%)이었다(table 2). *A. fumigatus* 유전자형의 다양성 분석을 위한 MLST법에 사용된 primer set은 기존 보고된 문헌의 primer sequence를 참조하여 제작하였다(Table 3). 임상에서 분리한 *A. fumigatus* 균주들의 유전적 분석을 위해 우선 house-keeping 유전자 내 염기서열의 변화 양상 및 패턴을 분석하였다. 분석에 사용된 부위는 MLST allele type 분석에 사용되는 변이가 자주 나타나는 부위(polymorphic site)를 대상으로 분석하였다. 분석 결과 7개의 유전자 중 3개(LIP, MAT1-2, BGT1)의 유전자에서 기존 database의 variable site 이외의 위치에서 변이가 이루어진 균주를 확인하였다. 125번 균주는 LIP 유전자의 1731번 염기가 G(100%)에서 T로 치환되었다. 19, 62, 104번 균주는 MAT1-2 유전자의 2128번 염기가 C(100%)에서 T로 치환되었다. 그리고 190번 균주는 BGT1 유전자의 660번 염기가 G(60-70%) 또는 C(30-40%)가 주로 나타나지만 A로 치환되어 있음을 확인하였다(Table 4).

Table 1. Clinical information of *Aspergillus fumigatus*

No.	strain	Clinical data			
		specimen	sex	age	Main disease
1	1	Sputum	M	65	Asthma attack
2	5	Bronchial washing fluid	F	34	Aspergilloma
3	7	Sputum	M	57	Pneumonia Asthma attack
4	18	Sputum	M	43	Aspergilloma
5	19	Sputum	F	63	Pneumonia
6	31	Skin Swab	M	36	Skin necrosis
7	33	Sputum	M	38	Pneumonia
8	36	Stool	M	41	Rectal hemohrrge
9	40	Sputum	F	72	Asthma attack
10	43	Discharge, ear	F	58	Chronic otitis media with
11	62	Sputum	M	46	Asthma attack
12	82	Bronchial washing fluid	M	47	Asthma attack
13	104	Fluid, pleural	M	32	BPF, hemoptysis
14	105	Sputum	M	36	NTM disease
15	107	(Endo)Tracheal Aspirate	F	70	Peripheral T-cell lymphoma
16	112	Pus, open	F	40	Fungal abscess(Aspergilosis)
17	120	Transtracheal Aspirate	F	65	severe sepsis
18	123	Sputum	M	39	Constipation
19	125	Transtracheal Aspirate	M	65	AML
20	126	Transtracheal Aspirate	F	52	Colon cancer, multiple meta
21	127	BAL fluid	M	55	NK/T cell lymphoma
22	184	Fluid, pleural	M	54	Pneumonia
23	185	(Endo)Tracheal Aspirate	M	80	Azotemia
24	187	Sputum	F	36	HCV
25	190	Sputum	M	64	Asthma attack
26	198	Pus, open	M	62	Asthma attack
27	199	(Endo)Tracheal Aspirate	M	67	Acute hepatitis
28	224	Tissue(specify)	M	72	wound sponge
29	229	BAL fluid	F	36	AML/lung GVHD, invasive aspergillosis
30	230	Sputum	M	49	Pneumonia
31	231	(Endo)Tracheal Aspirate	F	35	Septic shock

Table 2. Specimens sources from aspergillosis patients

Specimen sources	No. of patient (%)
Respiratory	26 (83.9)
Skin swab	2 (6.4)
Body fluid	2 (6.4)
Etc.	1 (3.3)

Table 3. Specific primers used for *A. fumigatus* MLST

Locus			Sequences(5′→3′)	Amplicon Size(bp)
ANXC4	Annexin-like protein C4	F	GCA AAG CGT GAT GAC AGA AA	729
		R	TAG GTC GAC ACA GGT TGT GG	
BGT1	Betaine-GABA transporter	F	ACG GTG ATG GCG TCA ATA A	811
		R	ACT GTC CCT CCT TCC GAT CAA	
CAT1	Catalase 1	F	TAT ATG ACC GGC GAG CTC AA	754
		R	ACG AAT CGG AAG GTA TGC AC	
LIP	Lipase	F	AGC GTA GCC TCC AGA CAT A	802
		R	CTC GCC TCA CTT CTC CTC AG	
MAT1-2	Mating-type protein	F	TCG ACT TTC CAG AGC ATG G	360
		R	GTG GTC GCT TAA TGA CAG CA	
ZRF2	Zinc finger RNA binding protein 2	F	AGG GAC CTT GAG GAT CGT C	639
		R	GAT GAT ACC TTC GAC CCA TGA	

Table 4. MLST allele type and mutation analysis

Strain #	Gene name / Allele type					
	ANXC4	BGT1	CAT1	LIP	MAT1-2	ZFR2
	8	8	7	8	5	6
1	2	3	2	1	1	1
5	1	1	3	1	1	1
7	1	1	3	1	2	1
18	1	1	1	1	1	1
19	1	3	3	1	6(new)	2
31	1	3	2	1	2	2
33	1	3	2	1	1	2
36	1	1	3	1	2	2
40	1	1	3	1	5	1
43	1	3	2	1	1	5
62	1	1	2	1	6(new)	1
82	1	1	3	1	1	1
104	2	1	7	1	6(new)	1
105	1	3	3	1	1	2
107	1	1	3	1	5	1
112	2	1	2	2	1	1
120	1	1	2	2	2	1
123	1	1	3	1	5	1
125	1	1	3	9(new)	5	1
126	6	3	2	1	1	5
127	2	1	3	2	1	1
184	1	3	2	1	2	1
185	2	1	3	1	1	1
187	1	3	3	1	2	1
190	1	9(new)	3	1	1	1
198	1	3	3	1	1	1
199	1	3	2	1	2	2
224	1	3	2	1	2	2
229	1	3	2	1	2	2
230	1	1	3	1	2	2
231	1	3	3	1	2	1

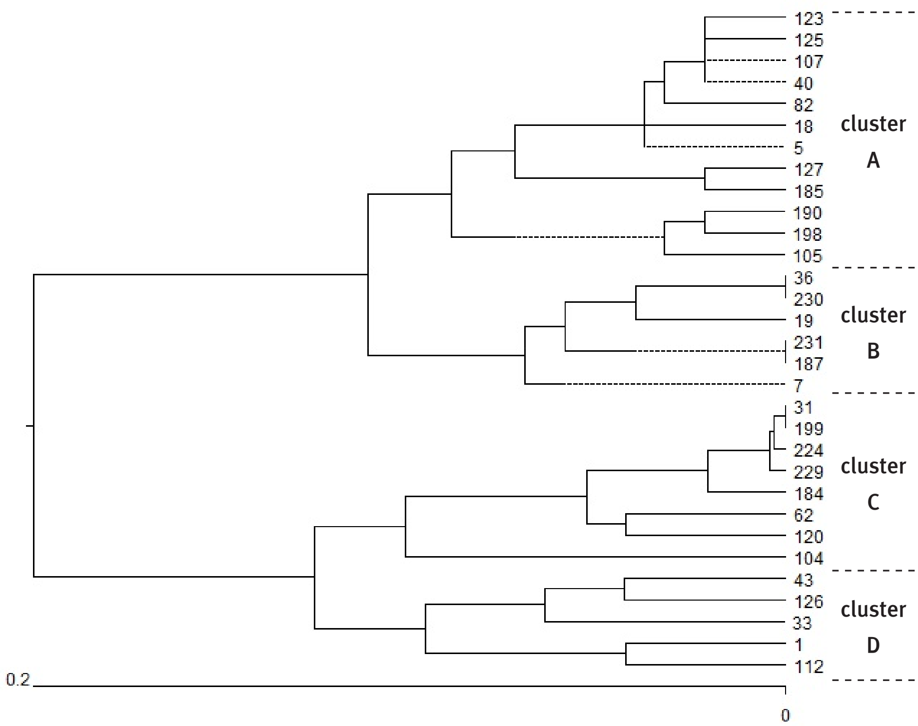

Figure 1. MLST phylogenetic tree of *Aspergillus fumigatus*

분석에 사용된 임상분리균주 31균주에 대한 Phylogenetic tree를 분석한 결과, 임상정보와의 연관성은 뚜렷하게 나타나지는 않았지만 Cluster A와 B 분류에 포함된 18주는 모두 호흡기 유래 균종이었으며, cluster C과 D에 포함된 균주들은 대부분 비호흡기 유래(skin, ear, pleural fluid)주들이 포함되어있다는 것을 확인할 수 있었다(Figure 1).

맺음 말

과거에는 *Aspergillus fumigatus*의 균종 간 유전적 상관성을 구분하는 방법으로 RFLP typing, randomly amplified polymorphic DNA typing 그리고 Southern blot에 의한 DNA fingerprinting 방법이 사용되었었다. 그러나 이러한 방법들은 MLST 방법에 비하여 다양성 면에서 상당히 떨어지는 것으로 나타났다[13-15]. 아직도 MLST 한 가지 방법만으로는 완벽한 분석이 어려운 것이 사실이라 다른 방법과 병용하여 그 효율성을 높이고자하는 방법들이 시도되고 있다[11-12]. 본 연구에서의 MLST방법의 효율성은 환자의 검체에 따라 다른 양상을 보임을 확인하였다. 인체에 감염을 일으키는 진균감염증은 유병률이 높음에도 불구하고 국내 감염률에 대한 전국단위의 감시 및 역학적 특성이 잘 알려져 있지 않다.

주요 진균감염 병원체의 주기적 조사로 지역별 균종 및 특성 변이 등 예방을 위한 기초 자료들의 마련이 요구되고 있다. 진균의 유전자형 다양성 특성 분석자료의 지속적인 축적 및 연구자들에게 제공으로 진균증의 정확한 진단 및 치료, 향후 대비책 등의 마련에 도움이 될 것으로 판단된다.

본 연구를 통하여 국내의 임상에서 분리된 *Aspergillus fumigatus*의 유전적 다양성을 가진 균주를 보유함으로서 진균 균주 수입으로 인한 경제적 손실을 막고, 앞으로 연구자 및 병원, 건강 관련 국가기관 등에 의료보건학적 정보로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 더 나아가 국내 병원에서 다양한 환자로부터 분리한 *Aspergillus* *fumigatus*의 균주 간 연관성을 지속적으로 관찰함으로서 향후 국내에서 발생할 수 있는 우세 종의 균주를 파악하고 확보하여 *Aspergillus* 속의 감염으로부터 국민들의 건강을 보호할 수 있는 좋은 정보를 제공 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Balajee, S. A., J. L. Gribskov, E. Hanley, D. Nickle, and K. A. Marr. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. Eukaryot. Cell 4:625-632.
2. Balajee, S. A., D. Nickle, J. Varga, and K. A. Marr. 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. Eukaryot. Cell 5:1705–1712.
3. C. Gil-Lamaignere, E. Roilides, J. Hacker and F. M. C. Muller. 2003 Molecular typing for fungi a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. Clinical Microbiology and Infection. 9(3);173–185.
4. Chazalet, V., J.-P. Debeaupuis, J. Sarfati, J. Lortholary, P. Ribaud, P. Shah, M. Cornet, H. V. Thein, E. Gluckman, G. Bru¨cker, and J.-P. Latge. 1998. Molecular typing of environmental and patient isolates of *Aspergillus fumigatus* from various hospital settings. J. Clin. Microbiol. 36:1494-1500.
5. David W. Warnock. 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Jpn. J. Med. Mycol. Vol. 48, 1–12.
6. De Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gene, and M. J. Figueras. 2000. Atlas of clinical fungi, 2nd ed. Central bureau voor Schimmel cultures, Utrecht, The Netherlands.
7. Denning, D. W., Kibbler, C. C. & Barnes, R. A., and on behalf of the British Society for Medical Mycology 2003. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for patients with invasive fungal infections. Lancet Infect Dis 3, 230-240.
8. J. M. Bain, A. Tavanti, A.D. Davidson, and F. C. Odds. 2007. Multilocus Sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. J. Clinical Microbiology. 45(5);1469–1477.
9. John W Taylor and Matthew C Fisher. (2003) Fungal multilocus sequence typing–it's not just for bacteria. Current Opinion in Microbiology. 6;351–356.
10. Je-Seop Park, Seung-Hak Cho, Seung-Ki Youn, Young-Seok Bak, Young-Bin Yu, Young Kwon Kim. (2015) Epidemiological Characterization of Opportunistic Mycoses Between the Years 2006 and 2010 in Korea J. Microbiol. Biotechnol. 2016, 26(1), 1-6 Review
11. Kim DH, Kim SH, Kim YK, Kim SO, Kim SJ, Hong SB. 2009. Reidentification of Aspergillus spp. isolate from clinical specimens of patients suspected as pulmonary *Aspergillosis* in Korea. Korean J. Med Mycol 14(3):133–144.
12. Sang-Ha Kim, Seung-Hak Cho, Seung-Ki Youn, Je-Seop Park , Jong Tae Choi, Young-Seok Bak, Young-Bin Yu, Young Kwon Kim. 2015. Epidemiological Characterization of Skin Fungal Infections Between the Years 2006 and 2010 in Korea. Osong Public Health Research Perspectives 2015 6(6), 341e345.

※ 이 글은 2015년 질병관리본부 학술연구개발용역과제인 "국내 분리 의진균의 형태학적 · 유전학적 분석 및 자원화" 결과보고서를 일부 요약 정리한 내용입니다.