

유전자 서열에 근거한 새로운 감염 질환의 진단

조 지 현

원광대학교 의과대학 임상병리학교실

Genotype Diagnosis of New Infectious diseases

Ji-Hyun Cho

Department of Clinical Pathology, Wonkwang University, College of Medicine, Iksan, Korea

서 론

병원 검사실에서의 감염성 질환의 진단은, 검체의 배양에 의한 감염원 검출과 형태학적, 생화학적 및 대사상 특징이나 혈청학적 반응상과 같은 표현형 검사 (phenotype test) 에 대부분 의존한다. 전통적인 표현형 검사는 1) 배양 조건이 까다로와 기존 방법에 의하여 배양이 불가능한 감염원 2) 장시간 소요 3) 배양 조건에 의한 표현형의 변화 4) 다양한 유전자 및 유전자 조합에 의해 동일 표현형이 발현할 수 있다는 단점이 지적되고 있다.

최근에는 분자생물학적 방법을 통한 감염원의 유전자형 검사 (genotype test)가 병원 검사실에도 도입되어 사용이 증가하고 있다[1]. 유전자형 검사는 감염원의 핵산 (DNA, RNA)을 대상으로 하기에 1) 배양이 필요하지 않으며 2) 검체로부터 직접 그리고 매우 소량을 이용하여 신속하고 정확한 결과를 산출할 수 있고 3) 보다 객관적으로 정의되고, 정량적인 정보를 제공한다는 장점이 있다. 그러나, 유전자형 검사는 감염원 전체 유전자의 제한된 부분만을 검사하기에 전체적인 특성을 반영하지 못하는 점, 감염 질환의 치료 경과나 임상 증상의 호전과 잔존 유전자의 지속적인 검출과의 연관성에 대하여 확실한 결론이 없다는 점, 그리고 상재균, 보균자와 감염과의 진단에 있어서 전통적인 Koch의 가설 (Koch's postulates)과 일치되지 않는 점등이 지적되고 있다[2]. 이에 근래에 제시되고 있는 감염원을 정의하는데 있어서 Koch의 가설을 보완하는 몇 가지 가설들과 근래에 사용되는 유전자형 검사법들에 대한 일반적인 고찰과, 최근 새롭게 검출된 감염원들에 적용된 과정들을 소개하고자 한다[3,4].

1. 감염 질환에 있어서 원인 감염원의 확인

어떤 감염질환의 원인 감염원을 처음으로 발견하고 확인하는 과정은 간단하지 않다. 우리는 감염원을 증명하는데 1800년대 Koch의 가설을 가이드라인으로 생각한다. 그의 가설들은 결핵과 탄저병에 대한 연구에 근거하였었는데, 1) 원인 미생물은 모든 해당 질환에서 발견되고, 병리학적 변화와 질환의 경과와 관련되어야 한다. 2) 원인 미생물은 다른 질환에서 우연히 발견되지 않아야 한다. 3) 원인미생물은 개체로 부터 분리되고, 반복적으로 순수 배양되어야 하며, 새로운 개체에서 질환을 초래하여야 한다. 4) 실험적으로 접종된 개체로부터 재 분리되어야 한다는 내용이다. Koch의 가설은 결국 어떤 감염원과 질환과의 관련성이, 우연이 아닌 필연적임을 증명하는데 필요한 조건이라고 할 수 있겠다. 그러나 19세기에 이미 바이러스, 클라미디아, 리케차에 대한 지식이 있었기에 Koch의 가설을 충족시킬 수 없는 경우가 많다는 것도 주지의 사실이었다. 또한 보균자나 subclinical infection의 경우는 두 번째 가설에 일치하지 않으며, 질병의 발생에 있어서 독소의 역할, 개체와 환경, 미생물간의 복잡한 상호 작용의 관련에 대하여 알게 되면서부터 감염원과 질환과의 관련성을 증명하는 것이 더욱 단순한 과정이 아님을 알게 되었다. 그러기에 전자현미경, confocal microscopy에 이르기까지 다양한 영상획득 방법과 배양법의 발달, 혈청학적 방법과 분자생물학의 발달과 더불어 Koch의 가설을 보완하는 여러 가지 의견이 개진되어 왔다. Hill은 strength of association, consistency of association, specificity of association, temporality, biological gradient, plausibility, coherence, experimentation, analogy와 같은 역학적 기준을 제시하였다[5]. Evans는 EBV 연구에서 근거한 면역학적 기준으로, 1) 질병의 발생 전 또는 감염원에 노출 전에는 해당 항체가 없어야 한다. 2) 질병의 경과 중에 IgG, IgM을 포함한 항체가 규칙적으로 생성되어야 한다. 3) 항체의 존재는 해당 질환에 대한 면역성을 예견할 수 있어야 한다. 4) 항체가 없는 경우에는 해당 감

접수번호 : CM 5-01-09

교신저자 : 조지현

(570-180)전북 익산시 신용동 344-2

원광의대병원 임상병리과

Tel : 063) 850-1541 Fax : 063) 842-3786

E-mail : jihcho@hotmail.com

염원에 의한 감염 및 질환발생에 susceptible함을 예견한다. 5) 기타 미생물에 대한 항체반응은 기타 미생물이 질환의 발생에 cofactor로 작용하지 않는 한 위와 같은 조건으로 관련되어 있지 않아야 한다고 제시하였다[6]. 또한 Johnson과 Gibbs는 slow virus와 관련하여 감염원의 in situ 검출과 미생물학적-조직학적 관련을 기술한 기준을 제시하기도 하였다[7]. Evans는 1976년 “Causation and Disease” 에서 다양한 급만성 감염증에 대하여 종합적인 기준(unified concept of causation)을 제시하였는데, 즉 감염원과 질환사이에 biologic-epidemiologic sense의 기준에 적합한 변화가 있어야 한다는 조항들이다[6].

한편 분자생물학적 방법에 의한 감염원의 검출 방법은 크게 두가지로 구분할수 있는데, 핵산 증폭 (amplification) 과 교잡법 (hybridization) 으로서 이것들은 소위 전통적인 방법에서의 “Growing” 과 “Seeing” 에 해당된다고 하겠다. Fredricks와 Relman은 1996년에 유전자형 검사법에 근거한 가이드라인을 제시하였는데 다음과 같다. 1) 추정 감염원의 핵산 서열이 질환의 대부분에서 존재하여야 한다. 특히 특정 장기나 해부학적 위치에 선택적으로 발견되어야 한다. 2) 질병이 없는 개체나 조직에서는 추정 감염원의 핵산이 없거나 거의 없어야 한다. 3) 질병의 호전과 더불어 추정 핵산 서열은 감소되거나 검출되지 않아야 하며, 재발의 경우에는 위와 반대의 조건을 보여야 한다. 4) 핵산 서열의 검출이 질병을 예고하거나 핵산의 양이 질병이나 병리소견의 중증도와 비례하는 경우에는 질환과의 연관성이 높다. 5) 검출된 핵산 서열로부터 추론된 미생물의 성향이, 기존 알려진 생물학적 특성과 일치하여야 한다. 6) 특정 핵산 서열이 세포 수준에서 특이적으로 관련되었음을 증명하는 in situ hybridization법을 이용한 시도가 있어야 한다. 7) 이와 같은 특정 핵산 서열과 관련된 증거가 반복적으로 재현할 수 있어야 한다[3].

이상의 몇 가지 제시된 기준을 검토하여 보면 미지의 감염원과 질환과의 연관성을 증명하는 작업은 매우 복잡한 과정이므로, 하나의 방법에 의하여 증명할 수 있기 보다는, 임상 증상등에 기반을 둔 역학적 접근을 기본으로, 기존의 검사실적 방법들과 근래에 사용되고 있는 분자생물학적 방법을 상호 보완적으로 적용하여 확실한 증거를 확보하도록 하여야 할 것 같다. 특히 분자생물학적 방법을 적용할 때는 어떤 감염원과 질병과의 필연적인 연관성을 증명하는데 in situ hybridization법을 사용하여 세포 수준에서 특정 핵산서열을 증명하는 과정이 강조되고 있음을 알 수 있다.

2. 새로운 감염원 검출에 사용되는 유전자형 검사법

전술한 바와 같이 새로운 감염원의 검출에 사용되는 유전자형 검사법은 1) Consensus PCR (broad-range PCR) 과 같은 핵산 증폭법 (amplification) 2) Representational Difference Analysis (RDA)와 같은 교잡법 (hybridization)

두 가지로 크게 구분할 수 있다[2,3].

Consensus PCR (Broad-range PCR, Amplification)

Broad-range PCR법은 보존된 핵산 서열의 존재를 확인하는 방법으로 바이러스, 세균, 기생충 감염의 진단에 사용되며, 현시점에서 병원 검사실에 비교적 쉽게 적용할 수 있을 것으로 생각된다. 감염원의 분류나 확인에 사용되는 서열은 일반적으로 진화의 과정 중에 잘 보존된 염기 서열 (conserved sequence)을 이용하는데, 이론적으로는 모든 세포에 보존되어 있으면서 종간에 구분이 되는 부위를 목표로 하여 핵산을 증폭하고 염기서열을 확인하는 방법이다. 흔히 large-subunit (ls) rDNA, ss rDNA가 사용되는데, genus, species뿐만 아니라 strain 수준까지도 구분이 가능하기도 하다. 이 방법에 의하여 *Mycobacterium genevense*, *Bartonella henselae*, *Tropheryma whippelii*, *Ehrlichia equi* 와 같은 세균이 분리되었을 뿐만 아니라 *Babesia*나 *fungi* 와 같은 진핵세포 미생물에도 적용되고 있다. 또한 rDNA이외에도, 대상 미생물에 따라 DNA polymerase, RNA polymerase, elongation factor G, proton-translocating ATPase, heat shock protein, citrate synthetase gene 과 같은 주요 효소 (house-keeping gene)나 non-structural protein의 특정 부위가 사용되기도 한다.

한편, 이와 같은 consensus sequence를 probe로 만들어 이를 소위 chip 의 표면에 부착시켜 두고 검체에서 추출한 핵산과 교잡반응을 일으켜 감염원을 동정하거나 분류하는 방법이 시도되고 있다[8].

Representational Difference Analysis (RDA, Hybridization)

RDA법은 일종의 subtractive hybridization법에 의해 감염원 특이 염기서열을 검출하는 방법이다. 즉, 미리 의심되는 감염원이 포함된 조직의 핵산 절편에 시발체를 ligation 시켜두고, 여기에 상대적으로 대량의 정상조직 핵산을 혼합한 상태에서 PCR법을 이용하여 수 차례 증폭하는 과정을 반복한다. 정상조직에는 존재하지 않는 염기서열은 소위 logarithmic scale에 의해 증폭(kinetic enrichment)되는 것에 비하여 정상조직은 직선적인 증폭(linear amplification)이 이루어 지는 현상과 한가닥 핵산을 파괴하는 과정을 이용하여 결국은 감염원 특이 염기서열을 검출하는 방법이다. 이 방법을 이용하여 Kaposi's sarcoma에서 HHV8 (Human Herpes Virus 8, Kaposi Sarcoma associated Herpesvirus; KSHV)와 GB virus를 검출하였다[9,10].

3. 유전자형 검사법에 의한 감염원 검출 과정

유전자형 검사법은 다양한 검사기법을 사용하게 되므로 일률적으로 검사 흐름을 설명할 수는 없겠으나, 일반적으로 Fig. 1과 같은 흐름을 거치게 된다. 적절한 검체 선

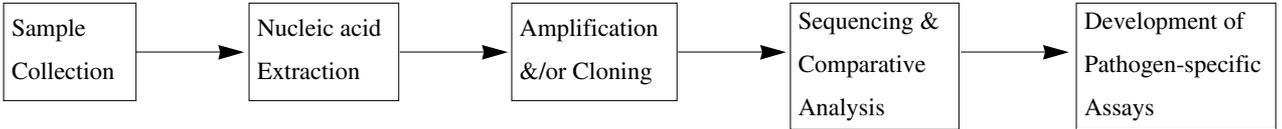


Fig. 1. Sequential approaches for the identification and detection of microorganisms in clinical samples using sequence-based technology.

택과 이송 및 보관의 중요성은 핵산의 변성과 오염의 위험성을 피하기 위하여 병원 검사실의 어떤 검체보다도 더욱 주의를 기울여야 한다는 점은 당연하다고 하겠다. 간혹 유전자형 검사법 (amplification, hybridization)의 높은 예민도 때문에, 검체에서의 핵산 추출과정에 대해 상대적으로 덜 관심을 갖게 될 수 있는데, 핵산 추출과정에 대하여도 세심한 비교 및 표준화 과정이 필요할 것으로 생각된다[3]. Comparative analysis는 새롭게 발견한 염기 (단백) 서열 사이, 혹은 기존에 알려진 서열사이의 관련성을 분석하는 과정을 말하는데, 좁은 범위로는 phylogenetic analysis라고 할 수 있겠다[11]. 즉, phylogenetic analysis는 새로운 염기나 단백질서열을 database (genbank)에 등록된 서열과 정렬 (alignment) 및 비교하여 상호 연관성의 정도를 phylogenetic tree를 통하여 나타내는 작업을 말한다. 이 과정은 개인용 컴퓨터를 이용하여 실시할 수 있으며 무료 혹은 유료의 여러가지 프로그램이 개발되어 있어 개인의 취향에 따라 사용할 수 있다. clustalX는 많이 사용되고 있는 무료 프로그램으로서, alignment 뿐만 아니라

Neighbour Joining (NJ) method에 의한 tree를 그리는 것이 가능하며, 자체에서 제공하는 그래픽 프로그램 (njplot)을 이용하여 그래픽 처리가 가능하다. 단, 보다 나은 계통분류 분석과 tree를 얻기 위하여서는 별도로 PAUP (Phylogenetic Analysis using Parsimony)와 같은 계통분류 전용 프로그램을 이용하는 것이 권장된다.

계통분류 분석을 위하여 염기 서열을 alignment하는 과정은 나중 phylogenetic analysis의 기본 자료로 사용되어 이것을 근거로 phylogenetic tree가 구성되게 되므로, 이 과정에서 각 염기서열을 잘 alignment하는 것이 기본적인 면서도 중요하다. Phylogenetic tree를 구성하는 분석방법은 두 가지로 구분될 수 있는데, 1) Algorithmic approach: Neighbour-Joining (NJ) method, UPGMA 2) Tree-searching approach: Parsimony, Maximum likelihood(ML), Bayesian analysis이다. 각기 장단점이 있어 쉽게 우열을 말할 수 없고, NJ, Parsimony방법은 속도가 비교적 빠르다는 장점이 있어서 분석 대상이 많고 서열이 길 때에 좋다. NJ method가 현재는 가장 많이 사용되는 방법 (UPGMA법은 현재

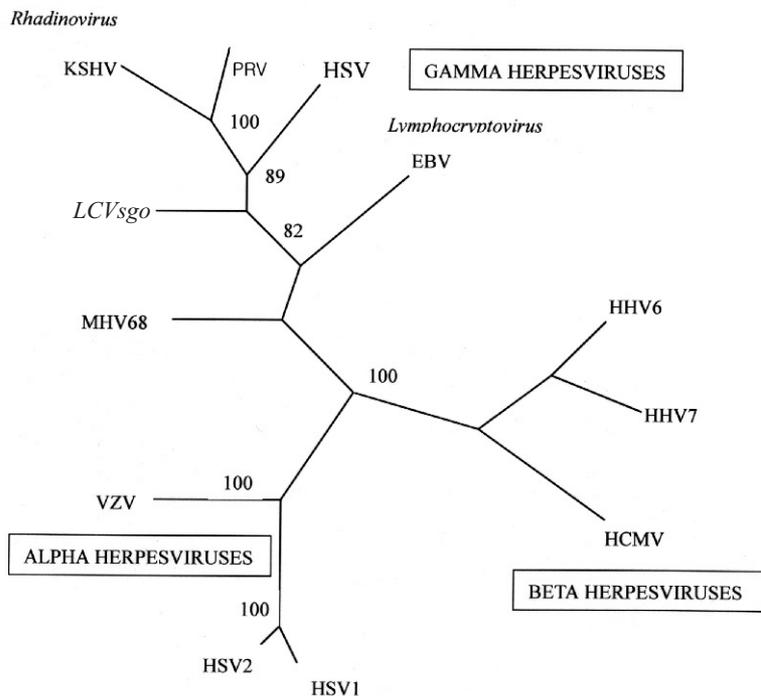


Fig. 2. Phylogenetic analysis of DNA polymerase genes of new herpesvirus (LCVsgo) and other Herpesviruses.

는 많이 사용되지 않는다고 함)이나, tree-searching method가 이론적으로 장점이 많아 점차적으로 사용이 증가되고 있다고 하지만 분석시간이 하루이상 소요될 수도 있어 분석대상 수와 길이에 따라서 적용 여부를 고려해야 한다. 일반적으로 각 방법에 의하여 tree를 그려 보고 이것을 비교분석하여 각 방법의 장점을 그래픽 프로그램에서 조합하는 것이 권장된다. 개인의 기호에 따라 다르기는 하지만 ClustalX를 이용하여 각 염기 서열을 비교한 파일을 저장하고, PAUP 프로그램을 이용하여 phylogenetic tree를 그려 비교 분석하는 과정을 권장하고 싶다.

이제, 유전자형 검사법에 의한 새로운 감염원을 발견해 나가는 두 가지 예를 설명하고자 한다. Bacillary angiomatosis를 일으키는 *Rochalimaea (Bartonella) henselae*를 16S RNA를 이용하여 감염원을 확인하는 과정을 살펴보면 유전자형 검사법에 대하여 시사하는 바가 매우 크다[12]. 즉, *B. henselae*는 해당 질환의 병소에서 오래 전부터 현미경적으로 의심되는 세균을 관찰할 수 있어 감염성 질환을 의심하였으나 배양할 수 없어 그 진위를 확인할 수 없었다. 1990년에 병소에서 핵산을 추출하여, 16S RNA를 목표로 broad-range PCR을 실시한 결과 증폭산물을 얻을 수 있었으며, 이 염기서열을 확인하여 알려진 염기서열과 비교한 결과, *B. quintana*와 유사하다는 것을 확인할 수 있게 된다. 이에 새로 알게 된 염기서열을 근거로 특이 시발체를 고안하여 병소 및 대조 조직에서 PCR을 통하여 특이성을 재확인함으로써 새로운 염기서열을 갖는 어떤 세균이 Bacillary angiomatosis의 원인 균일 가능성을 확인하였다. 나아가 염기배열에서 유추한 세균 종의 배양조건에 따라 인체조직에서 관찰되는 추정 세균의 배양조건을 설정하고 결국 세균을 순수 배양하게 되었던 것이다. 마지막에는 이를 이용하여 특이 항체를 만들어 혈청학적 진단까지도 가능하게 되었던 것이다.

한편 인체에 여러 가지 질환을 일으키는 허페스 바이러스는 현재까지 인간에서는 HSV-1, HSV-2, HZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8 (KSHV)이 알려져 있다. DNA polymerase는 허페스 바이러스와 같은 DNA virus의 생존에 필수적인 효소로서, 인간뿐만이 아니라 동물에서 발견되는 허페스 바이러스에서도 잘 보존되어 있다[13]. 그러나, 이 유전자 부위는 아미노산 수준에서는 어느 정도 동일하다 할지라도 핵산 서열에서는 상당한 차이를 보이게 되는데, 이때 보존된 부위에 대하여 degenerate primer를 고안함으로써, 대부분의 허페스 바이러스에 특이 염기서열을 증폭시킬 수 있다. 따라서, 임상 증상에 미루어 어떤 허페스 바이러스에 의한 감염이 의심될 때에는 DNA polymerase 부위를 증폭하여 특이성 (병리 조직과 대조조직에서 증폭산물의 존재 유무)을 확인하고, 증폭산물의 염기서열을 확인하여, 이를 BLAST 검색하여 기존에 알려진 염기서열과 비교하고 이를 정렬 (sequence alignment) 및 계통분류(phylogenetic analysis) 함으로써,

만약 새로운 염기서열과 기존 알려진 염기서열 사이에 DNA 유사성이 비교적 낮을 때는 새로운 허페스 바이러스를 확인할 수 있다. (Fig.2)만약 염기 서열을 정렬하고 계통분류적 분석을 할 때에 보다 많은 부위의 염기서열이 필요한 경우에는 reverse PCR등의 방법으로 primer 바깥부분의 염기서열을 확인할 수도 있다. 나아가 새로운 바이러스를 배양할수 있는 세포주나 동물을 선택하고 바이러스를 배양할 수 있거나 바이러스 핵산을 대량 순수 분리하여 클로닝 및 염기서열을 분석하게 되면 새 허페스 바이러스의 전체 염기서열도 알수 있게 되며, 혈청학적 검사의 개발이나 기타 학술적인 연구도 가능하게 된다[14].

종 언

감염성 질환의 진단은 적절한 환자 검체에서 원인 미생물의 배양에 의한 순수분리와 미생물의 표현형 (phenotype)을 분석하는 전통적 방법에 의존하였으나, 근래에는 분자생물학의 눈부신 발전으로 과거의 표현형 검사와 더불어 유전자형 검사가 새로운 감염원의 검출에 큰 역할을 하고 있다. 매일 수 많은 검체를 분석하고 있는 병원 검사실에서는 이미 발견된 유전자 정보를 질환의 진단이나 감염원의 진단에 널리 이용하기 시작하는 단계인 것 같다. 이 시점에서 감염성 질환의 감염원을 유전자형 검사법으로 확인하는 기준과 일반적인 방법을 검토하여 보고자 하였으며, 나아가 병원 검사실에서도 새로운 감염원의 검출에 유전자형 검사법이 많이 사용되어지길 기대한다.

참 고 문 헌

1. David HP, Thomas FS, Fred CT and Thomas JW eds. *Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications. 1st ed. Washington D.C.: ASM publishing, 1993:173-518.* David AR and David HP. *Genotypic Methods for Microbial Identification. In: David HP, ed. PCR*
2. *Protocols for Emerging Infectious Diseases. 1st ed. Washington D.C.: ASM publishing, 1996: 3-31.*
3. David NF and David AR. *Sequence-Based Identification of Microbial Pathogens: a Reconsideration of Koch's Postulates. Clin Micro Rev 1996;9:18-33.*
4. David AR. *The Search for Unrecognized Pathogens. Science 1999;1308-10.*
5. Hill AB. *The environment and disease: association or causation? Proc R Soc Med 1965;58:295-300.*
6. Evans AS. *Causation and disease: the Henle-Koch postulates revisited. Yale J Biol Med 1976;49:175-95.*
7. Johnson RT and Gibbs CJ. *Koch's postulates and slow infections of the nervous system. Arch Neurol*

- 1974;30:36-8 (Editorial).
8. Drmanac R, Labat I, Brukner I and Crkvenjakov R. *Sequencing of megabase plus DNA by hybridization theory of the method. Genomics 1989;4:114-28.*
 9. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM and Moore PS. *Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. Science 1994;266:1865-8.*
 10. Muerhoff AS, Thomas PL, John NS, Tami JP, George JD, James CE, Michelle LC, George GS, Suresh MD and Mushahwar IK. *Genomic Organization of GB Viruses A and B: Two New Members of the Flaviviridae Associateed with GB Agent Hepatitis. J Virol 1995;69:5621-30.*
 11. Hall BG ed. *Phylogenetic Trees Made Easy. A How-To Manual for Molecular Biologists. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2001;1-151.*
 12. Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S and Tompkins LS. *The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identificqation of uncultured pathogens. N Engl J Med 1990;323:1573-80.*
 13. Johnson G, Nelson S, Petric M and Tellier R. *Comprehensive PCR-Based Assay for Detection and Species Identification of Human Herpesviruses. J Clin Microbiol 2000;38:3274-9.*
 14. Desrosiers RC, Sasseville VG, Czajak SC, Zhang X, Mansfield KG, Kaur A, et al. *A Herpesvirus of Rhesus Monkeys Related to the Human Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. J Virol 1997;71:9764-9.*