

미생물 검출을 위한 분자적 진단법

장 속 진

조선대학교 의과대학 진단검사의학교실

Molecular Diagnostics for Detection of Microorganism

Sook Jin Jang

Department of Laboratory Medicine, Chosun University College of Medicine, Gwangju, Korea

분자적 진단법(molecular diagnostics)의 개요

진단에 유용한 미생물학적 검사의 기본 목표는 특정 병원균을 신속히 검출하고 그 특징을 규명하여 환자가 잘 치료될 수 있도록 도와주는 데에 있다. 지난 세기에 미생물의 동정은 배양한 균의 형태와 생화학적 특징과 같은 표현형의 특성 (phenotypic characteristics)에 근거를 두어 시행되어 왔으나 균성장에 근거를 둔 방법은 때로 시간이 많이 들거나 값이 비싸고 어떤 미생물에는 쉽게 이용할 수 있는 방법이 없다는 단점이 있다.

지난 십년간 분자생물학의 발전으로 미생물의 유전학적 동정 및 특성 규명이 가능하게 되었다. 세균들간에 관련성 여부를 규명하기 위해 DNA 부합법(hybridization) 연구가 먼저 사용되었으나 표현형적 지표와 마찬가지로 부합법은 미생물의 회수량(recovery)과 성장에 의해 제한을 받을 수 있다. 뒤이어 검체내에 소수의 미생물이 있더라도 증폭시켜 결과를 낼 수 있는 핵산 증폭법이 개발됨으로서 임상미생물 검사실에서 병원균의 검출과 동정, 특성규명에 있어 새로운 장이 열리게 되었다. 더 이상 생체외의 성장이 미생물 동정에 항상 필요한 것은 아니다.

일반적으로 핵산 증폭법은 세가지 종류로 나눌 수 있다. 첫째, PCR이나 전사매개성 증폭법(transcription-mediated amplification : TMA), 가닥 치환(strand displacement : SDA)과 같은 표적핵산연쇄 증폭법; 둘째, Q β replicase (Q β R)나 열에 안정한 DNA ligase (LCR)를 이용한 탐색자 증폭법; 셋째, 각 탐색자 분자로부터 생성된 신호가 복합 탐색자(compound probes)나 분지된 탐색자

기법(branched-probe technology)에 의해 증강되는 신호 증폭법이다. 이들은 모두 전통적인 방법에 비해 몇 가지 장점들이 있으며, 특히 배양이 까다로운 균들의 검출에 유용하다.

분자적 진단법을 적용하면 원인균 진단에 속도와 민감도가 증강되고 때로는 특이도가 높아질 때도 있다. 처음에는 특정 핵산연쇄를 효소적으로 증폭하는 이런 기법들이 배양에 의한 생물학적인 증폭법을 대체할 수 있을 것으로 기대되었으나 여러 가지 측면에서 고려해 볼 때 분자적 기법은 생체외에서 자랄 수 없는 미생물이나 현재의 배양기법으로는 너무 민감도가 낮거나 비용이 많이 들고 검사 시간이 오래 걸리는 미생물에 적용하는 것이 적합하다고 생각된다.

분자적 진단법의 한계점으로는 검사범위가 좁고 위양성 및 위음성 결과가 나올 우려가 있으며 복수균 감염증을 검출하려면 특별한 고안이 필요하고 검사비용이 비싸다는 점 등을 들 수 있다.

그중 주된 한계점은 PCR의 증폭력 때문에 검체에 외부로부터 극미량의 표적 핵산이 오염되어도 위양성 결과를 낼 수 있다는 점이다. PCR 반응중 증폭대상 미생물과 전혀 무관한 미생물이 경합하여 함께 증폭되는 교차반응(cross-reactivity)도 관심의 대상이다. 분자적 진단법에서 정확한 결과를 얻으려면, 함께 처리되는 양성 대조나 검체로부터 교차 오염(cross contamination)되거나 주형 이월(template carryover)되는 것을 예방하는 문제가 가장 중요하다. 그래서 이러한 분석법에서는 필수적으로 임상적인 확인과정을 밟아야 한다.

한편 PCR 검사에서 여러 요인들이 위음성 결과를 초래한다. 예를 들면 증폭검사에 사용되는 효소의 저해제가 검체내에 있으면 위음성으로 나올 수 있다. 이러한 저해제의 유무는 검체에 소량의 표적핵산을 넣어주어 확인할 수 있다[1]. 일상적인 정도관리 방법으로 각 반응혼합액에 다른 크기의 산물을 내도록 고안한 대조용 관리핵

접수번호: CM 6-1-06

교신저자: 장속진

(501-717) 광주광역시 동구 서석동 588.

조선대학병원 진단검사의학과

TEL: (062) 220-3259 H: 011-614-8853 FAX: (062) 232-2063

E-mai: sjbjang@chosun.ac.kr

산을 넣어주거나 저해제의 효과를 최소화할 수 있도록 간단히 희석시키는 방법을 쓸 수 있다. 저해제가 의심되면 용해 및 핵산추출방법상 개선해야 할 점이 없는지를 정밀히 검토하여야 한다

분자적 진단법의 또다른 단점은 그들의 검사범위가 좁다는 점이다. 현행의 미생물-특이적인 핵산 검출법(organism-specific nucleic acid detection method)은 임상이나 검사실에서 병을 일으키는 병원균을 알고 있다고 가정한다. 즉 분자적 진단법으로 검체내에 있으리라 의심되는 균주의 유무에 대해서만 검사한다. 만약 그렇다면 핵산 증폭 검사가 임상 진단을 확진하기 위한 값비싼 도구로서만 유용하다는 얘기가 된다.

핵산 검출법에서 복수균 감염증은 특히 문제가 된다. 검사실에서 다수의 균주를 찾도록 고안된 것이 아니라면 공동감염 (coinfection)은 검출되지 못할 것이다. 장래에는 한 개 이상의 미생물을 동시에 검사할 수 있는 분자 생물학적 검사가 가장 유용할 것이다. 서로 다른 균주로부터 핵산 분절을 증폭하기 위해 단일 반응시험관에서 다수의 시발체를 사용하는 multiplex PCR이 이 문제를 해결하는데 사용될 수 있다.

핵산 증폭법의 마지막 단점은 그 가격이다. 시약 가격, 특허권 사용료, 장비, 증폭전실로부터 증폭후실에 이르는 별도의 독립된 공간이 필요한 점 등이 많은 임상 검사실에서 분자적 방법을 도입하는데 장애가 되고 있다.

분자적 진단은 중추신경계와 같은 특정 장소들에서 나온 검체나 특정 미생물 (*Legionella* 등)과 같이 통상적인 동정방법이 이용될 수 없거나 비효율적이거나 믿을 만하지 못한 경우에 중요한 장점을 가질 것이다. 분자적 기법이 더 효율적이고 더 널리 보급되어 단가가 더 낮아졌을 때 분자적 진단이 감염질환의 진단에 더 넓은 영향을 줄 것이다.

가장 보편화된 분자적 진단법인 PCR

1. PCR의 기본원칙과 PCR의 구성요소

분자적 진단법 중 부합법에 비해 간편하고 일손이 덜드는 핵산증폭법이 보편적으로 사용되고 있다. 핵산 증폭법중에서도 가장 널리 사용되고 잘 발달된 방법인 PCR에 대해 기본적인 내용을 살펴보고자 한다. K. Mullis가 1985년 PCR 기법을 창안하여 소개한 이후 이 기법을 적용하고 발전시킨 수많은 훌륭한 연구들이 연이어 발표되었고 1994년에 그는 그 공로로 노벨상을 수상했다. PCR 기법의 단순성과 유연성, 민감성, 특이성과 신뢰성 때문에 PCR은 거의 모든 유전체 연구에 필수적으로 사용되고 있는 중요한 도구이다. 염기서열분석(sequencing)이나 유전자 복제(cloning), 부합화(hybridization) 기법과 함께 핵산을 증폭하는 PCR의 기본 과정이 DNA를 검출, 복사, 변화시키려는 목적으로 사용되는 수많은 유전체

연구방법들의 토대가 되어 왔다.

PCR은 열변성, 시동물질 결합, 연장의 3가지 서로 다른 단계가 여러번 반복되는 주기적인 과정이다. PCR 주기를 구성하는 3 단계를 자세히 살펴보면 다음과 같다. 첫째, 고온에서 증폭대상 DNA의 두 가닥이 분리되는 DNA 변성 단계; 둘째, 저온에서 시동물질이 상보적인 증폭대상연쇄에 결합하는 시동물질 결합 단계; 셋째, DNA polymerase 가 시동물질 사이에 있는 증폭대상 연쇄를 연장시키는 연장반응으로 구성된다.

PCR에 의한 핵산 증폭의 순서를 살펴보면 먼저 증폭대상 DNA 주형에 열을 가해 변성시키고 특이적인 올리고 핵산 시동물질이 상대되는 주형가닥의 별도의 두 장소에 결합한다. 그 후 DNA polymerase에 의해 5' 으로부터 3' 쪽 방향으로 각각 연장반응이 진행되어 원래의 주형에 상보적인 복사물을 합성한다. 이러한 PCR의 각 주기마다 시동물질 결합장소의 사이에 있는 연쇄가 지수적으로 증폭된다. PCR 동안 산물축적의 지수적 증폭기는 무한한 것이 아니고 일정수의 주기 후에는 산물 축적이 고원상태(plateau)에 이르게 된다. 전 과정은 주기를 조절할 수 있는 thermal cycler 안에서 수행된다. 일반적으로 30에서 50회의 온도 주기를 돌리면 원래 100 copy 이하로 들어있던 표적 핵산량이 검출될 수 있는 양으로 증폭된다[2]. 증폭대상연쇄의 초기량이 아주 적더라도 지수적으로 증폭되어 다량의 산물을 내기 때문에 PCR은 놀라운 민감도를 나타낸다. 오염된 DNA가 극미량만 있더라도 DNA를 지수적으로 증폭하는 PCR의 능력으로 인해 위양성 결과가 나올 수도 있기 때문에 검사실에서는 오염의 가능성을 최소화할 수 있는 방안을 확립해야만 한다.

2. 간단한 PCR 실험계획서(protocol)

기본적인 PCR 실험을 계획하려면 표적핵산의 증폭에 적합한 올리고 핵산 시동물질 연쇄를 선택하고, buffer나 dNTP, thermostable DNA polymerase와 같은 증폭에 필요한 다른 시약들을 조합해야 한다. 전형적인 PCR 반응에서는 각각 20 pmole의 시동물질과 1.5 mM MgCl₂, 100 µg/ml gelatin, 200 µM의 4 dNTP mix, 2.5 units의 Taq DNA polymerase, 50mM KCl 및 10mM Tris HCl(pH8.4) PCR buffer로 구성된 50 µl의 PCR 반응혼합액에 100 ng의 검체내 주형 DNA를 넣어 증폭시킨다. PCR의 주기는 94℃에서 20 초간 열변성, 55℃에서 20 초간 시동물질 결합, 72℃에서 30sec 초간 연장시키는 조건으로 30 주기를 반응시키는 것이 보통이며, 각 PCR 검사별로 시동물질에 맞는 적절한 결합온도와 MgCl₂ 농도를 찾아내어 반응시키는 것이 필요하다[3].

유전자복제나 염기서열 분석, 부합법 등의 다른 기법에 비해 PCR 실험과정은 현저히 간단하고 수월하다. 다른 모든 PCR의 적용기법은 이 기본적 과정에서 파생된

것이다. 각 반응이 동일한 구성요소를 필요로 하고 시동물질에 대한 두 개의 결합장소에 의해 결정되는 분절을 증폭시키는 목표가 있다는 것은 공통적이지만 이 기본적인 실험방법을 변형시켜 민감도와 내구성, 신뢰성을 증진시키거나, PCR을 검출 및 특징 규명을 위한 기법들과 결합시켜 적용할 수도 있다.

3. 흔히 사용되는 PCR의 종류

3.1. RT-PCR

Reverse transcriptase (RT)-PCR은 RNA 증폭대상연쇄를 증폭하기 위해 개발되었다. 이 과정에서 RNA 증폭대상연쇄를 RT에 의해 먼저 complementary DNA (cDNA)로 변환시킨 후 PCR로 증폭시킨다. RT-PCR은 RNA virus 감염과 Mycobacterium 균종 검출 및 항생제 치료의 효율을 측정하는데 중요한 역할을 해왔다.

3.2. Nested PCR

1차 PCR 후 증폭된 영역의 안쪽에 결합하는 두 번째 시동물질을 사용하여 재증폭하여 두 번의 PCR 주기를 수행하는 방법이다. 특이도와 민감도가 증가되는 장점이 있으나 1, 2차에 걸쳐 두 번 증폭시키기 때문에 비용과 노력이 증가하고 1차에서 2차로 옮길 때 교차오염될 단점이 있다. 이 단점은 두 증폭 반응액을 밀랍이나 기름층을 사용하여 물리적으로 분리하거나 단일 시험관 증폭법을 이용하면 피할 수 있다[4].

3.3 multiplex PCR

다수의 증폭대상연쇄를 동시에 증폭하는 목적으로 동일한 시험관에 서로 다른 증폭대상연쇄에 특이적인 두 개 이상의 시동물질쌍을 넣어 증폭한다. 한 검체에서 한 개 이상의 증폭대상연쇄를 동시에 증폭할 수 있다. 진단 목적으로 단일 검체에서 다수의 병원균 검출을 위해서, 또는 내부 관리물질의 검출을 위해 사용된다.

3.4. arbitrarily primed PCR (AP-PCR)

일명 무작위 증폭된 다형성 DNA 분석법 [randomly amplified polymorphic DNA assay(RAPD)]이라고도 한다. 임의로 선택된 (arbitrarily chosen), 짧고 단일한 (대개 10-내지 15-base) 시동물질을 사용하여 엄중성이 낮은 조건 (low-stringency condition)에서 유전체 DNA를 증폭한다. 상보적인 가닥들에 시동물질들이 결합한 장소 안쪽으로 둘러싸여진 영역만 증폭된다. AP-PCR의 주된 용도는 다양한 균종들의 균주 구별과 균종들 내에서 다양한 혈청형의 구별 및 동일 혈청형 내의 다양한 아형 감별에 있다. 동일 균종내 두 분리주가 역학적으로 관련되어 있는가를 결정하는데 유용한 AP-PCR은 현재까지 개발된 DNA에 근거를 둔 아형 분석법중 가장 단순한 방법이다. 그러나 이 기법은 thermal cycler가 필요하고 검사간(repro-

ducibility between runs) 및 검사실간(reproducibility among laboratories) 재현성이 의문시되고 있다.

3.5. 광범위 PCR (Broad-range PCR)

계통발생학적인 정보가 풍부한 유전적 증폭대상연쇄 내의 보존된 연쇄 (conserved sequences)를 광범위 PCR하여 감염병의 원인균 진단에 이용할 수 있다. 이 방법으로 자라기 까다롭거나 새로운 균, 잘 배양되지 않는 병원균을 감염된 인간 조직이나 혈액에서 직접 동정할 수 있다. 세균의 16S rRNA 유전자를 겨냥하는 한 쌍의 시동물질을 사용한 광범위 rRNA PCR법은 신속한 세균 동정을 가능하게 한다. rRNA 유전자에 기반을 둔 신속한 세균 동정용 자동화 기기의 개발에 주요한 장애물은 외래 오염 (background contamination)과 검사 비용이다.

4. PCR 검사의 정도관리 및 오염 방지법

다른 모든 검사와 마찬가지로 PCR 검사 역시 오염에 의한 위양성이나 PCR 저해제에 의한 위음성 등 잘못된 결과가 나오는 것을 방지하기 위해 체계적인 정도관리가 필요하다. 먼저 충실한 정도관리계획에 따라 내부정도관리를 하고 외부정도관리 프로그램에도 참여해야 한다. 날마다 해야 할 일의 목록을 만들어 관리하고 일상적인 예방점검 조치를 취하는 등 적절한 운영지침을 세워 정기적인 정도관리 활동을 시행하여야 한다.

PCR 검사는 매우 민감하기 때문에 미량의 오염으로도 위양성 결과를 낼 수 있어 특히 주의해야 한다. PCR 검사에 오염을 일으킬 수 있는 오염원으로 다음과 같은 3가지를 들 수 있다. 첫째, 이전 반응의 증폭 산물로서 이것은 증폭이 잘 되므로 이 오염물질이 우세한 증폭 산물이 될 수 있다. 둘째, 자연에 존재하는 부적절한 증폭대상핵산으로서 예를 들면 한 사람의 DNA 검체에 다른 사람의 DNA 검체가 오염된 것을 들 수 있다. 원치 않는 DNA가 극미량만 있다면 전체 증폭 강도의 일부만 차지하므로 큰 문제는 되지 않을 수도 있다. 셋째, 검체와 검체간에 분무질 형성(aerosolization)에 의해 이월(carryover)되어 오염된 경우이다.

증폭산물이 검사실 공간 내에 축적되는 것을 방지하기 위한 일상적인 예방법으로 다음과 같은 조치를 취한다. 첫째, 주요작업영역을 기능에 따라 1. 시약 제조 및 준비실 2. 검체 처리실 3. PCR반응액 준비실 4. 증폭 후 분석실의 네 영역으로 분리하고 각 기능을 독립된 방에서 독립된 기구를 사용하여 수행하는 것이 좋으나 공간이 부족할 때는 차선책으로 독립된 작업장소 (work station)에서 수행할 수도 있다. 둘째, 시약제조실로부터 시작하여 검체 처리실, PCR 증폭실을 거쳐 분석실에서 끝나는 단일방향 작업흐름도를 밟아 PCR 과정을 진행한다[5]. 셋째, 검체 접수 및 접근경로가 증폭대상연쇄를 가진 균종을 배양하는 영역과 분리되어야 한다. 넷째, 교차오염을

막기 위해 처리된 검체가 시험관이나 기계 내로 장착되면 그 시험관이나 기계가 모든 증폭과 검출과정을 거치게 되며 결코 다시 열리지 않는 밀폐 도관계 (closed-vessel system)를 사용할 수도 있다.

이미 오염이 발생하였을 때 오염을 제거하거나 증폭산물이 다음의 PCR 검사에서 증폭되지 않게 하는 방법으로는 효소 처리법, 단파장 자외선 조사법, Psoralen이나 Isopsoralen 등의 광화학적 교차 결합제(photochemical cross-linkers)를 쓰는 방법, PCR 반응액에 dUTP를 사용해 증산물에 uracil base를 도입한 후 다음의 PCR에 오염된 증폭산물을 Uracil-N-glycosylase (UNG) 효소로 제거하는 방법 등을 쓸 수 있다. 또한 귀중한 검체 DNA가 증폭산물로 오염되지 않도록 모든 중요한 검체는 분주해서 보관하는 것이 강하게 추천된다[6]. 이렇게 주의의 하였더라도 오염된 경우에는 원래의 시동물질쌍이 증폭대상 핵산에 붙는 장소보다 바깥쪽으로 붙는 새 시동물질로 PCR을 할 수 있다. 새 시동물질은 오염된 PCR fragment는 증폭하지 않으니까 과거의 오염에 영향을 받지 않는 결과를 얻을 수 있다.

증폭산물의 분석방법

PCR 증폭 후 증폭산물의 분석방법에는 증폭산물을 gel 전기영동한 후 ethidium bromide 염색하여 관찰하는 방법과 미세역가판 비색법[colorimetric microtiter plate systems], 화학발광법(chemiluminescence), 직접 증폭산물 서열분석법(direct amplification product sequencing) 및 기질 부합법(matrix hybridization) 등이 있다.

미세역가판 비색법은 효소면역검사와 다소 유사한데, 플라스틱 표면에 미리 부착시킨 상보적인 올리고 핵산 포획 탐색자에 의해 미세역가판 반응통(well)에 증폭된 DNA를 포획시킨다. 발색 반응은 효소 접합체(conjugate)와 적절한 기질을 첨가한 후 일어난다.

화학발광 표지자 (chemiluminescence labeling)의 발전은 비동위원소 DNA 탐색자 검사의 민감도를 현저히 증진시켰다[7]. Biotin- 및 digoxigenin-표지된 탐색자 검사법과 효소로 활성화된 화학발광법(enzyme-activated chemiluminescence system)은 최소한 동위원소검사법과 같은 민감도를 보인다. 이들 산물의 반감기가 길고 검출시간이 수 시간이나 수 일이 아닌 수분이라는 점 때문에 검사 소요시간(turnaround time)이 현저히 개선되고 착수비용(start-up cost)이 감소되며 핵산에 근거한 검사를 하는 검사실이 직면해야 하는 많은 규제 등의 장애물이 제거된다. 최근에 개발된 Perkin-Elmer 사의 OPCR system은 전기적으로 시발되는 화학 발광 반응(electrochemiluminescence) 반응을 사용하는데 DNA를 attomole 수준까지 민감하고 재현성있게 측정할 수 있다. 흔히 쓰이는 acridinium ester에 비해 ruthenium bipyridyl 표지자는 아주 안정하여 올리고 핵산 합성 과정중에 이 표지자를 삽입

시킬 수 있다[8]. 특이적인 증폭산물의 초기량을 적분 광량(integrated light) 강도에 의해 정량할 수 있으며 넓은 측정구간에서 직선적 반응을 보이고 자동화하기에 용이할 것으로 기대된다.

직접 증폭산물 서열분석법은 신속, 단순, 정확한 증폭산물 분석법이다. PCR 서열분석법은 PCR과 dideoxynucleotide 연쇄종료법(chain termination method)를 합병하여 미정제된 임상물질로부터 DNA 연쇄를 직접 측정한다[9]. 현재의 서열 분석기법에는 두 가지 접근법이 있다. 첫째, polyacrylamide slab gel이나 유리 모세관에 전기영동하는 법과 둘째, 바탕질 부합법(matrix hybridization)에 의해 고체상 서열분석(solid-phase sequencing)을 하는 방법이다. 직접 증폭산물 서열분석법은 균종을 정확히 동정할 뿐만 아니라 균종의 변이나 분자역학, 약제 내성, 내성 인자 등의 연구분야에서 분석력이 우수한 방법이다.

바탕질 부합법은 고체표면에 수백, 수천개의 합성 올리고핵산 탐색자를 부착한 DNA chip 등을 이용해 검사한다. 특정 표적에 대한 표지된 증폭산물을 탐색자에 부합화하여 바탕질의 여러 장소내에 특이적인 부합 신호를 내게 한다. 부합화 반응에 의해 생성된 양상을 판독하면 증폭산물에 대해 광범한 분석을 할 수 있다. 바탕질 부합법의 장점은 증폭된 연쇄의 복잡한 혼합물을 분석할 수 있는 능력이다. 수백, 수천의 특이한 미생물 표적들에 대한 DNA 탐색자로 된 감염병 chip이나 세균내성 유전자의 알려진 연쇄전체를 포함한 chip을 제작했다고 상상해보자. 한 집락에서 추출한 세균 RNA를 그 chip에 배양시키면 RNA 서열분석이 되는 동시에 RNA level까지 측정할 수 있어 유전자 발현의 차이를 평가할 수 있다. gene chip system의 주된 단점은 chip 제작의 복잡성과 고가의 검사비용이다. 한 chip에 다수의 탐색자가 있는데 저마다 부합화 조건이 다르기 때문에 그들을 함께 맞출 수 있는 적정 조건을 찾아야 한다. 분자생물학적 미생물 진단 검사에서 이러한 chip들을 널리 적용하기 전에 민감도와 특이도, 재현성 등에 대해 주의깊은 수행능 평가가 이루어져야 한다.

분자적 진단법의 결과 판독:

배양검사 및 면역혈청학적 검사(serology) 결과와 분자적 진단법의 결과에 부여하는 의미는 서로 다르다. 배양 검사에 양성으로 나오면 그 균이 생활력(viability)이 있다는 것이 분명하고 혈청학적 검사상 어떤 균에 대한 항체 역가가 증가하면 인체내에서 그 감염에 대한 반응이 있음을 강하게 제시해 준다. 그 반면 핵산 탐색자나 증폭 검사에 양성이면 측정균의 핵산이나 DNA, 또는 RNA가 그 검체 내에 있음을 알 수 있을 뿐 그 균이 죽은 균인지 살아있는 균인지는 알 수 없다. 그러므로 증폭에 근거를 둔 검사는 Mycobacteria 감염의 치료효과를 추적하기 위해 사용될 수 없다. 죽은 균도 증폭될 DNA를 가지고 있으

로 분자적 진단법으로 양성 결과가 나왔다고 해서 특정 검체에 살아있는 균이 있다고 판단할 수는 없다. 결핵환자에서 생활력이 없는 균이 폐 안에서 오랜 기간 온전하게 남아 있으므로 분자적 진단법으로 치료 효과를 평가하는 데는 어려움이 있다.

사균의 문제는 증폭대상연쇄를 DNA 분자로부터 mRNA로 옮기면 극복할 수 있다[10]. mRNA는 rRNA와 DNA보다 더 짧은 반감기를 가지기 때문에 DNA 유무보다는 검체내 균의 생활력을 더 정확하게 반영하는 경향이 있다. 생육 가능한 결핵균을 검출하기 위해 단일 시험관내에서 시행하는 nested RT-PCR 기법이 최근에 보고되어졌다[11]. 검체 처리과정이 더 어렵긴 하지만 항생제 내성을 빨리 측정하는 데에도 반감기가 짧은 mRNA 분자를 대상으로 측정하는 것이 더 빠른 결과를 내줄 수 있다[12].

환자의 검체 내에 어떤 균의 핵산이 나오면 그 균에 의한 질병이 있음을 의미하는가에 대해 살펴볼 때 여러 가지 생각을 해 볼 수 있다. 무균상태가 아닌 장소에서 어떤 균의 핵산이 증폭되었을 때에, 감염, 오염 또는 단순 집락형성(colonization)의 3가지 가능성을 떠올릴 수 있다. 즉, 특정균의 핵산이 검출되면 환자가 해당 균의 유전체를 가지고 있다는 것은 입증되지만, 그 균이 환자에서 질환을 일으켰다는 것을 입증해 준다고 말할 수는 없다. 예를 들면 CSF에서 HSV-1 유전체 검출시 일반적으로 감염되어 활성 질환이 있는 경우가 많으나 원인균인지 아니면 우발적으로 함께 나온 것인지에 대해 감별하기 어렵고, 일차 감염인지 재활성화인지 잘 모르며, 또다른 뇌염 원인균이 있을 가능성도 있다. 이때 그 질환에 합당한 다른 증상들이 함께 있다면 원인균일 가능성이 높다고 볼 수 있을 것이다[13-16]. 이와 같이 여러 가지 가능성이 있기 때문에 임상 상황 및 제반 검사 소견 등을 고려하여 지혜롭게 판단해야 할 것으로 생각된다.

미생물에서 핵산분자를 검출하고 취급하는 검사법은 보통 방법으로는 배양되지 않아서 과거에는 알려지지 않았던 미생물 병원체를 동정하거나 숙주 및 기생 생물간 관계(host parasite relationship)를 연구하는데 중요하다[17]. 균이 배양되지 않는 상황에서는 거의 항상 유전형별법이 미생물을 동정하는 유일한 방법이고 질병과의 연관성이나 인과관계를 판단하기 위한 확실한 방법이다. 특히 검사실에서 배양될 수 없는 균들의 경우 Koch의 가정으로는 인과 관계 여부를 가릴 수 없는 경우가 많아서 판단 기준에 대한 새로운 변형이 시도되어 왔다

Fredricks 등이 핵산연쇄에 근거를 둔 방법으로 동정한 미생물 병원체와 질환간의 인과 관계(causal relationships)를 확립하기 위해 Koch의 가정을 재고하여 제시한 분자적 지침(molecular guideline)은 다음과 같다. 첫째, 추정되는 병원균에 해당하는 핵산연쇄가 감염질환의 대부분의 예에서 있어야만 한다. 미생물의 핵산이 질환이 있다고 알려진 전체적인 해부학적 장소나 기관에 선택적

으로 있고 병변이 없는 기관에는 없어야 한다. 둘째, 병원균에 관련된 핵산연쇄의 copy수가 질환이 없는 숙주나 조직에 없거나 거의 없어야 한다. 셋째, 질환이 회복되면(가령, 임상적으로 효과적인 치료 후) 병원균에 관련된 핵산연쇄의 copy수가 감소되거나 검출되지 않아야 한다. 임상적으로 재발되면 그 반대현상이 일어나야 한다. 넷째, 핵산연쇄가 검출된 이후에 질환 발생이 속발하거나 핵산연쇄 copy 수가 질환이나 병리소견의 중증도와 연관되면 그 핵산연쇄와 질환간의 관련성은 병인적 관계일 가능성이 더 커진다. 다섯째, 확보된 핵산연쇄로부터 추론된 미생물의 성격이 해당 group에 속한 균들의 성격에 합치해야 한다. 핵산연쇄에 근거한 계통발생학적 관계(phylogenetic relationships)에 의해 형질형(phenotypes: 병리학적 소견, 미생물학적 형태, 임상적 특징)을 예견할 수 있다면 그 핵산연쇄의 의미가 더 깊다고 할 수 있다. 여섯째, 세포적 수준에서 조직과 핵산연쇄간 상관성을 찾아 봐야 한다: 미생물 연쇄의 특이적인 in situ hybridization이 조직병변이 있는 영역이나 미생물이 관찰되는 영역, 미생물이 위치해 있다고 추정되는 영역에 나타나는지를 찾아보기 위해 노력해야 한다.

일곱째, 이러한 핵산연쇄에 근거를 둔 형태의 미생물의 인과관계에 대한 증거가 재현성이 있어야 한다[18].

이러한 노력 이외에도 여러 가지 형태의 증거들을 집합적으로 고려하여 인과관계를 평가할 수 있는 기초로 삼는 등 Koch의 가정 대신 새로운 대안들도 제시되고 있다. 일반적으로 “필요조건”과 “필요충분” 조건간에 구별이 필요하다고 본다. 예를 들어 자궁경부암의 90%에서 발병에 Human papilloma virus (HPV)가 필요하지만 대부분의 HPV 감염이 자궁경부암으로 진행하지는 않으므로 HPV가 중요한 보조인자이기는 하지만 그 자체가 자궁경부암의 원인은 아니다. 그러므로 HPV가 자궁경부암의 필요조건이지 필요충분조건은 아니라는 식으로 구별할 수 있다.

분자적 진단의 적용분야와 발전방향

분자적 진단의 현재 적용분야는 배양이 안되거나 서서히 자라는 미생물의 검출, 16S rRNA 유전자 서열분석에 의한 혼치 않은 세균의 동정, 미생물의 아형분석에 의한 예후 판단, 균주 정량에 의한 질병의 경과추적, 항생제 내성 검출을 위한 유전학적 접근 및 돌발감염과 병원감염의 평가에 있다.

분자적 진단법의 향후 발전방향으로는 한 검사로 여러 미생물을 검사하는 방법이 개발되고, 자동화 검사가 발전하며, 감염과 관련된 숙주 요인의 검출 즉 어떤 병원체에 감염될 위험도 및 감염된 후 질환의 진전속도에 영향을 주는 숙주 면역유전적 요인(host immunogenetic factors)에 대한 연구 등이 활성화될 것이 기대되고 있다.

REFERENCES

1. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, et al. *Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model. J Clin Microbiol* 1997;35:995-8.
2. White TJ, Madej R, Persing DH. *The polymerase chain reaction: clinical applications. Adv Clin Chem* 1992;29:161-9.
3. Fanning S and Gibbs R. PCR in genome analysis. In : Birren B, Green ED, et al. eds. *Genome analysis. A laboratory manual. 1st. ed. Cold spring harbor laboratory press, 1997:249-58.*
4. Zimring JC and Nolte FS. Polymerase Chain Reaction and other Amplification Technology. In: Henry JB. ed. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 20th ed. New York: WB Saunders, 2001:1287-9.*
5. McCreedy BJ and Callaway TH. *Laboratory design and work flow. In: Persing DH, Smith TF, et al. eds. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. 1st. ed. Washington, D.C.: American society for microbiology, 1993: 149-59.*
6. Tang YW and Persing DH. *Molecular Detection and Identification of Microorganisms. In : Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1999;215-35.*
7. Girotti S, Musiani M, Ferri E, Gallinella G, Zerbini M, Roda A, et al. *Chemiluminescent immunoperoxidase assay for the dot blot hybridization detection of Parvovirus B19 DNA using a low light imaging device. Anal Biochem* 1996 ;236:290-5.
8. Kenten JH, Casadei J, Link J, Lupold S, Willey J, Powell M, Rees A, Massey R. *Rapid electrochemiluminescence assays of polymerase chain reaction products. Clin Chem* 1991;37:1626-32.
9. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MA. *DNA sequencing with Thermus aquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. Proc Natl Acad Sci USA. 1988;85:9436-40.*
10. Mahbubani MH, Bej AK, Miller RD, Atlas RM, DiCesare JL, Haff LA. *Detection of bacterial mRNA using polymerase chain reaction. Biotechniques* 1991;10:48-9.
11. Jou NT, Yoshimori RB, Mason GR, Louie JS, Liebling MR. *Single-tube, nested, reverse transcriptase PCR for detection of viable Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol* 1997;35:1161-5.
12. Desjardin LE, Perkins MD, Teixeira L, Cave MD, Eisenach KD. *Alkaline decontamination of sputum specimens adversely affects stability of mycobacterial mRNA. J Clin Microbiol* 1996;34:2435-9.
13. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. *Isolation of a cDNA clone derived from a blood - borne non-A, non-B viral hepatitis genome. Science* 1989;244 :359-62.
14. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, et al. *Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. Science* 1993;262:914-7.
15. Relman DA, Schmidt TM, MacDermott RP, Falkow S. *Identification of the uncultured bacillus of Whipple' s disease. N Engl J Med* 1992 Jul 30;327(5):293-301.
16. Tang YW, Espy MJ, Persing DH, Smith TF. *Molecular evidence and clinical significance of herpesvirus coinfection in the central nervous system. J Clin Microbiol* 1997 ;35:2869-72.
17. Falkow S. *Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. J Clin Invest* 1997;100:239-43.
18. Fredericks DN and Relman DA. *Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch' s postulates. Clin Microbiol Rev* 1996;9:18-33.