하기도 감염증의 분자 생물학적 진단

고려의대
김 윤 경

서 론

하기도 감염증은 성인 및 소아에서 가장 흔한 감염병 중의 하나이다. 하기도 감염증의 임상 진단은 신체 검진 및 증상 등으로 명확하게 내려질 수 있으나, 원인 병원체의 규명은 고식적인 방법들의 여러 한계로 인해 대부분의 경우 임상적인 진단에 머물고 있다. 이러한 상황에서 분자생물학적 기법의 발달은 하기도 감염의 원인 병원체를 규명하는 데 큰 도움이 되었고, human metapneumoviruses, coronaviruses NL63, HKU1, human bocavirus 등의 새로운 병원체를 규명해 내기에 이르렀다.

여러 분자 생물학적 기법 중에서 유전자 증폭 기법은 특히 기존의 방법에 비해 여러 가지 장점을 가지고 있어서 가장 활발히 사용되었다. 여러 유전자 증폭 기법 중에서 PCR (또는 RT-PCR)이 가장 많이 오랫동안 사용되어 왔고, 근래에는 Multiplex PCR, real time assay가 실험실적인 사용뿐만 아니라 상업적으로 만들어져 사용되고 있으며, 일부에서는 microarray를 이용한 방법 등을 시도하고 있다.

유전자 증폭 검사

1. 종류

1) Conventional nucleic acid amplication tests (NAATs)
   ① Single target NAATs
   ② Multiplex NAATs
2) Real time NAATs
   ① single target real time NAATs
   ② Multiplex real time NAATs
3) Quantitative tests
4) Microarray

2. 유전자 증폭 검사의 유용성

① 신속하게 결과를 확인할 수 있다.
② 여러 개의 병원체에 대한 검사를 동시에 시행 가능하다.
③ 감염병의 급성기에 원인 병원체를 확인할 수 있다.
④ 민감도가 매우 높아 적은 양의 병원체도 확인 가능하다.
⑤ 사멸했거나 배양이 불가능한 병원체도 확인할 수 있다.
⑥ 항생제 사용 병력 등에 의한 영향을 받지 않는다.
⑦ 좀더 정확한 역학 자료를 제공할 수 있다.

3. 유전자 증폭 검사의 제한점

① 기술적인 어려움
② 고비용
③ 검사의 표준화의 어려움
④ 위양성 및 동시 감염에 대한 해석의 어려움
⑤ 검사 억제제로 인한 위음성 (Apfalter et al, 2005; Templeton et al. 2006 in FOX)

호흡기 감염 원인 병원체의 검출을 위한 유전자 증폭 기법의 적용

1. *Streptococcus pneumoniae*

폐구균은 성인과 소아에서 모두 매우 중요한 호흡기 감염의 원인균이다. 그러나, 하기도감염증이 있는 경우 혈액 배양으로 균이 확인되는 경우가 매우 적고, 상기도의 상재균으로 존재하므로 호흡기 검체에서 배양이 되더라도 상재균과 원인균의 구별이 불가능하다는 단점이 있다. 또한 폐구균 요 항원 검사(pneumococcal urinary antigen test)는 성인에서 일부 그 유용성이 보여지고 있으나, 소아에서의 사용은 매우 제한되어 있어 아직까지는 보편적인 방법으로 사용되지 못하고 있다. 이렇게 배양이나 항원 검사 등의 고식적인 방법들이 효과적으로 사용되지 못하고 있기 때문에, 여러 연구에서 유전자 증폭을 이용하는 방법이 시도되었다.

혈액 배양에서 폐구균이 동정된 폐렴을 기준으로, 혈액 PCR 검사의 민감도는 어른에서는 29-100%, 소아에서 57-100%로 보고되었다(1-11).

폐렴이 없는 환자의 인후 도찰 검체를 대조군으로 하여, 폐렴 환자의 인후 도찰 검체와 가래 검체의 PCR 결과를 비교한 연구의 결과를 보면, 인후 도찰 검체 보다는 가래 검체가 더 민감도가 높은 것으로 밝혀졌다(1). 그러나 인후 도찰 검체의 검사 결과를 보면, 시험군과 대조군의 양성율이 각각 55%와 58%로 두 군간의

차이가 없었고, 인후 도찰에서 양성을 보인 경우 대부분 가래 검사 양성을 보였으므로, 호흡기 검체를 이용한 PCR 검사도 배양 검사와 마찬가지로, 확인된 폐구균이 폐렴을 일으킨 병원균일 가능성보다는 상재균일 가능성이 높다는 것을 보여주었다.

정량적 PCR (quantitative PCR)을 수행하여 균의 양을 가늠할 수 있다면 집락화된 균인 경우 상대적으로 적은 양이 검출되고, 병원균인 경우 많은 양이 검출되게 되므로 구별할 수 있다는 연구가 있었으나 이에 대해서는 좀더 검증이 필요할 것으로 생각된다(12).

흉막액이나 폐흡인액을 검체로 시행된 연구에서는 폐구균에 대한 PCR 검사가 배양보다 더 민감하다는 결과를 보여주었다(13, 14).

폐구균에 대한 또다른 문제점은 현재 사용하는 PCR에 의해 폐구균이 아닌 다른 집락화된 연쇄상 구균에 대해 위양성을 보일 수 있다는 점이다. PCR에 의해 증폭되는 유전자가 폐구균에 고유하다고 생각된 pneumolysin 유전자인데, 최근에는 다른 연쇄상 구균에도 비슷한 유전자가 존재하여 위양성을 보일 수 있다는 것이 밝혀졌다(15). 이러한 단점을 보완하기 위하여 또다른 연구에서는 pneumolysin 유전자를 이용한 PCR에 autolysin 유전자를 이용한 real-time PCR을 보완적으로 사용하여 폐구균과 다른 연쇄상 구균을 구별하기도 하였다(6).

결론적으로 아직까지는 하기도 감염증에서 폐구균에 대한 PCR은 다른 여러 고식적인 방법들이 갖는 제한점을 극복하지 못하고 있어 임상적인 사용이 우선적으로 추천되고 있지는 않는다. 그러나 유전자 증폭법은 향후 정량적 PCR 등 여러 방법들이 발전함에 따라 폐구균으로 인한 하기도 감염의 진단에 도움을 받을 수 있을 것으로 기대되고 있다.

2. *Mycoplasma pneumoniae*

*M. pneumoniae*는 중요한 지역 사회 호흡기 감염의 원인균으로 폐렴 외에도 다양한 질환을 일으킨다. *M. pneumoniae*는 배양 검사에서 매우 느리게 자라고 민감도도 낮아서, 임상적으로 *M. pneumoniae* 감염증의 진단에는 주로 혈청 검사를 사용하고 있다. 그러나 혈청 검사의 여러 단점으로 인해 다른 진단적 검사를 모색하게 되었고, 많은 연구에서 유전자 증폭법을 사용하여 검사의 유용성을 검증하였다. 그 결과 혈청학적 검사의 결과와 호흡기 검체를 이용한 *M. pneumoniae* PCR 의 검사 결과는 좋은 상관 관계를 보여 주었으므로, PCR이 신속하고, 민감하며, 특이성도 높은 것으로 생각되었다.

그러나 항체 반응이 없는 PCR 양성은 집락화된 보균자임을 의미할 수 있는데, 폐렴이 있는 환자에서 PCR 검사만 시행하는 경우 실제 감염과 보균자를 구별하기 어려운 점은 이 검사의 제한점으로 생각되고 있다(16). 대규모 *M. pneumoniae* 유행기에 시행된 연구에 따르면 15%의 환자들이 치료를 시작한 시점에서 2-6주 후에도 여전히 PCR 양성 결과를 보인다는 점은 PCR 단독 검사를 시행하였을 때 해석에 주의해야 한다는 것을 보여주었다(17).

상기도, 하기도 검체 모두 *M. pneumoniae* PCR을 수행하는 데 사용 가능한데, 한 연구에서는 비흡인물에는 PCR 저해제가 더 많이 존재할 수 있어서 인후 도찰 검체가 더 나을 수 있다는 결과를 보여주었다(18).

이러한 몇 가지 제한점에도 불구하고, 인후 도찰 검체를 사용한 PCR 검사는 *mycoplasma pneumonia*의 확진에 가장 좋은 검사 방법이 될 수 있을 것으로 생각되나, 향후 표준화된 검사 방법이 확립되어야 할 것으로 생각되며, 정량적 PCR 등의 검사를 시행한 연구 결과들을 바탕으로 개량된 검사를 수행해야 할 것으로 생각된다. 또한, 기존의 연구에서 보여진 바와 같이 *M. pneumoniae, Chlamydia pneumoniae*와 *Legionella pneumophila* 등을 동시에 검출 가능한 믿음직한 multiplex PCR 등의 방법이 확립된다면 유용할 것으로 생각된다(19, 20).

3. *Legionella* species

Legionella species는 폐렴의 중요한 원인균이나 효율적인 진단 방법의 부재로 진단율이 상대적으로 낮은 질환이다. 이러한 상황에서 분자생물학적인 진단 기법들은 *Legionella* 감염증의 진단에 크게 기여하였고, 최근에는 임상적으로도 사용하게 되었다.

주로 고식적인 PCR이 사용되었는데, 하기도 검체를 사용할 경우 PCR의 민감도는 배양검사보다 높은 것으로 보고되었고, bronchoalveolar lavage 액을 사용한 연구에서 매우 좋은 성적을 제시하기도 하였다(21-23). 그러나 Legionella 폐렴을 앓는 환자의 반 이상이 가래 증상이 없다는 점에서 하기도 검체를 사용하는 데에 어려움이 있게 되었고(24), 이러한 이유로 호흡기 외의 검체를 사용하는 연구들이 진행되게 되었다. 그 결과 Helbig 등은 legionellosis로 확진된 58명의 환자의 소변 검체로 5S rRNA PCR을 시행하여 42명에서 양성 결과를 확인할 수 있었다(25). 혈액을 사용한 PCR도 시도되었는데, Lindsay 등은 5명의 legionellosis 환자의 급성기 및 회복기 혈청에서 모두 Legionella DNA를 검출하는데 성공하였고(26), 54 of 67명의 *L. pneumophila* serogroup 1에 의한 폐렴 환자의 혈청을 검사하여 54명에서 양성 결과를 보고하였다(27). 그러나 다른 연구자들은 PCR 민감도를 30%, 43% 정도로 보고하기도 하여(28), 혈청 검체의 유용성을 판단하기 위해서는 추가적인 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

인후 도찰액을 이용한 연구들도 이루어 졌는데 여섯 명의 legionellosis 환자 중 다섯 명에서 양성 결과를 확인했다는 연구 보고가 있었다(29). Legionellae는 사람의 호흡기에 상재균으로 집락화 하지 않는 병원체이므로, 유전자가 확인되면 원인균으로 생각할 수 있다. 그러나, 일부 상업화된 DNA 추출 kit들이 생산 공정

중에 *Legionella* DNA에 의해 오염될 수 있다는 보고가 있으므로 (30), 이러한 kit를 사용할 경우 위양성 결과를 얻을 수 있다는 것을 주의해야 한다.

결론적으로 가래를 호소하는 환자의 경우에는 PCR이 legionellosis 진단에 가장 적절한 검사로 권장되고 있고, 현재 BD ProbeTec ET *L. pneumophila* (LP) Amplified DNA Assay (Becton Dickinson Biosciences)이 상업화되어 사용되고 있으나, 향후 표준화된 검사법이 개발되어야 할 것으로 생각된다.

4.Chlamydia pneumoniae and Chlamydia psittaci

Clamydia의 진단을 위해 PCR을 이용한 여러 연구들이 수행되었는데, 검사의 민감도와 특이도를 비교할 기준이 될 적절한 방법이 없다는 어려움이 있었다. 그러나 보편적으로 PCR은 최소한 배양법보다는 민감도가 높을 것이라고 생각된다(31). *C. pneumoniae*의 유전자는 상기도, 하기도 검체 모두에서 확인 가능하나, 어느 검체가 검사에 더 효율적인지는 아직까지 확인된 바가 없다. 한 연구에서는 상기도 검체가 더 양성율이 높다고 보고하였으나 (34), 이는 집락화된 균들을 검출한 결과일 수도 있다. 실제로 민감도 높은 PCR 방법을 사용하면서 *C. pneumoniae*를 검출하는 능력은 향상되었으나 임상적으로 얼마나 의미가 있는 것인지 확인하기는 어렵다. 그러므로 PCR 결과는 반드시 환자의 임상 상과 경과 등을 고려해서 해석되어야 하며, 다른 검사 결과들이 참고되어야 한다. *Chlamydia psittaci*를 진단하기 위한 PCR도 시도되고 있으나, 아직까지는 human psittacosis의 진단에 사용되고 있지는 않다.

5. *Haemophilus influenzae*

폐렴을 대상으로 시행된 연구는 매우 적어 그 유용성을 판단하기 어려우나, 폐렴환자를 포함한 소아의 *H. influenzae* 침습성 감염을 연구한 연구에서 혈액 검체로 PCR을 시행한 결과 민감도와 특이도 모두 높은 것으로 보고되었다(35, 36). 소아의 세균성 폐렴 환자의 흉수를 대상으로 배양 검사와 도말 검사 그리고 PCR을 시행하여 각각의 결과를 비교한 연구에서는 PCR 이 가장 민감한 방법으로 보고하였다 그러나, 아직까지 *H. influenzae* 폐렴의 진단에 PCR을 사용하는 것이 확립되어 있지 않다.

6. Pulmonary Mycobactria infection

결핵 관리에 있어 가장 중요한 점은 활동성 결핵의 빠르고 정확한 진단과 적절한 치료라고 하겠다. 그러나 호흡기 검체의 도말, 배양 검사 등은 여러 가지 면에서 빠르고 정확한 진단적 방법이라고 하기에는 미흡하다. 또한 일부 지역에서는 *Mycobacterium avium* 등의 비 결핵성 mycobacteria에 의한 하기도 감염증의 빈도도 증가하고 있어, 빠르고 믿음직한 새로운 진단적 방법이 절실하게 되었다.

초기에는 상업적으로 사용 가능한 DNA 탐색자(DNA probes, AccuProbe, Gen-Probe Inc.) 등과 같이 배양 검사에서 균을 좀더 빠르게 확인하기 위한 보조적인 역할로 분자 생물학적인 방법을 이용하였다. 이러한 방법은 민감도도 특이도도 높아 배양 검사에서 동정까지 걸리는 시간을 의미 있게 줄이는 데 성공하였다. (37). 하지만 탐색자가 모든 mycobacteria 와 결핵균을 탐색 할 수 있는 것은 아니어서, 모든 종류의 mycobacteria를 확인 할 수 있는 PCR을 이용한 염기서열 분석(sequencing)이 여러 실험실에서 선호되고 있으며, 여러 mycobacteria를 동시에 확인 할 수 있는 multiplex PCR 기법도 개발되어 사용되고 있다(38).

그러나 이러한 분자 생물학적인 방법도 수 주일의 시간을 요하는 배양 검체를 대상으로 한다는 점에서 제한점을 가지고 있다.

이런 이유로 호흡기 검체에서 직접 항산균을 검출하고자 하는 노력이 이루어졌는데,

현재까지 총 다섯 개의 상업적인 방법이 개발되었다(39).

1) AMPLICOR MTB assay (Roche Diagnostics)
2) Direct (AMTD2) assay (Gen-Probe, Inc.)
3) the LCx MTB assay (Abbott Laboratories)
4) the BD ProbeTec Direct TB system (Becton Dickinson Biosciences)
5) the INNO-LiPA RIF.TB assay (Innogenetics NV)

이러한 검사들의 특이도는 98% 정도로 매우 높으나, 민감도는 검사 별로 차이가 있으며, 도말 양성인 경우의 민감도가 더 높은 양상을 보인다. 도말 양성인 경우와 음성인 경우의 민감도는 AMPLICOR의 경우 각각 90-100%, 50-72%이었고, AMTD2는 98-100%, 75-83%, LCx assay는 96-100%, 43-56%, BD ProbeTec assay는 99-100%, 33-100%이었다(39). 이러한 민감도의 차이에 의해서 상업적인 직접 검사는 도말 양성인 경우에 주로 사용하도록 권장되고 있다.

비결핵성 mycobacteria 중에서 *M. avium* complex 대한 직접 검사에 대한 연구에 따르면, 배양 검사와 비교했을 때 호흡기 검체를 사용한 PCR 민감도는 79-86%, 특이도 98%정도로 보고되고 있다(40).

7. Pertusis

백일해는 매우 전염력이 높은 질환으로 주로 *Bordetella pertussis*에 의해 발생하며 소아에서는 백신으로 효과적으로 방어할 수 있으나, 추가 면역을 시행하지 않음으로써 성인에서 유행이 보고되고 있다. 배양에 특수 배지를 사용해야 하며 느리게 자라고 민감도가 낮은 이유로 일찍부터 PCR에 의한 진단에 관심이 모아

졌었다. PCR 방법은 배양보다 훨씬 높은 민감도를 보여 주고 있다. 임상적인 증상이 있는 환자에서 PCR 양성은 진단적인 의미가 매우 높다. PCR 양성이면서 백일해 증상이 없는 경우, 무증상 감염 또는 보균자로 생각되기도 한다(41). 백일해의 유행 기 동안 기침을 호소한 소아의 56%에서 백일해 PCR 양성이었으나, 무증상이었던 동급생의 44%에서도 PCR이 양성으로 확인되었다는 연구결과도 있었으므로(42), 장기간 지속된 경우에는 보조적으로 혈청학적인 검사의 사용도 고려해 볼 수 있겠다. 백일해 진단을 위해서는 여러 호흡기 검체 중에서 비흡인물이 가장 효과적으로 알려져 있다.

최근에 여러 유전자를 이용한 PCR 기법이 소개되면서 조만간 상업화된 PCR 방법을 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

8. Common Respiratory Viruses

바이러스는 입원 치료를 요하는 지역사회 폐렴의 주요 원인 병원체로 성인은 30%, 소아의 경우는 70% 정도에 해당된다. 여러 호흡기 바이러스 중에서 Respiratory syncytial virus, Influenza A and B viruses, Parainfluenza viruses, Adenoviruses, human Metapneumovirus 등이 주된 바이러스이다. 이러한 바이러스의 진단에는 주로 바이러스 배양과 항원 검출법 등이 사용되어 왔으나, 시간이 많이 걸리고, 각 바이러스마다 감수성 있는 세포를 사용하여야 하는 등등의 기술상의 어려움이 있고, 민감도가 낮은 단점이 있었다. 이에 PCR 방법이 도입되었고, 바이러스 배양법보다 높은 민감도를 확인하였다(Table 1) (43, 44). 호흡기 바이러스들의 유행기가 서로 겹치는 역학을 고려하여 한번에 여러 바이러스를 검출할 수 있는 multiplex PCR 방법이 활발하게 고안되었고, 최근에는 상업적으로 개발된 multiplex PCR (Hexaplex, Prodesse, Inc.)이 사용되고 있다(45).

현재의 WHO 기준에 따르면 SARS coronavirus 감염에 대한 검사실적 진단은 RT-PCR로 RNA를 확인하는 것, SARS coronavirus에 대한 항체가 상승하는 것, 임상 검체에서 SARS coronavirus를 배양하는 것 등으로 이루어져 있는데, 배양의 경우에는 민감도가 떨어지고 시간이 많이 걸린다는 단점으로 RT-PCR과 항체 검사가 주로 이루어지고 있다. 그러나, 항체 검사는 회복기에 주로 유용하다는 점에서 질병 발생 초기에 사용 가능한 PCR 방법은 매우 유용하다고 하겠다. 이런 면에서 여러 PCR 방법이 시도되었고, 최근에는 연구 결과에 따르면 realtime RT-PCR이 일반적인 기존의 RT-PCR 방법보다 민감도가 높다고 보고 되고 있다.

Table 1. 호흡기 바이러스 검출시 유전자 증폭 기법과 바이러스 배양 및 바이러스 항원 법과의 비교

Virus target	NAAT enhancement (s) compared with antigen or culture procedures
IFV A	Improved sensitivity. Rapid sub-typing and strain analysis available from the same nucleic acid. Faster turn-around than culture. Infectious virus is not amplified (important safety factor compared with culture for pandemic and avian viruses)
IFV B	Improved sensitivity. Faster turn-around than culture
RSV	Improved sensitivity. Faster turn-around than culture.
PIV 1−3	Improved sensitivity. Faster turn-around than culture.
PIV 4	Not detectable routinely except by NAT
hMPV	Improved sensitivity. Faster turn-around than culture.
hBoV	Not detectable routinely except by NAT.
ADV	Improved sensitivity compared with antigen detection. Faster turn-around than culture
Picornaviruses	Some picornaviruses are only detectable routinely by NAT. Faster turn-around and better sensitivity for culturable rhinoviruses and enteroviruses
Coronaviruses	Some coronaviruses are only detectable routinely by NAT (NL63, HKU1). Faster turn-around and better sensitivity for culturable viruses (229E, OC43, SARS coronavirus). Infectious virus is not amplified (important safety factor compared with culture for SARS).

Julie D. Fox, J Clin Virol (56)

9. *Pneumocystis jiroveci (Pneumocystis carinii)*

PCR은 cytological 방법보다 민감도가 높고 특이도도 높으나, PCP를 의심할 임상 소견이 별로 없는 환자에서도 양성 소견을 보인다는 점에서 일부 환자들에게 집락화되어 검출 가능한 것으로 생각되고 있다(46-48). 이러한 결과는 nested PCR을 시행했을 때 더 높았고, 특히 HIV감염이 없는 환자의 경우에 높았다(48). Quantitative PCR을 시행하면 집락화된 경우와 실제 병원균으로 작용한 경우를 구별하는 데 도움이 된다고 보고한 연구가 있었으나 향후 이에 대한 검증이 필요할 것으로 생각된다(49). HIV감염이 있는 환자의 경우에 검사에 적합한 검체는 bronchoalveolar lavage 나 induced sputum 이고, 구강 세척액도 사용 가능하나 하기도 검체에 비해 민감도는 좀 낮다(50, 51). PCR 은 PCP가 임상적으로 의심되는 환자에서 cytological 검사에서는 음성으로 나온 경우에 사용해 볼 수 있겠다.

10. Array based procedures

Mcroarray 기법이 도입되면서 병원균의 검출에도 이러한 방법을 적용하는 연구가 시도되었다. Palacios 등은 임상 검체를 사용하여 비특이적으로 증폭된 PCR 산물을 이용해 solid-phase microarray hybridization 을 시행한 연구 결과 배양법 또는 일반적인 PCR 방법과 유사한 정도의 결과를 확인할 수 있었다(52). Lin 등은 re-sequencing arrays를 시행하여 26개의 호흡기 감염 병원체에 대한 57개의 유전자를 성공적으로 확인하였다(53). 또 다른 연구에서는 인플루엔자 A에 대해 한번의 반응으로 인플루엔자 확진과 동시에 typing을 성공적으로 수행한 보고도 있었고(54), 인플루엔자 바이러스의 유전적 변이를 re-sequencing arrays로 확인하여 백신의 개발에 도움을 주는 연구도 보고되었다(55). 아직까지는 시도하는 단계이나, 호흡기 감염증의 특성상 실험실적인 진단과 각 병원체의 역학에 대한 정확한 이해를 위해서는 다양한 병원체를 동시에 확인할 수 있는 방법이 매우 필요하다는 점에서 향후 큰 기여를 기대해 볼 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1) Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, Laing RTR, et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. J Clin Microbiol 2003;41:63-6.
2) Falguera M, Sacristan O, Nogues A, Ruiz-Gonzalez A, Garcia M, Manonelles A, et al. Nonsevere community-acquired pneumonia: correlation between cause and severity or comorbidity. Arch Intern Med 2001;161:1866-72.
3) Menendez R, Cordoba J, de La Cuadra P, Cremades MJ, Lopez-Hontagas JL, Salavert M, et al. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 1999;159:1868-73.
4) Rudolph KM, Parkinson AJ, Black CM, Mayer LW. Evaluation of polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia. J Clin Microbiol 1993;31:2661-6.
5) Sheppard CL, Harrison TG, Kearns AM, Guiver M, Creek M, Evans R, et al. Diagnosis of invasive pneumococcal infections by PCR amplification of *Streptococcus pneumoniae* genomic fragments in blood: a multi-centre comparative study. Commun Dis Publ Health 2003;6:221-7.
6) Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, Hogan A, George RC. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. J Med Microbiol 2004;53:189-95.
7) Butler JC, Bosshardt SC, Phelan M, Moroney SM, Tondella ML, Farley MM, et al. Classical and latent class analysis evaluation of sputum polymerase chain reaction and urine antigen testing for diagnosis of pneumococcal pneumonia in adults. J Infect Dis 2003;187:1416-23.
8) Salo P, Ortqvist A, Leinonen M. Diagnosis of bacteremic pneumococcal pneumonia by amplification of pneumolysin gene fragment in serum. J Infect Dis 1995;171:479-82.
9) Dagan R, Shriker O, Hazan I, Leibovitz E, Greenberg D, Schlaeffer F, et al. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:669-73.
10) Isaacman DJ, Zhang Y, Reynolds EA, Ehrlich GD. Accuracy of a polymerase chain reactionbased assay for detection of pneumococcal bacteremia in children. Pediatrics 1998;101:813-6.
11) Michelow IC, Lozano J, Olsen K, Goto C, Rollins NK, Ghaffar F, et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing, and urinary antigen detection. Clin Infect Dis 2002;34:E1-11.
12) Greiner O, Day PJR, Bosshard PP, Imeri F, Altwegg M, Nadal D. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. J Clin Microbiol 2001;39:3129-34.
13) Falguera M, Lo'pez A, Nogue's A, Porcel JM, Rubio-Caballero M. Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples. Chest 2002;122:2212-6.
14) Scott JAG, Marston EL, Hall AJ, Marsh K. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by psaA PCR analysis of lung aspirates from adult patients in Kenya. J Clin Microbiol 2003;41:2554-9.
15) Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, Broughton K,WoodardG, SturgeonD, et al. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, Streptococcus oralis, and Streptococcus mitis: characterization of 'atypical' pneumococci and organisms allied to

S. mitis harboring *S. pneumoniae* virulence factorencoding genes. Infect Immun 2000;68:1374-82.
16) Gnarpe J, Lundbäck A, Sundelöf B, Gnarpe H. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in subjectively healthy individuals. Scand J Infect Dis 1992;24:161-4.
17) Waring AL, Halse TA, Csiza CK, Carlyn CJ, Musser KA, Limberger RJ. Development of a genomics-based PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York state. J Clin Microbiol 2001;39: 1385-90.
18) Reznikov M, Blackmore TK, Finlay-Jones JJ, Gordon DL. Comparison of nasopharyngeal aspirates and throat swab specimens in a polymerase chain reaction based test for *Mycoplasma pneumoniae*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995;14:58-61.
19) Welti M, Jaton K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. Diagn Microbiol Infect Dis 2003;45:85-95.
20) Miyashita N, Saito A, Kohno S, Yamaguchi K, Watanabe A, Oda H, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community-acquired pneumonia. Respir Med 2004;98:542-50.
21) Jaulhac B, Nowicki M, Bornstein N, Meunier O, Prevost G, Piemont Y, et al. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. J Clin Microbiol 1992;30:920-4.
22) Kessler HH, Reinthaler FF, Pschaid A, Pierer K, Kleinhappl B, Eber E, et al. Rapid detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavage fluids with the EnviroAmp *Legionella* PCR amplification and detection kit. J Clin Microbiol 1993;31:3325-8.
23) Matsiota-Bernard P, Pitsouni E, Legakis N, Nauciel C. Evaluation of commercial amplification kit for detection of *Legionella pneumophila* in clinical specimens. J Clin Microbiol 1994;32:1503-5.
24) Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. Clin Infect Dis 2003;36:64-9.
25) Helbig JH, Engelstädter T, Maiwald M, Uldum SA, Witzleb W, Lück PC. Diagnostic relevance of the detection of *Legionella* DNA in urine samples by the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:716-22.
26) Lindsay DS, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of *mip* gene by PCR for diagnosis of Legionnaires' disease. J Clin Microbiol 1994;32:3068-9.
27) Lindsay DSJ, Abraham WH, Findlay W, Christie P, Johnston F, Edwards GFS. Laboratory diagnosis of legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods. J Med Microbiol 2004;53:183-7.
28) Murdoch DR, Walford EJ, Jennings LC, Light GJ, Schousboe MI, Chereshsky AY, et al. Use of the polymerase chain reaction to detect *Legionella* DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia. Clin Infect Dis 1996; 23:475-80.
29) Ramirez JA, Ahkee S, Tolentino A, Miller RD, Summersgill JT. Diagnosis of Legionella pneumophila, *Mycoplasma pneumoniae*, or Chlamydia pneumoniae lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 24:7-14.
30) van der Zee A, Peeters M, de Jong C, Verbakel H, Crielaard JW, Claas ECJ, et al. Qiagen DNA extraction kits for sample preparation for Legionella PCR are not suitable for diagnostic purposes. J Clin Microbiol 2002;40:1126.
31) Boman J, Gaydos CA, Quinn TC. Molecular diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection. J Clin Microbiol 1999;37: 3791-9.
34) Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Casteren SC, Joulandan SA, Snijder RJ, van den Bosch JM, et al. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. J Clin Microbiol 1998;36: 2301-7.
35) Hassan-King M, Baldeh I, Adegbola R, Omosigho C, Usen SO, Oparaugo A, et al. Detection of *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* SNA in blood culture by a single PCR assay. J Clin Microbiol 1996;34:2030-2.
36) Hassan-King M, Adegbola R, Baldeh I, Mulholland K, Omosigho C, Oparaugo A, et al. A polymerase chain reaction for the diagnosis of Haemophilus influenzae type b disease in children and its evaluation during a vaccine trial. Ped Infect Dis J 1998;17:309-12.
37) Goto M, Oka S, Okuzumi K, Kimura S, Shimada K. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. J Clin Microbiol 1991;29:2473-6.
38) Kurabachew M, Enger Ø, Sandaa RA, Skuce R, Bjorvatn B. A multiplex polymerase chain reaction assay for genus-, group- and species-specific detection of mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2004;49:99-104.
39) Piersimoni C, Scarparo C. Relevance of commercial amplification methods for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical samples. J Clin Microbiol 2003;41:5355-65.
40) Ichiyama S, Ito Y, Sugiura F, Iinuma Y, Yamori S, Shimojima M, et al. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. J Clin Microbiol 1997;35:3082-5.
41) Lind-Brandberg L, Welinder-Olsson C, Lagergard T, Taranger J, Trollfors B, Zackrisson G. Evaluation of PCR for diagnosis of *Bordetella pertussis* and *Bordetella para-*

pertussis infections. J Clin Microbiol 1998;36:679-83.
42) He Q, Mertsola J, Soini H, Skurnik M, Ruuskanen O, Viljanen MK. Comparison of polymerase chain reaction with culture and enzyme immunoassay for diagnosis of pertussis. J Clin Microbiol 1993;31:642-5.
43) Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. J Infect Dis 2004;189:706-10.
44) Smith AB, Mock V, Melear R, Colarusso P, Willis DE. Rapid detection of influenza A and B viruses in clinical specimens by Light Cycler real time RT-PCR. J Clin Virol 2003;28:51-8.
45) Hindiyeh M, Hillyard DR, Carroll KC. Evaluation of the Prodesse Hexaplex multiplex PCR assay for direct detection of seven respiratory viruses in clinical specimens. Am J Clin Pathol 2001;116:218-24.
46) Leibovitz E, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K, et al. Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 1995;33:3004-7.
47) Weig M, Klinker H, Bögner BH, Meier A, Gross U. Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. J Clin Microbiol 1997;35:1445-9
48) Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Rüssmann H, TybusK, Pfaff F, et al. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. J Clin Microbiol 2000;38:1461-7.
49) Larsen HH, Masur H, Kovacs J, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, et al. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Clin Microbiol 2002;40:490-4.
50) Atzori C, Agostoni F, Angeli E, Mainini A, Orlando G, Cargnel A. Combined use of blood and oropharyngeal samples for noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia using the polymerase chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998;17:241-6.
51) Matos O, Costa MC, Lundgren B, Caldeira L, Aguiar P, Antunes F. Effect of oral washes on the diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:573-5.
52) Palacios G, Quan P-L, Jabado OL, Conlan S, Hirschberg DL, Liu Y, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. Emerg Infect Dis 2007; 13:73-81.
53) Lin B, Blaney KM, Malanoski AP, Ligler AG, Schnur JM, Metzgar D, et al. Using a resequencing microarray as a multiple respiratory pathogen detection assay. J Clin Microbiol 2007;45:443-52.
54) Kessler N, Ferraris O, Palmer K, Marsh W, Steel A. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. J Clin Microbiol 2004;42:2173-85.
55) Wang Z, Daum LT, Vora GJ, Metzgar D, Walter EA, Canas LC, et al. Identifying influenza viruses with resequencing microarrays. Emerg Infect Dis 2006;12:638-46.
56) Julie D. Fox. Nucleic acid amplification tests for detection of respiratory viruses. J Clin Virol 2007;s15-s25.
57) David R. M. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. APMIS 2004;112:713-27
58) Margareta I. Currently used nucleic acid amplification tests for the detection of viruses and atypicals in acute respiratory infections. J Clin Virol 2007;259-276