



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](#)

2015年 8月
博士學位 論文

Clinical Usefulness of
16S ribosomal RNA gene Real-time PCR
for Diagnosis of Scrub typhus

朝鮮大學校 大學院

醫學科

尹 納 拉

Clinical Usefulness of
16S ribosomal RNA gene Real-time PCR
for Diagnosis of Scrub typhus

2015 年 8 月 25 日

朝鮮大學校 大學院

醫學科

尹 나 라

Clinical Usefulness of
16S ribosomal RNA gene Real-time PCR
for Diagnosis of Scrub typhus

지도교수 김동민

이 論文을 醫學博士學位 申請論文으로 提出함

2015 年 4 月

朝鮮大學校 大學院

醫學科

尹 나 라

尹 나 라 의 博 士 學 位 論 文 을 認 准 함

委員長	朝鮮大學校 教授	<u>임 성 철</u> 印
委 員	朝南大學校 教授	<u>장 속 진</u> 印
委 員	朝鮮大學校 教授	<u>박 치 영</u> 印
委 員	朝鮮 大學校 教授	<u>김 동 민</u> 印
委 員	朝鮮 大學校 教授	<u>김 춘 미</u> 印

2015 年 6 月 26 日

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	i
I. 서론	1
II. 연구방법	3
III. 연구결과	10
IV. 고찰	19
참고문헌	21

LIST OF TABLES

Table 1. Primers and Probe used in this study -----	7
Table 2. Positivity rates of 4 PCR methods according to severity grades in all 148 patients -----	12
Table 3. Positivity rates of 4 PCR methods according to severity grades in 112 patients without previously antibiotics treatment-	13
Table 4. Mean of copy number in 16S rRNA Q-PCR and 47-kDa Q-PCR according to severity grades into four levels----	14
Table 5. Mean of copy number in 16S rRNA Q-PCR and 47-kDa Q-PCR according to severity grades into two levels-----	15
Table 6. Mean of copy number in 16S rRNA Q-PCR and 47-kDa Q-PCR according to complications-----	15

Table 7. Correlation between laboratory findings and copy value
of 47-kDa Q-PCR and 16S rRNA Q-PCR -----16

LIST OF FIGURES

Figure 1. Diagram of primer position in the *Orientia*

tsutsugamushi ----- 8

a. 16s rRNA

b. 47kDa protein gene

c. 56kDa protein gene

Figure 2. Sensitivities of 4 PCR methods in three groups : all

patients, patients without previously antibiotics treatment, with

previously antibitoics treatment ----- 10

Figure 3. Number of positive patients of 4 PCR methods

according to days for antibiotics treatment in 36 patients with

previously antibiotics treatment ----- 11

Figure 4. Positivity percentages of 47kDa Q-PCR and 16s rRNA

Q-PCR according to durations of symptom manifestation----- 17

ABSTRACT

Clinical Usefulness of 16S ribosomal RNA Real-time PCR for Rapid Diagnosis of Scrub typhus

Na Ra Yun

Advisor: Prof. Dong-Min Kim, M.D., PhD.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

Scrub typhus is a major acute febrile disease in Asia-pacific region caused by *Orientia tsutsugamushi*. Delays in diagnosis can cause fatal complications, so a rapid and early diagnosis is indispensable for successful treatment. For this reason, a polymerase chain reaction (PCR) based method was developed to detect a specific *O. tsutsugamushi* gene in a patient's blood. Real-time PCR(Q-PCR) has the advantages of high speed, sensitivity, suggesting the utility of this technique for the early diagnosis of scrub typhus.

We evaluated the clinical usefulness of the real-time quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) targeting of 16S ribosomal RNA (16S rRNA) gene. We examined blood specimens from 148 adult patients confirmed to have scrub typhus from September 2008 to December 2009. Among 148 scrub typhus patients, Before admission, 36 patients were treated by antibiotics, and 112 patients were not treated by antibiotics. To evaluate the clinical usefulness of 16S rRNA Q-PCR, we compared its diagnostic accuracy to that of the following methods: nested PCR(N-PCR) targeting the 56-kDa gene, Q-PCR targeting the 47-kDa gene, and conventional PCR(C-PCR) targeting 16S rRNA gene.

16S rRNA Q-PCR detected *O. tsutsugamushi* infection with a sensitivity of 91.9%, and 56-kDa N-PCR, 47-kDa Q-PCR, 16s rRNA C-PCR showed lower sensitivities of 81.1%, 74.3%, and 87.8% in all 148 patients. And 16S rRNA Q-PCR showed a sensitivity of 99.1% in 112 patients without antibiotics treatment before admission.

In conclusion, 16S rRNA Q-PCR is clinically useful for rapid diagnosis of scrub typhus and more accurate than 56-kDa N-PCR, 47-kDa Q-PCR, and 16S C-PCR.

Key Words : Scrub typhus, Diagnosis, polymerase chain reaction, 16S ribosomal RNA gene

서 론

쯔쯔가무시병은 우리나라를 비롯한 아시아에서 가을철에 가장 흔하게 발생하는 급성 열성 질환으로 *Orientia tsutsugamushi* 에 감염된 trombiculid 진드기에 물리면서 발생한다(1,2). 매개하는 진드기에 물린 후 1-2주 이내에 발열, 오한, 두통, 근육통, 발진등의 증상이 발생하고 진드기에 물린 자리에 가피가 특징적으로 관찰된다. 쯔쯔가무시병은 대부분 임상 증상이 경미하고 항생제 치료에 좋은 반응을 보이나, 진단이 늦어지는 경우에는 간질성 폐렴, 급성 신부전, 뇌수막염, 위장관 출혈 등의 심각한 여러가지 합병증이 발생할 수 있고 다장기 부전과 사망에 이르기에도 한다(1). 그래서 성공적인 치료를 위해서는 쯔쯔가무시병에 대한 신속한 진단이 매우 중요하다. 간접면역형광검사(indirect immunofluorescence assay, IFA), 면역과산화효소 검사 (immunoperoxidase test), 효소면역측정법 (enzyme-linked immunosorbent assay), 피동성 적혈구응집시험 (passive hemagglutination test) 등의 혈청학적 검사법들이 쯔쯔가무시병의 진단에 이용되어왔는데 이들은 질병 초기에는 항체 생성이 낮아 낮은 민감도를 보이고 회복기에 다시 검사를 시행해야 확진을 할 수 있다는 단점이 있어 임상적 유용성이 낮다(3,4). 그래서 발병 초기에 진단할 수 있는 진단법의 필요성이 대두되었고 쯔쯔가무시병 환자의 혈액 내의 *O. tsutsugamushi*의 특이 유전자를 이용한 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)이 쯔쯔가무시병의 진단법으로 연구가 되어 특이 유전자들에 대한 Conventional PCR (C-PCR), Nested PCR (N-PCR), Real-time PCR (Q-PCR) 등이 진단에 유용한 검사법으로 알려져 있다(5,6). 특히 Q-PCR 은 C-PCR, N-PCR에 비하여 더 빨리 검사결과를 확인할 수 있고, 높은 민감도와 특이도를 보이며, 정량화할 수 있다는 장점이 있다(7). 쯔쯔가무시병의 진단을 위한 PCR 검사에서 56-kDa 유전자, 47-kDa 유전자들이 특이 유전자로 사용이 되었고, 16S 리보솜RNA (16S ribosomal RNA, 16S rRNA) 유전자는 약 1,550 bp 의 긴 길이로 세균동정을 위하여 많이 쓰이는데, 쯔쯔가무시병의 진단을 위해서 16S rRNA 유전자를 이용한 C-PCR 의 임상적 유용성이 연구된 바 있다(5,6).

이 연구의 목적은 쯔쯔가무시병의 진단에서 16S ribosomal RNA에 대한 real-time PCR(16S rRNA Q-PCR)의 임상적 유용성을 이전에 쯔쯔가무시병의 진

단에 유용하다고 알려진 다른 검사법들과 비교하여 알아보는 것으로, 56-kDa 유전자에 대한 nested PCR(56-kDa N-PCR), 47-kDa 유전자에 대한 real time PCR(47-kDa Q-PCR), 16S rRNA 유전자에 대한 conventional PCR(16S rRNA Q-PCR) 과 비교하여 16S rRNA Q-PCR의 임상적 유용성을 알아보하고자 한다. 쯔쯔가무시병으로 진단된 전체 환자에 대한 4가지 검사의 민감도를 비교하고, 항생제 투여 여부에 따라, 환자의 중증도에 따라 검사법이 어떻게 영향을 받는지 알아보하고자 한다. 그리고 real-time PCR의 장점인 정량화를 할 수 있다는 점을 고려하여 copy 수가 쯔쯔가무시병의 중증도나 합병증, 검사결과등과 연관성이 있는지 확인하여 실제 임상에서 16S rRNA Q-PCR의 유용성을 알아보하고자 한다.

연구 방법

1. 환자 (patients selection)

2008년 9월부터 2009년 12월까지 조선대병원에서 찌꺼기무시병으로 확진된 148명의 18세 이상의 환자의 혈액을 이용하여 검사를 시행하였다. 간접면역형광검사(IFA) IgM 이나 IgG의 역가가 4배 이상 상승한 환자를 확진으로 정의하였다. 이 연구는 조선대병원 내 기관생명윤리위원회에서 승인을 받았다.

2. 용어 정의 (Definitions)

내원 전 doxycycline, rifampin, azithromycin, ciprofloxacin, levofloxacin 을 투여 받은 환자는 항생제를 투여 받은 환자로 정의하였고 아무런 항생제를 투여 받지 않았거나 베타락탐이나 아미노글리코사이드 등의 찌꺼기무시병에 효과가 입증되지 않은 항생제를 투여 받은 환자는 항생제를 투여 받지 않은 환자로 정의하였다. 중증도(severity)는 중환자실 입원 여부, 간 손상(alanine aminotransferase > 100 U/L), 폐 손상(동맥혈 산소포화도 < 70 mmHg), 신부전(creatinine \geq 1.8mg/dL), 혈액학적 이상(혈소판 < 120,000/uL), 신경학적 이상(착란, confusion) 여부를 확인하여 한 가지 항목에 1점씩 점수를 매겨 중증도를 산정하였다(8). 해당하는 항목의 개수에 따라 0점은 중증도 0, 1점은 중증도 1, 2점은 중증도 2, 3점 이상은 중증도 3으로 4단계로 나누었고, 2단계로는 중증도 0,1 을 경증 그룹(mild group), 중증도 2,3을 중증 그룹(severe group)으로 분류하였다. 증상발현일(duration of symptom)은 내원 전 발열, 오한, 근육통 등의 찌꺼기무시병을 의심할 수 있는 증상이 발생한 후 조선대학교병원에 내원할 때까지의 경과 일수를 의미한다.

3. 중합효소 연쇄반응 검사 (polymerase chain reaction, PCR)

1)16S rRNA gene PCR

(1) *O. tsutsugamushi* 16S rRNA gene의 클로닝(cloning)

O. tsutsugamushi Karp strain 16S rRNA gene sequence (accession no. D38623)를 대상으로 클로닝을 위한 primers를 디자인하였다(Table1). 먼저 *O. tsutsugamushi* Karp strain DNA를 대상으로 PCR을 다음과 같이 시행하였다. AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l 에, 2 μ l GC Enhancer, 2 μ l DNA, 1 μ l (10 pmol/ μ l)의 각 primer, 그리고 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μ l의 반응액을 만들어 Applied Biosystems Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 2분, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 59 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초로 36 cycles 진행하고, 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 연장시켰다. PCR product를 1.2% agarose gel (SeaKem LE agarose)에 전기영동 하여 확인 후, QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR product(target DNA)를 pGEM-T easy vector (promega)에 ligation하고 E.coli DH5 α 에 transformation하였다. Plasmid DNA 추출 후 제한효소 처리하여 클로닝을 확인하였으며, 염기서열분석을 수행하였다. 클로닝이 확인된 plasmid DNA는 spectrophotometer (DU 530 Life Science UV/visible spectrometer; Beckman Coulter)를 사용하여 정량하였으며 108copies/ μ l가 되도록 준비하였다.

(2) Real-time PCR

Primers와 probe는 *O. tsutsugamushi* Gilliam strain (accession no. L36222)의 16S rRNA sequence를 대상으로 디자인하였다. Probe의 경우, 5' end에 6-carboxyfluorescein (FAM)을 붙였으며 3' end에 black hole quencher 1 (BHQ-1)을 붙였다 (Table1, Figure1).

Standard curve는 108copies/ μ l의 *O. tsutsugamushi* 16S rRNA 유전자의 partial DNA 단편을 클로닝한 plasmid DNA를 10-fold serial dilutions하여 확인하였다. 5 μ l DNA, 1 μ l (5 pmol/ μ l)의 각 primer, 1 μ l (2 pmol/ μ l)의 probe, 그리고 4 μ l의 5X master mix (reaction buffer, Fast Start Taq DNA polymerase, MgCl₂와 deoxynucleoside triphosphates [with dUTP instead of dTTP]), 멸균

된 3차 증류수를 넣어 총 20 μ l의 반응액을 만들어 Q-PCR을 수행하였다. PCR 수행조건은 95°C 에서 10분 동안 초기반응을 시키고, 95°C 에서 10초 60°C 에서 30초의 2 step을 45 cycles로 반응시키고, 마지막 cooling을 위해 40°C 에서 30초 반응시켰다. Q-PCR의 결과는 LightCycler software 4.0 (Roche, Basel, Switzerland)을 사용하여 분석하였다. Crossing point 가 38 이하인 경우를 양성으로 간주하였다.

(3) Conventional PCR

Primers ot-16sRF1, ot-16sRR1를 이용하여 PCR을 진행하였다(Table1). AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l 에, 2 μ l GC Enhancer, 2 μ l DNA, 1 μ l (10 pmol/ μ l)의 각 primer, 그리고 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μ l의 반응액을 만들어 Applied Biosystems Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 94°C에서 2분, 94°C에서 1분, 57°C에서 30초, 72°C에서 45초로 36 cycles 진행하고, 72°C에서 10분 동안 연장시켰다. PCR product를 1.2% agarose gel (SeaKem LE agarose)에 전기영동을 하여 확인하였다.

2) 47-kDa real-time PCR

(1) *O. tsutsugamushi* 47-kDa gene 의 클로닝(cloning)

O. tsutsugamushi Karp strain 을 대상으로 47-kDa protein gene을 증폭시켰다. AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Applied Biosystems) 10 μ l 에, 2 μ l GC Enhancer, 2 μ l DNA, 1 μ l (10 pmol/ μ l)의 각 primer, 그리고 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μ l의 반응액을 만들어 Applied Biosystems Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용 PCR을 수행하였으며, PCR조건은 94°C에서 5분, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 39 cycles 진행하고, 72°C에서 10분 동안 연장시켰다. PCR product를 1.2% agarose gel (SeaKem LE agarose)에 전기영동 하여 확인 후, QIAquick gel

extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR product(target DNA)를 pGEM-T easy vector (promega)에 ligation하고 E.coli DH5α에 transformation하였다. Plasmid DNA 추출 후 제한효소 처리하여 클로닝을 확인하였으며, 염기서열분석을 수행하였다. 클로닝이 확인된 plasmid DNA는 spectrophotometer (DU 530 Life Science UV/visible spectrometer; Beckman Coulter)를 사용하여 정량하였으며 108copies/μl가 되도록 준비하였다.

(2) Real-time PCR

Probe OtsuPR665 와 primers OtsuFP630, OtsuRP747 은 Jiang et al. 의 것을 사용하였다(9). Probe의 경우, 5' end에 6-carboxyfluorescein (FAM)을 붙였으며 3' end에 black hole quencher 1 (BHQ-1)을 붙였다 ((Table1, Figure1)(5,9).

Standard curve는 108copies/μl의 *O. tsutsugamushi* 47-kDa 유전자의 partial DNA 단편을 클로닝한 plasmid DNA를 10-fold serial dilutions하여 확인하였다. 5 μl DNA, 1 μl (5 pmol/μl)의 각 primer, 1 μl (2 pmol/μl)의 probe, 그리고 4 μl의 5X master mix (reaction buffer, Fast Start Taq DNA polymerase, MgCl₂ and deoxynucleoside triphosphates [with dUTP instead of dTTP]), 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μl의 반응액을 만들어, Q-PCR을 수행하였다. PCR 수행조건은 95°C 에서 10분 동안 초기반응을 시키고, 95°C 에서 10초, 60°C 에서 30초의 2 step을 45 cycles로 반응시키고, 마지막 cooling을 위해 40°C 에서 30초 반응시켰다. Q-PCR의 결과는 LightCycler software 4.0 (Roche, Basel, Switzerland)을 사용하여 분석하였다. Crossing point 가 38 이하인 경우를 양성으로 간주하였다.

3) 56-kDa nested PCR

Primers는 *O. tsutsugamushi* Gilliam strain의 56-kDa protein gene을 대상으로 만들어진 Furuya et al. 의 것을 사용하였다(Table1, Figure1)(10)

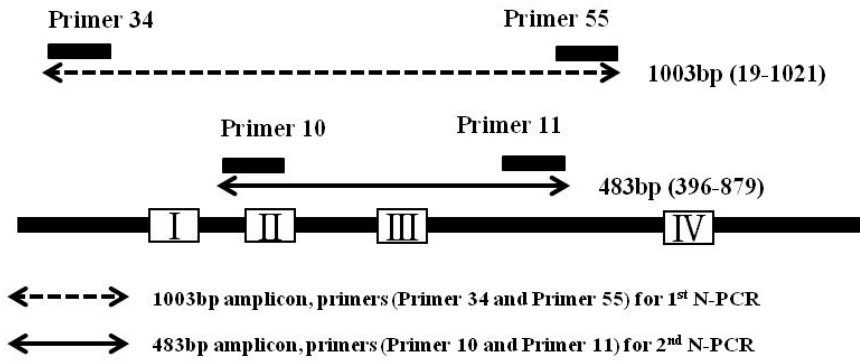
1stPCR의 경우, AccuPowerRPCRPreMix(1UTaq DNA polymerase, 250 μM Each dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 30 mM KCl, 1.5 mM

MgCl₂, Stabilizer and tracking dye)에, 2 μ l DNA, 1 μ l (5 pmol/ μ l)의 각 primer, 그리고 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μ l의 반응액을 만들어, Applied Biosystems Veriti 96-well thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용 PCR을 수행하였으며, PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 10분, 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 61 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 35 cycles 진행하고, 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 연장시켰다. N-PCR은 1st PCR product를 template로 사용하였으며, 5 pmol/ μ l의 각 primer를 넣어 반응시켰으며, 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 10분, 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 63 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 30 cycles 진행하고, 72 $^{\circ}$ C에서 7분 동안 연장시켰다. PCR product를 1.2% agarose gel (SeaKem LE agarose)에 전기영동 하여 확인하였다(11).

Table 1. Primers and Probe used in this study

Gene	name	Sequence (5' - 3')	Product size (bp)	PCR
16S rRNA	ot-16sRF1	AGGGATGATAATGACAGTACCTACAG	199	Q-PCR C-PCR
16S rRNA	ot-16sRR1	CCTCTACCATACTCTAGCCTAACAG		
16S rRNA	ot-16sRprobe	6-FAM -CTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC-BHQ-1	probe	Q-PCR
16S rRNA	CK-ST-16s rRF	AACGAACGCTGGCGGCATG	1460	cloning
16S rRNA	CK-ST-16s rRR	GCAGGTTCCCCTACGGCTACC		
47kDa	OtsuFPS622	GAAGTGTCTTAGGTTCTGGGGTTATC	622	cloning
47kDa	OtsuRPS622	CTTTTATAACTTCAGTTATTAGAACTC		
47kDa	otsuF630	AACTGATTTTATTCAAATAATGCTGCT	118	Q-PCR
47kDa	otsuR747	TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT		
47kDa	otsuP665	TGGGTAGCTTTGGTGGACCGATGTTTAACTCT	probe	Q-PCR
56kDa	P1(primer34)	TCAAGCTTATTGCTAGTGCAATGTCTGC	1003	1 st N-PCR
56kDa	P2(primer55)	AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG		
56kDa	P3(primer10)	GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC	483	2 nd N-PCR
56kDa	P4(primer11)	CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC		

Figure1c.



4. 데이터 분석 (Data analysis)

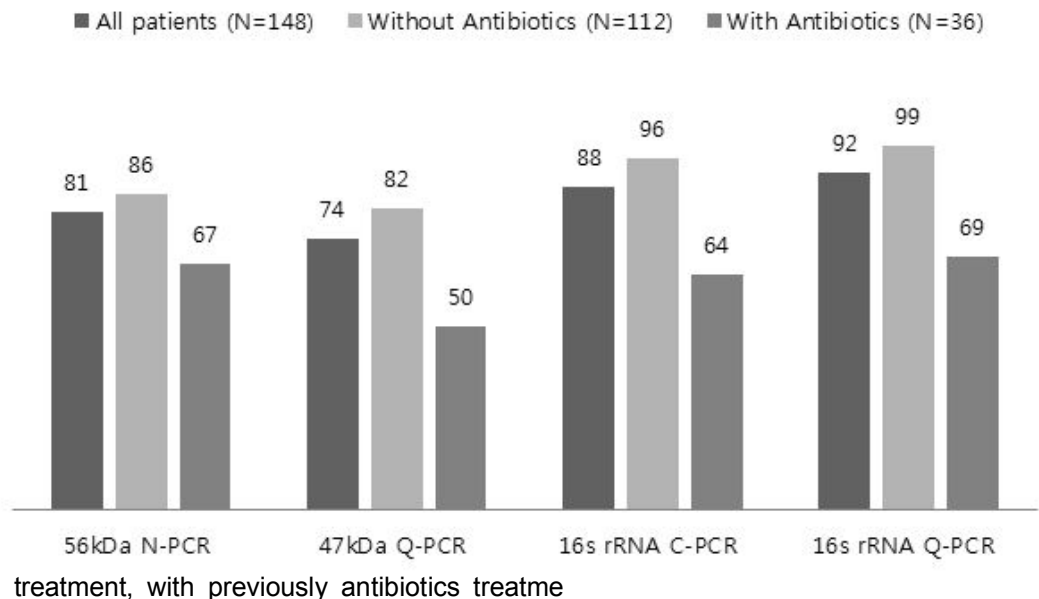
각 PCR 검사법의 양성률을 계산하여 민감도를 분석하였고, t-검정, ANOVA 검정을 시행하고 피어슨 상관계수를 구하였다. 모든 통계학적 분석에서 P 값(P value)이 0.05 미만일 때 유의하다고 정의하였다. 통계학적 분석은 SAS 프로그램, 버전 8.2를 이용하였다 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

연구 결과

1. 확진 된 모든 환자를 대상으로 시행한 각 PCR 검사법의 민감도

쯔쯔가무시병으로 확진 된 148명 환자의 혈액을 이용하여 56-kDa N-PCR, 47-kDa Q-PCR, 16S rRNA C-PCR, 16S rRNA Q-PCR을 시행하였고 각각의 양성률은 81.1%, 74.3%, 87.8%, 91.9%를 보여 16S rRNA Q-PCR이 가장 높은 민감도를 보였다 (Figure 2). 4가지 검사들의 민감도에 대한 비교를 위해 맥네마 검정을 시행하였는데 47-kDa Q-PCR과 56-kDa N-PCR은 유의한 차이를 보이지 않았고, 56-kDa N-PCR보다 16S rRNA C-PCR과 16S rRNA Q-PCR은 유의하게 민감도가 높았으며($p=0.03$, $p<0.01$). 47-kDa Q-PCR보다 16S rRNA C-PCR과 16S rRNA Q-PCR은 유의하게 민감도가 높았다($p<0.01$, $p<0.01$). 또한 16S rRNA Q-PCR은 16S rRNA C-PCR 보다 유의하게 민감도가 높았다($p=0.01$).

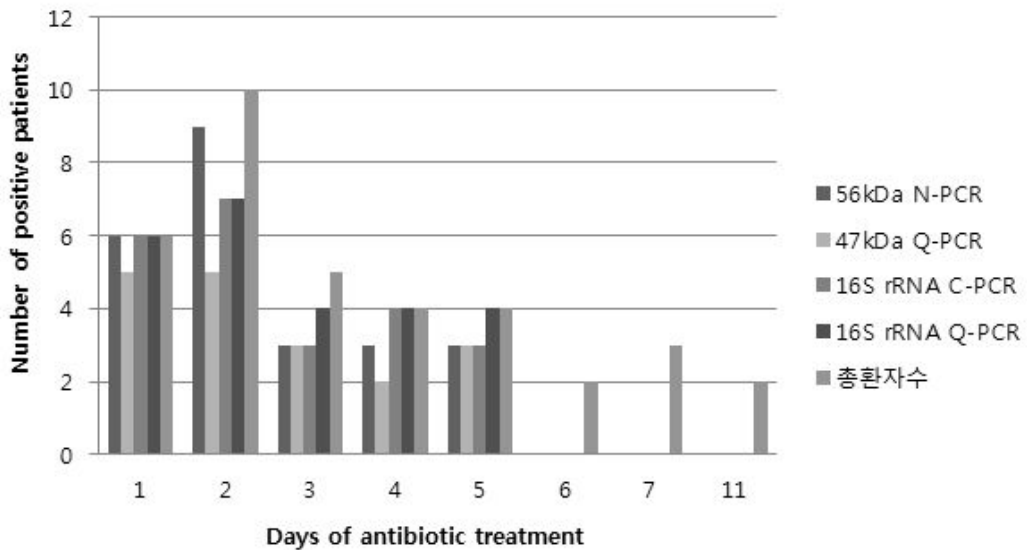
Figure 2. Sensitivities of 56-kDa N-PCR, 47-kDa Q-PCR, 16S rRNA C-PCR, 16S rRNA Q-PCR in three groups : all patients, patients without previously antibiotics



2. 항생제 투여 여부와 투여 기간에 따른 각 PCR 검사법의 민감도

항생제를 투여 받은 환자와 항생제를 투여 받지 않은 환자로 나누어 각각의 검사법에서의 민감도를 알아보았다. 총 148명의 환자 중 항생제를 투여 받지 않은 환자는 112명, 항생제를 투여 받은 환자는 36명이었다. 항생제를 투여 받지 않은 환자 112명을 대상으로 시행한 56-kDa N-PCR은 85.7%, 47-kDa Q-PCR은 82.1%, 16S rRNA C-PCR은 95.5%의 양성률을 보였고 16S rRNA Q-PCR은 99.1%의 양성률을 보여 16S rRNA Q-PCR이 가장 높은 민감도를 보였다(Figure 2). 항생제를 투여 받은 환자에서는 각각 66.7%, 50.0%, 63.9%, 69.4%의 양성률을 보여 항생제를 투여 받은 환자에서도 16S rRNA Q-PCR이 가장 높은 민감도를 보였다(Figure 2). 36명의 항생제를 투여받은 환자에서 내원 전 항생제 투여 기간은 1일부터 11일까지로 다양하였고 이에 따라 양성률의 차이를 보였다(Figure 3).

Figure 3. Number of positive patients of 4 PCR methods according to days for antibiotics treatment in 36 patients with previously antibiotics treatment



3. 환자의 중증도에 따른 각 PCR 검사법의 민감도

148명 환자의 혈액학적 검사와 임상 양상을 바탕으로 중증도를 0,1,2,3로 4그룹으로 분류하여 비교하였고, 중증도 0,1은 경증 그룹(mild group), 중증도 2,3은 중증 그룹(severe group)으로 두 그룹으로 나누어 비교하였다. 중증도 0,1,2,3 은 각각 43명, 63명, 31명, 11명이었고 경증 그룹은 106명, 중증 그룹은 42명이었다. 모든 148명의 환자를 대상으로 중증도에 따른 각 검사법의 양성률의 변화를 알아보았고 검사법 모두에서 중증도가 올라갈수록 양성률이 높아지는 결과를 보였으나 56-kDa N-PCR을 제외한 나머지 3가지 검사에서는 차이가 통계학적으로 유의하지는 않았다($p=0.04$, $p=0.55$, $p=0.33$, and $p=0.72$)(Table 2). 항생제를 투여하지 않은 112명의 환자를 대상으로 중증도에 따라 각 검사법의 양성률을 알아본 결과 역시 중증도가 올라감에 따라 양성률이 높아지는 결과를 보였으나 56-kDa N-PCR을 제외하고 나머지 3가지 검사에서는 통계학적으로 유의하지는 않았다 ($p=0.03$, $p=0.88$, $p=0.40$, $p=0.53$)(Table 3).

Table 2. Positivity rates of 4 PCR methods according to severity grades in all 148 patients.

Severity (Number of patients)	56-kDa N-PCR	47-kDa Q-PCR	16S rRNA C-PCR	16S rRNA Q-PCR
0 (N=43)	90.7	72.1	83.7	90.7
1 (N=63)	73	71.4	85.7	90.5
2 (N=31)	77.4	77.4	93.5	93.5
3 (N=11)	100	90.0	100	100
<i>P value</i>	0.04	0.55	0.33	0.72

Note: N means number of patients according to each 4 severity grades in all 148 scrub typhus patients

Table 3. Positivity rates of 4 PCR methods according to severity grades in 112 patients without previously antibiotics treatment.

Severity (Number of patients)	56-kDa N-PCR	47-kDa Q-PCR	16S rRNA C-PCR	16S rRNA Q-PCR
0 (N=35)	97.1	82.9	91.4	97.1
1 (N=44)	77.3	81.8	95.5	100
2 (N=23)	78.3	78.3	100	100
3 (N=10)	100	90.0	100	100
<i>P value</i>	0.03	0.88	0.40	0.53

Note: N means patients number according to each 4 severity grades in 112 scrub typhus patients without antibiotics treatment previously

4. 중증도, 합병증 여부등에 따른 47-kDa Q-PCR과 16S rRNA Q-PCR에서 copy 수의 비교

쯔쯔가무시병의 중증도가 심해짐에 따라 각 Q-PCR 검사의 copy 수가 증가하는 지 여부를 확인하였다. 항생제가 Q-PCR에 미치는 영향을 배제하기 위해 항생제를 투여받지 않은 112명의 환자를 대상으로 하였고, 이들 중 16S rRNA Q-PCR과 47-kDa Q-PCR의 검사에서 양성 소견이 나온 환자들을 대상으로 중증도 4그룹에 대한 각각의 copy 수의 평균을 ANOVA 검정을 시행하여 비교하였다. 16S rRNA Q-PCR에서는 copy 수의 평균이 255.0, 218.4, 446.8, 900.8 로 4단계의 중증도에서 단계가 올라갈수록 copy수의 평균값이 증가하였고, 47-kDa Q-PCR에서는 114.1, 113.2, 157.9, 314.7 의 결과를 보였다. 두 가지 검사 모두에서 질환의 중

등도가 올라갈수록 copy 수의 평균이 유의하게 증가하였다($p=0.03$, $p=0.04$)(Table 4). 또한 112명의 항생제를 투여하지 않은 환자들을 대상으로 중증도를 경증(mild) 그룹과 중증(severe) 그룹의 두 그룹으로 나누어 비교해 보았는데 16S rRNA Q-PCR과 47-kDa Q-PCR 의 검사에서의 copy 값의 평균을 구해보니 경증 그룹은 각각 234.4, 130.5 이었는데 중증 그룹에서는 각각 584.4, 244.7로 두 검사법 모두에서 중증 그룹의 평균 copy 수가 유의하게 높음을 알 수 있었다($p<0.01$, $p=0.01$)(Table 5). 각각의 여러가지 합병증들에 대한 47-kDa Q-PCR 과 16S rRNA Q-PCR의 copy 수를 T-검정을 통해 비교하였다. 합병증은 출혈, 폐렴, 간기능 이상, 신기능 이상 여부에 따라 비교하였다. 16S rRNA Q-PCR과 47-kDa Q-PCR 에서 폐렴이 있는 경우에 유의하게 copy 수가 높았다($p= <0.001$, $p= <0.001$)(Table 6). 또한 47-kDa Q-PCR 과 16S rRNA Q-PCR의 copy 수와 여러가지 검사 결과와의 상관관계를 알아보기 위해 피어슨 상관계수를 구해보았는데 47-kDa Q-PCR 검사는 WBC (white blood cell count), CRP (C-reactive protein), albumin 감소와 유의한 상관관계를 보였고($p= <0.01$, $p= 0.01$, $p= <0.01$) 16S rRNA Q-PCR검사는 WBC, creatinine, albumin 에서 유의한 상관관계를 보였다($p= 0.01$, $p= 0.01$, $p= <0.01$)(Table 7).

Table 4. Mean of copy number in 16S rRNA Q-PCR and 47-kDa Q-PCR according to severity grades divided into four levels.

Severity	16S rRNA Q-PCR		47-kDa Q-PCR	
	Patients Number	Copy number Mean \pm SD	Patients Number	Copy number Mean \pm SD
0	34	255.0 \pm 324.6	24	114.1 \pm 159.4
1	44	218.4 \pm 203.3	30	113.2 \pm 124.5
2	23	446.8 \pm 711.7	13	157.9 \pm 213.7
3	10	900.8 \pm 1247.1	7	314.7 \pm 285.3
<i>P value</i>		<0.01		0.04

Table 5. . Mean of copy number in 16S rRNA Q-PCR and 47-kDa Q-PCR according to severity grades divided into two levels.

Severity	16S rRNA Q-PCR		47-kDa Q-PCR	
	Patients Number	Copy number Mean \pm SD	Patients Number	Copy number Mean \pm SD
Mild	78	234.4 \pm 261.9	65	130.5 \pm 128.3
Severe	33	584.4 \pm 911.4	28	224.7 \pm 210.9
<i>P value</i>		<0.01		0.01

Note. Patients number means positive patients of each PCR in patients without antibiotics treatment previously.

Table 6. Mean of copy number in 16S rRNA Q-PCR and 47-kDa Q-PCR according to complications.

		16S rRNA Q-PCR		47-kDa Q-PCR	
		Patient's Number	Copy number Mean \pm SD	Patient's Number	Copy number Mean \pm SD
Hemorrhage	No	106	348.3 \pm 572.6	90	161.1 \pm 164.6
	Yes	5	129.9 \pm 101.6	3	91 \pm 23.6
	<i>P value</i>		0.39		0.47
Pneumonia	No	99	269.5 \pm 445.6	81	130.8 \pm 123.7
	Yes	12	907.1 \pm 994.8	12	348 \pm 254
	<i>P value</i>		<0.001		<0.001
Renal impairment	No	101	307.9 \pm 214.5	84	154 \pm 159.9
	Yes	10	647.1 \pm 1119.9	9	204.5 \pm 188.7
	<i>P value</i>		0.07		0.46
Hepatic injury	No	8	567.7 \pm 1642.1	7	182.4 \pm 235.3
	Yes	103	320.6 \pm 471.6	86	156.9 \pm 156.9
	<i>P value</i>		0.23		0.79

Note. Patients number means positive patients of each PCR according to complications whether yes or no in patients without antibiotics treatment previously.

Table 7. Correlation between laboratory findings and copy value of 47kDa Q-PCR and 16S rRNA Q-PCR

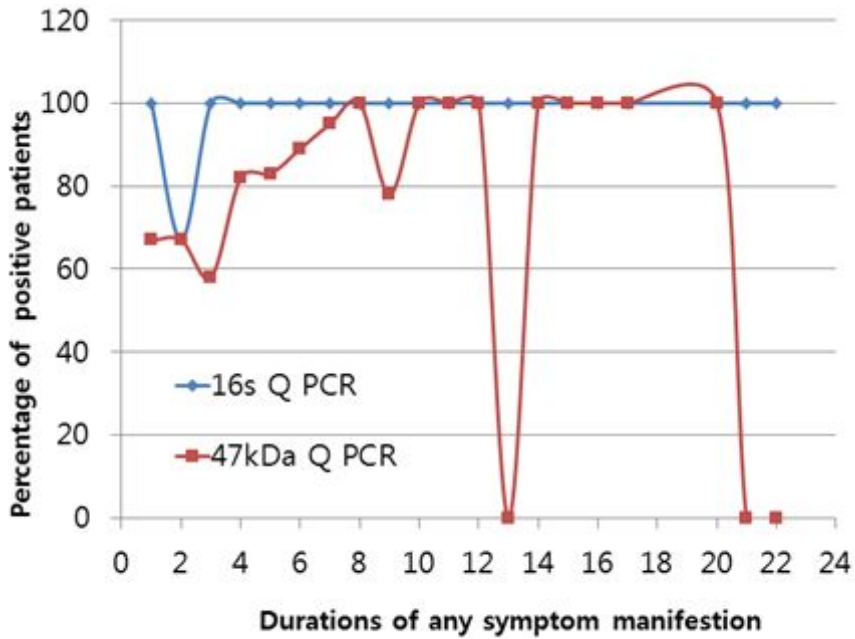
	47-kDa real time PCR		16s rRNA real-time PCR	
	Correlation coefficient	P value	Correlation coefficient	P value
WBC	0.35	< 0.01	0.27	0.01
Platelet	-0.17	0.09	-0.02	0.82
CRP	0.29	0.01	0.19	0.05
Creatinine	0.17	0.11	0.23	0.01
Albumin	-0.46	<0.01	-0.36	<0.01
Bilirubin	0.12	0.24	-0.01	0.93
APACHE score	0.20	0.06	0.14	0.14

WBC : white blood cell, CRP : C-reactive protein

5. 증상발현일에 따른 PCR 검사 양성률의 비교

항생제를 투여하지 않은 112명의 환자 그룹에서 증상이 발생하고 나서 병원에 내원하기 전까지의 기간에 따른 16S rRNA Q-PCR과 47-kDa Q-PCR의 양성률을 알아보았다. 47-kDa Q-PCR은 증상 발현 초기 3일에는 양성률이 낮다가 4일째부터 양성률이 올라가다 8일에서 12일까지 100%의 높은 양성률을 보이나 이후에는 다시 양성률이 감소하였고, 16S rRNA Q-PCR은 증상발현 2일째에 검사를 시행한 환자 한명에서만 음성 결과를 보였다(Figure 4).

Figure 4. Positivity percentages of 47kDa real-time PCR and 16s rRNA real-time PCR according to durations of symptom manifestation.



고 찰

찌꺼기무시병의 신속한 진단을 위하여 중합효소 연쇄반응(PCR) 검사의 임상적 유용성에 대한 연구가 되어왔다. Sonthayanon 등의 연구에서는 찌꺼기무시병 환자를 대상으로 16s rRNA 유전자를 이용하여 시행한 PCR 검사에서 44.8%의 민감도와 99.7%의 특이도를 보고하였고, Watthanaworawit 등의 연구에서는 50.0%의 민감도와 99.0%의 특이도를 보였다(6,7). 본 연구에서는 전체 148명의 환자를 대상으로 시행한 56-kDa N-PCR, 47-kDa Q-PCR, 16S rRNA C-PCR, 16S rRNA Q-PCR 에서 각각 81.1%, 74.3%, 87.8%, 91.9%의 민감도를 보여 이전의 두 연구에 비해 높은 민감도를 보였다. Nested PCR은 conventional PCR에 비하여 100배 이상의 높은 민감도를 보이고 real-time PCR은 2시간 이내에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있지만 모든 PCR 검사법은 항생제 투여 여부에 영향을 받는다는 단점이 있다(9,12). Kim 등의 연구에서 찌꺼기무시병 환자의 진단에 있어 항생제 투여 전에 56-kDa N-PCR 의 민감도가 90.5% 였는데, 항생제를 3일 투여한 후에는 60.5%, 4일 투여한 경우에는 10%로 민감도가 감소하여 찌꺼기무시병의 진단을 위해서는 항생제를 투여한 후 3일 이내에 PCR 검사를 시행해야한다고 하였다(12). 본 연구에서도 항생제를 투여 받은 환자와 항생제를 투여 받지 않은 환자로 나누어 항생제 투여에 따라 각 PCR 검사법의 민감도의 차이를 비교해 보았다. 항생제를 투여 받지 않은 112명의 환자의 경우 56-kDa N-PCR은 85.7%, 47-kDa Q-PCR은 82.1%, 16S rRNA C-PCR은 95.5%, 16S rRNA Q-PCR 은 99.1% 의 민감도를 보였고 특히 16S rRNA Q-PCR은 1명의 환자를 제외하고 모두 양성을 보이는 높은 민감도를 보였으나 항생제를 투여 받은 환자에서의 민감도는 현저히 감소하였다. 항생제 투여 3일 이내에 PCR 검사를 시행한 경우 56-kDa N-PCR은 90%, 47-kDa Q-PCR은 61.9%, 16S rRNA C-PCR은 76.2%, 16S rRNA Q-PCR은 81.0% 의 민감도를 보였는데 항생제 투여 4일 이후에 검사를 시행한 경우 각각 40%, 33.3%, 46.7%, 53.3% 로 민감도가 감소하였다. 특히 4가지 모든 PCR 검사에서 항생제 투여 후 6일이 지난 후부터는 모두 음성 결과를 보여 PCR을 통한 진단을 위해서는 항생제 투여 후 6일 이내에는 검사를 시행해야 함을 보여주었다. 항생제를 투여하지 않은 경우와 항생제를 투여한 경우 모두에서 16S rRNA Q-PCR 이 가장 높은 민감도를 보여 찌꺼기무시병을 진단할 때에는 항생제를 투여하지 않

은 상태에서 검사를 시행하는 것이 좋겠지만 항생제를 투여한 이후에 검사를 시행한다면 16S rRNA Q-PCR이 다른 PCR 검사보다 진단에 더 유용할 것으로 보인다. 항생제를 투여하지 않은 환자 중에서 1명의 환자가 16S rRNA Q-PCR에서 음성 소견을 보였는데, 16S rRNA Q-PCR의 crossing point (Cp) 값은 40이고 copy 수는 20이었다. 환자의 증례를 살펴보면 내원 2일전에 근육통 등의 경미한 증상이 발생하였고 내원 당일 발열이 발생하였으며 임상 경과가 매우 경미하여 입원 3일째에 호전되어 퇴원하였다. PCR 검사 당시 증상이 발현한지 몇 일이 되지 않았고 증상이 매우 경미하여 PCR 검사에서 위음성을 보인 것으로 생각한다.

Q-PCR은 정량 분석이 가능하다는 장점을 가지고 있는데, 이를 이용하여 16S rRNA Q-PCR에서 copy 수가 질병의 중증도에 따라 증가하는지를 알아보기 위해 항생제를 투여하지 않은 그룹에서 PCR 검사에서 양성으로 확진을 받은 환자의 copy 수를 합산하여 평균을 구하였다. 경증의 환자 그룹의 평균 copy 수는 234.4이고 중증 환자 그룹의 평균 copy수는 584.4로 유의하게 copy수가 증가함을 보여 copy 수가 증가할수록 심한 질환의 경과를 보일 수 있음을 보여주었다. Copy 수의 증가가 혈액학적, 생화학적 검사 소견과 상관관계가 있는지 알아보았는데 16S rRNA Q-PCR에서는 WBC와 creatinine이, 47-kDa Q-PCR에서는 WBC와 CRP가 유의하게 양의 상관관계를 보여 이들 검사 수치가 올라감에 따라 각 PCR 검사의 copy 수가 증가함을 보여주었고, 두 검사 모두에서 albumin이 유의하게 음의 상관관계를 보여 albumin 수치가 떨어짐에 따라 두 검사의 copy 수가 증가함을 알 수 있었다. 그러나 본 연구에서 가피 유무와 발진 유무에 따른 copy 수에서는 통계적인 차이를 보이지 않았다. 한 연구에서 60세 이상의 연령, 가피가 없음, 백혈구 증가, 알부민 감소가 중증의 찌르가무시병을 나타내는 인자들이라고 하였는데 이런 인자들과 더불어 본 연구에서는 real-time PCR 검사를 통해 찌르가무시병이 진단 되었을 때 copy 수가 높을수록 찌르가무시병의 중증도를 예측해볼 수 있음을 보여주었다(13).

본 연구에서 16S rRNA를 이용한 real-time PCR 은 56-kDa N-PCR, 47-kDa Q-PCR, 16S rRNA C-PCR 에 비하여 높은 민감도를 보여 찌르가무시병이 의심되는 환자에서 조기 진단을 위해 이용할 수 있는 유용한 검사법임을 보여주었고, 정량화하여 얻은 copy수를 통해 질환의 중증도와 검사 결과의 중증도를 판단해 볼 수 있어 임상적으로 유용할 것으로 생각한다.

참고문헌

1. Basnyat B, Belbase RH, Zimmerman MD, Woods CW, Reller LB, Murdoch DR. 2006. Clinical features of scrub typhus. *Clin Infect Dis.*42:1505-1506.
2. Kim DM. Clinical features and diagnosis of scrub typhus. 2009. *Infect Chemother* ;41(6):315-322
3. Blacksell,S.D.,Bryant NJ, Paris DH, Doust JA, Sakoda Y, Day NP. 2007. Scrub typhus serologic testing with the indirect immunofluorescence method as a diagnostic gold standard: a lack of consensus leads to a lot of confusion. *Clin Infect Dis.* 44:391-401.
4. Bozeman FM, Elisberg BL. 1963. Serologic diagnosis of scrub typhus by indirect immunofluorescence.*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 112:568-573.
5. Kim DM, Park G, Kim HS, Lee JY, Lee Y, Neupane GP, Graves S, Stenos J. 2011. Comparison of conventional, nested, and real-time quantitative PCR for diagnosis of scrub typhus. *J Clin Microbiol.*2:607-612.
6. Sonthayanon P1, Chierakul W, Wuthiekanun V, Blacksell SD, Pimda K, Suputtamongkol Y, Pukrittayakamee S, White NJ, Day NP, Peacock SJ. 2006. Rapid diagnosis of scrub typhus in rural Thailand using polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 75:1099-102
7. Watthanaworawit W1, Turner P, Turner C, Tanganuchitcharnchai A, Richards AL, Bourzac KM, Blacksell SD, Nosten F. 2013. A prospective evaluation of real-time PCR assays for the detection of *Orientia tsutsugamushi* and *Rickettsia* spp. for early diagnosis of rickettsial infections during the acute phase of undifferentiated febrile illness.*Am J Trop Med Hyg.* 89 :308-10
8. De Sousa R., Ismail N., Nobrega S.D., Franca A., Amaro M., Anes M., Walker D.H. 2007. Intralesional expression of mRNA of interferon- gamma , tumor necrosis factor- alpha , interleukin-10, nitric oxide synthase, indoleamine-2,3-dioxygenase, and RANTES is a major immune effector in

Mediterranean spotted fever rickettsiosis. ;J Infect Dis. 196:770-81

9. Jiang J, Chan TC, Temenak JJ, Dasch GA, Ching WM, Richards AL. 2004. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*. Am J Trop Med Hyg. 70:351-6

10. Furuya Y, Yoshida Y., Katayama T., Yamamoto S., Kawamura A Jr. 1993. Serotype-specific amplification of rickettsia tsutsugamushi DNA by nested polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 31: 1637-1640

11. Lee YM, Kim DM, Lee SH, Jang MS, Neupane GP. Phylogenetic analysis of the 56 kDa protein genes of *Orientia tsutsugamushi* in southwest area of Korea. 2011. Am J Trop Med Hyg 84: 250-254

12. Kim DM, Byun JM. 2008. Effects of antibiotic treatment on the results of nested PCRs for Scrub typhus. J Clin Microbiol. 46:3465-6

13. Kim DM, Kim SW, Choi SH, Yun NR. 2010. Clinical and laboratory findings associated with severe scrub typhus. BMC Infect Dis ;10:108-114