[UCI]I804:24011-200000240086

2010년 8월

석사학위 논문

Scrub typhus의 진단에 있어서 16s ribosomal RNA gene을 이용한 conventional PCR의 임상적 유용성

조선대학교 대학원

의 학 과

조 민 근

Scrub typhus의 진단에 있어서 16s ribosomal RNA gene을 이용한 conventional PCR의 임상적 유용성

Clinical usefulness of Conventional PCR based on the 16s ribosomal RNA gene for the Diagnosis of Scrub typhus

2010년 8월 25일

조선대학교 대학원

의 학 과

조 민 근

Scrub typhus의 진단에 있어서 16s ribosomal RNA gene을 이용한 conventional PCR의 임상적 유용성

지도교수 이 준

이 논문을 의학 석사학위신청 논문으로 제출함

2010년 8월

조선대학교 대학원

의 학 과

조 민 근

조민근의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 김 동 민 (인)

위 원 조선대학교 교수 박 치 영 (인)

위 원 조선대학교 교수 이 준 (인)

2010 년 8 월

조선대학교 대학원

ABSTRACT _____ 1

I. 서론_____ 3

II.대상 및 방법_____ 4

III. 결과_____ 7

IV. 고찰 _____ 10

참고문헌 _____12

표 목 차

Table 1 _____ i

Table 2 _____ ii

Table 3 _____ iii

Table 4 _____ iv

Table 5 _____ v

도 목 차

Figure 1 _____ A

Figure 2 _____ B

Abstract

Clinical usefulness of Conventional PCR based on the 16s ribosomal RNA gene for the Diagnosis of Scrub typhus

By Cho Min Keun
Advisor : Prof. Kim, Dong-Min, M.D., Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

(Background)

A simple and more rapid laboratory diagnostic method for scrub typhus, a polymerase chain reaction(PCR) assay on the blood sample has become prevalent for the early diagnosis of scrub typhus. Also, Nested, real-time PCR methods have been introduced and yielded more sensitive diagnostic results. However, these newer methods need more experienced personnels for conducting molecular laboratory works, more expensive laboratory facilities. Various target genes used in PCR for the diagnosis of scrub typhus are introduced in several studies. Up to date, 47kDa, 56kDa and gro-EL STG gene have been used and investigated, frequently. Also, 16s ribosomal RNA gene could be used in PCR methods as target gene for the diagnosis of scrub typhus. 16s ribosomal RNA gene is highly conserved between different species of bacteria and archaea.[1] Moreover, 16S rRNA gene sequences contain hypervariable regions which can provide species-specific signature sequences useful for bacterial identification.[2] In this aspects, 16S rRNA gene sequencing could be used in medical microbiology as a rapid, accurate alternative to phenotypic methods of bacterial identification. But Studies for evaluating clinical values of these target genes used in conventional PCR for the diagnosis of scrub typhus has not been reported until recently.

(Method)

In this study, we conducted a comparative study on 167 patient with acute febrile illness which is possible scrub typhus who were admitted to a single hospital(Chosun University Hospital, Korea). To assess the clinical usefulness of performing conventional PCR as a diagnostic modality, we designed the conventional PCR primers targetted to 16s ribosomal RNA and conducted comparative study with other conventional PCR results in which 47kD, 56kD, gro-EL STG gene were used for the diagnosis of scrub typhus. To estimate and compare the sensitivity and specificity of conventional, nested and real time PCR, the receiver operating characteristic(ROC) curve analysis was used.

(Result)

The sensitivity and specificity of 16s ribosomal RNA conventional PCR for the diagnosis of scrub typhus were 86.8% and 100%, respectively. In case of 47 kDa , 56kDa, groEL-STG gene PCR, sensitivities of each gene are 3%, 8% and 61%. In this study, among conventional PCR, PCR using 16s ribosomal RNA gene is most sensitive for the diagnosis of scrub typhus. In pairwise comparison of ROC curves, AUC value of 16s ribosomal RNA conventional PCR(0.934(95% CI, 0.885 to 0.967)) was superior to that of 47kDa, 57kDa, groEL-STG conventional PCR.

(Conclusion)

16s ribosomal RNA gene could be used in conventional PCR for the diagnosis of scrub typhus, as the most sensitive and superior diagnostic target gene, compared to other conventional PCR results using 47kDa, 56kDa, groEL-STG gene. Even comparing with nested, realtime PCR methods, 16s ribosomal RNA conventional PCR showed superior diagnostic results in this study.

Key words: scrub typhus; conventional PCR; PCR; ROC curves; diagnosis

.

I. 서론

Scrub typhus는 급성 발열성 질환으로서 *Orientia tsutsugamushi* 에 의해 감염된 털진드기의 유충에 물려 전염되며[3-4], 전신적 혈관염으로 인한 특징적인 임상 양상을 나타낸다.[3-4] 주요 숙주는 설치류이며 진드기는 숙주이자 매개체이다. 주요 가을철 열성질환으로서 한국, 일본, 중국, 태국, 그리고 기타 남아시아 국가에서 발생하는 지정학적 분포를 보인다.[5] 하지만 최근 해외여행의 증가로 서양에서도 종종 발병이 보고되는 실정이다.[6] Scrub typhus는 진드기에 물린 후 1-2 주 경에 발열, 오한, 두통, 근육통, 홍반성 구진성 발진이 나타나며, 특징적인 가피(eschar)가 발견되면 신속한 진단에 도움이 된다. 대개 병의 경과가 중하지 않고, 항생제 치료에 잘 반응하나, 진단이 늦어질 경우 폐렴, 급성 신부전, 뇌수막염, 뇌염, 상부위장관 출혈, 다기관 기능부전 등의 합병증으로 일부 환자에서는 사망이 초래될 수 있다.[7-8]

현재 Scrub typhus의 진단에 흔히 사용되는 혈청학적 검사들은 immunofluorescence test, immunoperoxidase test, emzyme linked immunosorbent assay(ELISA), passive hemagglutination (PHA) test 등이 있다. 하지만, 증상 발생 후 항체형성까지 수일이 소요되어 질병의 조기에 내원하여 검사를 시행할 경우 민감도가 낮으며, 확진을 위해서는 추적검사가 필요하다는 단점이 있다..[9] 그러므로 Scrub typhus의 임상경과 중 초기에, 신속하게 진단하기 위해 환자의 혈액에서 PCR을 이용하여 *Orientia tsutsugamushi*의 특이 유전자를 검출하는 방법이 소개되었다.[10-12] 이후, conventional PCR 보다 100배 더 민감한 nested PCR 이 소개되었으며 신속하고 정확한 진단에 도움이 될 수 있는 진단법으로 이용되고 있다.[11] 최근에는 *Orientia tsutsugamushi*에 특이적인 유전자를 target으로 한 real time PCR이 소개되어 신속하고, 높은 민감도와 특이도를 보여 임상에서 Scrub typhus를 조기에 진단하는데 매우 유용함을 제시하였다.[13] 하지만, nested, real time PCR법은 진단적인 유용함과 우수성에도 불구하고, PCR에 소요되는 비용, 장비, 인력의 문제로 scrub typhus의 diagnostic modality로서 대부분의 의료기관에서 보편적으로 사용되기에는 제한점이 있다. 또한 conventional PCR은 기존의 scrub typhus를 진단하기 위한 ELISA, PHA, IFA 비해 결코 열등하지 않으며, 우수한 민감도와 특이도를 가지고 있어서 비용 및 효과 측면에서 여전히 충분한 가치가 있다. 이에 저자들은 급성 열성질환으로 내원한 환자들을 대상으로 *Orientia tsutsugamushi*에 특이적인 여러가지 target gene들을 이용한 PCR 검사법에 대한 비교연구를 시행하기 위해, 16s ribosomal RNA 를 이용한 conventional PCR과 56kDa, 47kDa 및 gro-EL STG를 이용한 conventional PCR을 시행하였다. 또한, nested, real time PCR을 추가로 시행 하여 결과에 대한 비교연구를 통하여 16s ribosomal RNA conventional PCR의 임상적 유용성을 평가하고 하였다.

II. 대상 및 방법

1. Primers and Probes

본 연구에 사용된 모든 primer 들과 probe 는 Table 1 에 제시되어있다. 16s ribosomal RNA conventional PCR 의 primer 들은 O.t-16sRF1 primer(GenBank Acession No. bankit1356164 HM352765 :*O. tsutsugamushi* Boryoung Genotype 의 16s gene sequence 403-428 영역)와 O.t-16sRR1 primer(*O. tsutsugamushi* Boryoung Genotype 의 16s gene sequence 577-601 영역)로서 저자 등이 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) database search program 과 primer 3 program 을 이용하여 design 하였다[14]. Design 된 primer 들을 통하여 conventional PCR 을 시행하여 16s ribosomal RNA 유전자를 증폭시켰다 (최종 산물: amplicon 199bp).

한편, 저자 등이 design 한 primer 와 비교하기 위해, Sonthayanon P. 등이 태국에서 시행한 16s ribosomal RNA conventional PCR 의 primer 와, 박 등이 국내에서 시행한 gro-EL STG 의 convetional PCR 을 위한 primer 는 각각의 논문에서 design 한 것과 동일한 primer 를 사용하였다.[15-16]. 47kD real time PCR 시행하면서, probe 인 OtsuPR665 의 5' 과 3' 의 terminal 에 FAM (6-carboxyFluo-rescein)과 BHQ-1 (Black Hole Quencher-1)로 labeling 을 시행하였다. 본 연구에 사용된 모든 primer 들과 probe 는 Table 1 에 제시되어있다.

2. PCR

1) Conventional PCR

DNA 는 전혈 검체의 백혈구 연층에서 QIA amp DNA mini kit(Qiagen, Germany)로 정제하였으며 그 과정은 kit 에 동봉된 manual 에 의하였다. PCR 은 target gene 에 따라 각기 달리 수행되며, 2μL DNA, 각각 1 μL 씩 forward 와 reverse primer, AccuPowerTM PCR PreMix (1 U Top polymerase, 250μM dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH9.0), 30 mM KCl, 1.5mM $MgCl_2$, stabilizer and tracking dye; Bioneer, Daejeon, Korea), 멸균된 3 차 증류수를 넣어 총 20μL 의 반응액을 만들었다. 각 PCR 의 수행조건은 표 4 에 요약되어있다. groEL-STG gene 의 경우 박 등이 실시한 방법을 참고로 하였으며, primer 0.5μM 과 template DNA 50 ng, 10 X LightCycler FastStart DNA Master SYBR green I kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) 2μL, 4 mM $MgCl_2$ 를 섞어 증류수로 final volume 20 μL 를 맞춘 후, first deanturation 95℃ 10 분, 40 cycles 로 denaturation 95℃ 10 초, annealing 56℃ 5 초, extension 72℃ 20 초로

진행하였다[16]. Biosystems VeritiTM 96-well Thermal cycler(Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하였으며, PCR product 확인을 위해 0.5 ng/mL Etbr (Ethidium bromide; Bioneer, Daejeon, Korea)을 넣은 1.2% agarose gel (Seakemⓡ LE agarose; Cambrex Bio Science, Rockland, ME)에 Bioneer electrophoresis machine (Bioneer, Korea)으로 100 V (1X TAE; Bioneer, Korea)에 40 분 동안 전기영동 하였다.

2) Nested PCR

O.tsutsugamushi 의 56kDa gene 경우, internal primers 로 P10 과 P11 (5 pmole/μL) 을, external primer 로 P34 그리고 P55 (5 pmole/μL) primer 을 사용하였다.[17] 47kDa gene 에 사용된 primer 들의 정보는 표 1 에 요약되어 있다. 첫 번째 PCR 의 반응액 제조는 conventional PCR 의 과정과 같으며, 그 수행조건은 표 4 에 요약되어있다. second round PCR 의 template DNA 는 the first PCR 의 product (2μL/ 50 μL total volume) 와, primer P10 과 P11(10 pmoles/μL)을 이용하여 수행하였다. 최종 PCR 산물은 2% agarose gel 에서 100 V 로 전기영동하였다.

3) Real time PCR

47 kD gene 의 real time PCR 은 총 20μL 의 reaction mixtures (5 μL 의 genomic DNA, 각각 1μL 씩의 5 pmole/μL forward 와 reverse primer (OtsuFP630 and OtsuRP747), 1μL 의 2 pmole/μL probe (OtsuPR665), 4μL 의 master mix (reaction buffer, FastStart Taq DNA polymerase, $MgCl_2$ and dNTP (with dUTP instead of dTTP)), and water)로 수행하였다. 수행조건은 95° C 에서 10 분, 그리고 두 단계의 95° C 10 초, 60° C 30 초를 45 주기로 하며, 40℃에서 30 초 진행한다. Real time PCR 은 Light Cycler software 4.0 program 으로 결과를 분석했다.

3. Patient selection

2007 년부터 2008 년까지 4 주 내에 급성 열성질환으로 Chosun University Hospital 로 내원한 18 세 이상 성인 환자들을 대상으로 저자 등이 이전에 시행하였던 연구 당시에 보관되었던 혈액을 이용하였다. 환자들은 가피 또는 홍반성 구진성 발진을 동반한 발열환자 였으며, 두통, 전신 쇄약, 근육통, 기침, 오심, 복통 중에서 2 가지 이상을 만족하였다. 환자 및 보호자에게 연구과정의 전체적인 안내를 설명한 고지에 입각한 동의 하에 혈액 검체를 채취하였다. Scrub typhus 환자는 *Orientia tsutsugamushi* 에 대한 간접 면역 형광 항체(IFA)가 1 회의 IgM 역가가

1:10 이상 또는 Ig G 역가가 4 배 이상 상승된 경우에 확진으로 정의하였다. Non scrub typhus 환자는 *Orientia tsutsugamushi* 에 대한 간접 면역 형광 항체가 검출되지 않고, 감염내과 전문의의 판단에 의해 serology, culture, peripheral blood smear 등 여러 진단 검사방법으로 분명하게 scrub typhus 이외의 열성질환으로 확인된 환자로 정의하였다. 무작위로 선정된 scrub typhus 로 확인된 115 명과 진단명이 분명하고 non scrub typhus 로 확인된 52 명의 혈액검체를 laboratory personel 에게 보내어 47-kD protein , 56kDa protein, gro-EL-STG, 16s ribosomal RNA gene 을 target 으로 PCR 검사를 시행하였다.

4. Data 분석

검사상 확인된 각각 PCR 법의 sensitivities 와 specificities 와 diagnostic accuracy 분석을 시행하였다. 모든 통계 분석에서 P values < 0.05 를 통계적으로 의미있는 것으로 간주하였다. scrub typhus 진단의 gold standard 인 간접 면역 형광 항체(IFA)의 1 회의 IgM 또는 Ig G 역가가 4 배 이상 상승된 경우에 확진으로 하여, 각각 PCR method 의 민감도와 특이도를 receiver operator characteristic (ROC) curve concept 으로 표시하였으며, the MEDCALC software program (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium, version 11.2.1) 을 이용하여 다양한 PCR 방법들의 결과와 diagnostic accuracy 를 비교 분석 하였다 .

III. 결과

1. Clinical data

총 167 명의 급성 열성질환 환자들이 연구에 포함되었으며, Scrub typhus 환자 및 발열 대조군들의 특성에 대하여 Table 2, 3 에 정리되어있다. 남녀 115 명의 환자들이 Scrub typhus 환자군에 포함되었으며, 52 명의 환자들은 non-scrub typhus 환자들로서 발열 대조군으로 분류되었다. Scrub typhus 환자군과 발열 대조군의 성비는 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았으며(P=0.693), 연령의 중앙값은 (환자군;69, 대조군;54) scrub typhus 군에서 높았으며, 평균 연령(환자군;66 세, 대조군;53 세) 또한 Scrub typhus 환자군에서 통계적으로 유의하게 높았다(P=0.0002). 발열 대조군 환자의 진단명에 대한 설명은 Table 4 에 정리되어있다.

2. PCR results in Scrub typhus group and Non-scrub typhus group

모든 PCR 의 결과는 Table 5 에 정리되어있다. Scrub typhus 로 확인 된 115 명과 non-scrub typhus 로 확인되고 진단명이 분명한 29 명의 혈액검체를 이용하여 PCR 검사를 시행하였다. 47kDa C-PCR 검사에서 115 명 중에서 3 명의 환자(3%)에서 양성을 보였으며, 47kDa N-PCR 검사 결과 115 명 중 93 명의 환자에서 양성을 확인할 수 있어 81%의 민감도를 확인할 수 있었다. Q-PCR 을 시행한 경우 38 cp 이상을 음성으로 채택할 때 115 명의 환자 중 87 명의 환자에서 양성을 보여 76%의 양성율을 확인하였다[14,18]. 56kDa protein gene 을 target 으로한 C-PCR 검사에서 115 명의 scrub typhus 환자군에서 9 명의 환자에서 양성소견이 관찰되었고, N-PCR 검사상 115 명 중에서 92 명에서 양성을 보여 80%의 sensitivity 를 보였다. groEL-STG gene 을 target 으로 시행한 C-PCR 에서 115 명의 scrub typhus 환자군에서 76 명이 양성을 보였으며, 66%의 sensitivity 를 보였다. 16s ribosomal RNA gene 을 target 으로 한 PCR 에서, Sonthayanon P. 등이 태국에서 보고한 primer 를 이용한 16s 16s ribosomal RNA C-PCR 의 경우 115 명의 scrub typhus 환자군에서 실시 결과 각각 76 명이 양성으로이 확인되어 66%의 sensitivity 를 보였으며, 저자 등이 design 한 primer 로 시행한 16s ribosomal RNA C-PCR 의 경우 100 명에서 양성을 보여 86%의 sensitivity 를 보였다.

Non-scrub typhus 군에서 47kDa Q-PCR 을 시행 하여 4 번과 26 번 환자(2 명)의 혈액 검체에서 에서 양성소견이 확인되었던 것을 제외할 경우, non-scrub typhus 군에서 시행한 모든 PCR 검사에서 양성소견을 보인 환자는 없었다.

3. comparison of diagnostic accuracy of various PCR methods for the diagnosis of scrub typhus

1) Conventional PCR 에서 각각의 target gene 에 따른 diagnostic accuracy 비교.

Conventional PCR 의 AUC 값은 다음과 같다. 16s C-PCR 의 경우 0.94(95% CI, 0.89-0.97)이었으며, Sonthayanon P. 등이 태국에서 보고한 primer 를 이용한 16s ribosomal RNA C-PCR 은 0.83(95% CI, 0.77-0.88), 56kDa C-PCR 은 0.54(95% CI, 0.46-0.62), groEL-STG C-PCR 은 0.8(95% CI, 0.77-0.88) 그리고 47kDa C-PCR 은 0.51(95% CI, 0.44-0.59)이었다. 16s C-PCR 의 AUC 값은 Thailand C-PCR 및 다른 C-PCR 과 비교할 경우 통계적으로 유의한 차이를 보였다.(16s C-PCR vs Thailand 16s C-PCR, p<0.001; 16s C-PCR vs 47kDa C-PCR, p<0.001; 16s C-PCR vs 56kDa C-PCR, p<0.001). 56kDa C-PCR 과 47kDa C-PCR 의 AUC 값은 서로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았으나(p=0.081), Thailand 16s PCR 과 비교시 각각 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Thailand 16s C-PCR vs 47kDa C-PCR, P<0.001; Thailand 16s C-PCR vs 56kDa C-PCR, P<0.001).(figure 1)

2) 각각의 Target protein gene 에서 PCR 방법에 따른 diagnostic accuracy 의 비교

47kDa gene 을 target 으로 PCR 을 시행할 경우 C-PCR 은 sensitivity of 3%(95% CI, 0.5-7.4)와 specificity of 100%(95% CI, 93.2-100)이었고, N-PCR 은 sensitivity of 81%(95% CI, 72.5-87.6)와 specificity of 100%(95% CI, 93.2 - 100)이었다. 47kDa Q-PCR 의 diagnostic accuracy 는 38 cp 값을 negative result 에 대한 cut off value 로 선정할 경우 sensitivity of 76%(95% CI, 66.8-83.2)와 specificity of 96%(95% CI, 86.8-99.5)이었다. The area under the curve 는 47kDa N-PCR 은 0.9(95% CI, 0.85-0.94), Q-PCR 은 0.86(95% CI, 0.8-0.91) 그리고 C-PCR 은 0.51(95% CI, 0.44-0.59) 이었으며 각각의 비교에서 통계적으로 유의한 차이를 보였다.(N-PCR vs C-PCR, p<0.001; N-PCR vs Q-PCR, p=0.012, C-PCR vs Q-PCR, p<0.001)

56kDa gene 을 target 으로 PCR 을 시행할 경우 C-PCR 은 sensitivity of 8%(95% CI, 3.6-14.3)와 specificity of 100%(95% CI, 93.2-100)이었고, N-PCR 은 sensitivity of 80%(95% CI, 71.5-86.9)와 specificity of 100%(95% CI, 93.2 - 100)이었다. The area under the curve(AUC) 는 N-PCR 은 0.9(95% CI, 0.46-0.61), C-PCR 은 0.54(95% CI, 0.46-0.62)로 통계적으로 유의한 차이를 보였다(N-PCR vs C-PCR, p<0.001).

47kDa N-PCR 및 Q-PCR, 56kDa N-PCR 과 저자 등이 design 한 primer 를 이용한 16s ribosomal RNA C-PCR 의 diagnostic accuracy 를 AUC 값에 따라 비교할 경우, 저자 등이 design 한 primer 를 이용한 16s ribosomal RNA C-PCR 은 다른 PCR 의 AUC 값보다 통계적으로 유의하게 차이를 보였다(16s C-PCR vs 47kDa N-PCR, $p=0.017$; 16s C-PCR vs 56 kDa N-PCR, $p=0.03$; 16s C-PCR vs 47kDa Q- PCR, $p<0.001$).(figure 2) 즉, 저자 등이 design 한 16s ribosomal RNA C-PCR 의 AUC 값은 이 연구에 포함된 다른 PCR 의 AUC 값들과 비교할 경우 모든 경우에서 우월한 값을 나타내며, 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다

Ⅳ. 고찰

Scrub typhus 는 항생제 치료에 잘 반응하며, 대부분 병의 경과가 위중하지 않으나, 일부 경우에 있어서는 항생제 투여가 지체될 경우 치명적인 합병증과 사망이 초래될 수 있는 질환이다[19]. Routine culture method 로 동정이 쉽지 않은 fastidious organism 으로서, scrub typhus 의 신속한 진단과 치료를 위해 PCR 을 이용한 진단법이 현재 많이 사용되고 있다. Target gene 으로서 46kDa gene 과 56kDa gene 이 흔히 사용되고 있다. 최근 groEL-STG gene 을 target 으로 한 real time PCR 이 국내에서 박 등에 의해 소개되어 scrub typhus 와 다른 그룹의 리케치아 질환을 잘 구분할 수 있는 장점을 가지고 있는 것으로 알려져 있다[16]. 한편, 16S ribosomal RNA gene 은 계통분류학상 염기서열의 차이점이 적은 영역으로서 이 유전자를 대상으로 하는 pirmer 를 제작할 경우 많은 수의 미생물을 하나의 군집으로 정량할 수 있다는 장점이 있다.[1-2] 이러한 특성을 고려하여, 저자 등은 *Orientia tsutsugamushi* 의 16s ribosomal RNA gene 을 target 으로 한 PCR 을 시행하기 위한 primer 를 제작하였다.

한편, 16s ribosomal RNA gene 을 target 으로 한 conventional PCR 의 diagnostic accuracy 를 평가하기 위한, 47kDa, 56kDa 및 groEL-STG gene 의 convetional PCR 과의 비교연구 또한 아직 보고된 바 없다. 이에, 실제 임상에서 급성 열성질환으로 내원한 환자의 혈액 검체를 통하여 16s conventional PCR 과 기존에 소개된 46kDa, 56kDa, groEL-STG gene 을 이용한 conventional PCR 들의 diagnostic accuracy 를 민감도와 특이도의 측면에서 비교 분석하였다.

실제 임상 환자 검체에서 시행한 검사 결과로 시행한 Operating Characteristic (ROC) curves 의 비교에서는, 저자 등이 design 한 16s conventional PCR 이 46kDa, 56kDa, groEL-STG 그리고 Sonthayanon P. 등이 태국에서 보고한 primer 를 이용한 16s 16s ribosomal RNA C-PCR 보다 통계적으로 유의하게 우수함이 확인되었다. 이는 다양한 *Orientia tsutsugamushi* strain 들의 gene sequence 와 비교시 저자 등이 design 한 primer 가 Sonthayanon P. 등이 태국에서 보고한 primer 보다 variation 이 상대적으로 적기때문인 것으로 사료된다.(Table 2) 또한, 저자 등이 design 한 16s C-PCR 의 경우 오히려 46kDa N-PCR 및 Q-PCR 그리고 57kDa N-PCR 보다 통계적으로 유의하게 우수한 diagnostic accuracy 를 보였다.

한편, nested PCR 은 Conventional PCR 보다 100 배 더 민감한 검사법으로서 유용할 수 있으며[11], 2 시간 정도 이내에 결과를 확인 할수 있는 real time PCR 은 조기진단에 또한 매우 유용한 검사방법이다[16]. 하지만, real time PCR 은 cost-effectiveness 에 대한 의문이 제기될 수 있으며, availability 에 제한이 있다. 또한 nested PCR 의 경우 conventional 또는 real

time PCR 에 비해 검사시간이 더 많이 소요되며, DNA contamination 의 가능성이 더 높은 단점이 제기될 수 있다[20]. 그러나, conventional PCR 은 수시간 이내에 결과를 도출할 수 있으므로 열성질환으로 내원한 환자에 대해 Scrub typhus 를 진단을 도출하는데 nested PCR 보다 신속하다. 또한, conventional PCR 은 검사단계가 상위의 PCR 기법에 비해 간단하며, 상대적으로 고가의 장비나 인력의 요구정도가 낮다. 그러나, conventional PCR 이외의 PCR 들은 상대적으로 고비용이 소요되며, 고가의 장비와 숙련된 인력이 필요함을 고려할 때 1,2 차 의료기관에서는 보편적으로 시행하기 어려운 단점이 있다. 그러므로, conventional PCR 이 nested, realtime PCR 보다 반드시 열등한 검사로만은 평가할 수는 없다. 또한 본 연구에서는 16s ribosomal RNA conventional PCR 의 경우 다른 gene 을 target 으로 한 nested 또는 realtime PCR 보다 더 우수한 결과를 보여 conventional PCR 의 임상적 가치에 대한 제고가 필요하다.

결론적으로 급성 열성질환으로 내원한 환자에서 scrub typhus 가 의심될 경우, 16s ribosomal RNA gene 을 coding 하는 gene 을 target 으로 한 conventional PCR 은 47kDa 또는 57kDa protein 을 coding 하는 gene 을 target 으로 한 conventional PCR 에 비해 우월한 diagnostic accuracy 를 보이는 진단법으로 적용될 수 있겠다. 또한, 이 연구에서, 47kDa 또는 57kDa protein 을 coding 하는 gene 을 target 으로 한 Nested 또는 real time PCR 에 비해 우월한 diagnostic accuracy 를 나타낸 점에 대해서는 conventional PCR 의 임상적 유용성에 대해 시사하는 바가 크다고 할 수 있겠다.

REFERENCES

1. Coenye T, Vandamme P. Intragenomic heterogeneity between multiple 16S ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. FEMS Microbiol Lett. 2003;228(1):45-9.
2. Clarridge JE, III. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clin Microbiol Rev. 2004 October 1, 2004;17(4):840-62.
3. Elisberg BL, Campbell JM, Bozeman FM. Antigenic diversity of rickettsia tsutsugamushi: epidemiologic and ecologic significance. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1968;12(1):18-25.
4. Kim DM, Lim SC, Won KJ, Choi YJ, Park KH, Jang WJ. Severe scrub typhus confirmed early via immunohistochemical staining. Am J Trop Med Hyg. 2007 Oct;77(4):719-22.
5. Kim DM, Kim HL, Park CY, Yang TY, Lee JH, Yang JT, et al. Clinical usefulness of eschar polymerase chain reaction for the diagnosis of scrub typhus: a prospective study. Clin Infect Dis. 2006 Nov 15;43(10):1296-300.
6. Jensenius M, Fournier PE, Raoult D. Rickettsioses and the international traveler. Clin Infect Dis. 2004 Nov 15;39(10):1493-9.
7. Tsay RW, Chang FY. Serious complications in scrub typhus. J Microbiol Immunol Infect. 1998 Dec;31(4):240-4.
8. Cracco C, Delafosse C, Baril L, Lefort Y, Morelot C, Derenne JP, et al. Multiple organ failure complicating probable scrub typhus. Clin Infect Dis. 2000 Jul;31(1):191-2.
9. Blacksell SD, Bryant NJ, Paris DH, Doust JA, Sakoda Y, Day NP. 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. 2007 Feb 1;44(3):391-401.
10. Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Kawamori F, Yamamoto S, Ohashi N, et al. Specific amplification of Rickettsia tsutsugamushi DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991 Nov;29(11):2628-30.
11. Murai K, Tachibana N, Okayama A, Shishime E, Tsuda K, Oshikawa T. Sensitivity of polymerase chain reaction assay for Rickettsia tsutsugamushi in patients' blood samples. Microbiol Immunol. 1992;36(11):1145-53.
12. Horinouchi H, Murai K, Okayama A, Nagatomo Y, Tachibana N, Tsubouchi H. Genotypic identification of Rickettsia tsutsugamushi by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA amplified by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg. 1996 Jun;54(6):647-51.
13. Jiang J, Chan TC, Temenak JJ, Dasch GA, Ching WM, Richards AL. Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for Orientia tsutsugamushi. Am J Trop Med Hyg. 2004 Apr;70(4):351-6.
14. Kim HS, Kim DM, Neupane GP, Lee YM, Yang NW, Jang SJ, et al. Comparison of conventional, nested, and real-time PCR assays for rapid and accurate detection of Vibrio vulnificus. J Clin Microbiol. 2008 Sep;46(9):2992-8.
15. Sonthayanon P, Chierakul W, Wuthiekanun V, Blacksell SD, Pimda K, Suputtamongokol Y, et al. Rapid Diagnosis of Scrub Typhus in Rural Thailand Using Polymerase Chain Reaction. Am J Trop Med Hyg. 2006 December 1, 2006;75(6):1099-102.

16. Park H-S, Lee J-H, Jin K-H, Jang W-J, Park K-H, Kook Y-H, et al. Rapid Identification of Rickettsiae using the Real-Time PCR Journal of Bacteriology and Virology. 2008;38(4):221-6.
17. Kim DM, Yun NR, Yang TY, Lee JH, Yang JT, Shim SK, et al. Usefulness of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus in clinical practice: A prospective study. Am J Trop Med Hyg. 2006 Sep;75(3):542-5.
18. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovach Z, et al. Novel real-time PCR assay for detection of Helicobacter pylori infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4512-8.
19. Silpapojakul K, Chupuppakarn S, Yuthasompob S, Varachit B, Chaipak D, Borkerd T. Scrub and murine typhus in children with obscure fever in the tropics. Pediatr Infect Dis J. 1991 Mar;10(3):200-3.
20. Lee SE, Kim SY, Kim SJ, Kim HS, Shin JH, Choi SH, et al. Direct identification of Vibrio vulnificus in clinical specimens by nested PCR. J Clin Microbiol. 1998 Oct;36(10):2887-92.

Table 1. Oligonucleotide primers and a probe used in this study and PCR condition.

PCR assay	Primers and a probe name(Sequence)	product size(bp)	Ref
16s ribosomal RNA C-PCR	O.t-16sRF1 (AGGGATGATAATGACAGTACCTACAG) O.t-16sRR1 (CCTCTACCATACTCTAGCCTAACAG)	199	
16s ribosomal RNA C-PCR (Sonthayanon P.)	16-OT1-F (CGAATTAATGCTGAGTTTGCTTAG) 16-OT1-R (CTCTCAGACCAGCTACAGATCACA)	210	13
groEL-STG C-PCR	STG-F1(TF1) (ATATATCACAGTACTTTGCAAC) STG-R1(TR2) (GTTCCTAACTTAGATGTATCAT)	366	14
47kDa N-PCR (External Primer)	OtsuFP555 (5'-TCCTTTCGGTTTAAGAGG AACA- 3') OtsuRP771 (5'-GCATTCAACTGCTTCAAGTACA- 3')	238	
47kDa N-PCR (Internal Primer)	OtsuFP630 (5'-AACTGATTTTATTCAACTAATGCTGCT- 3') OtsuRP747 (5'-TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT- 3')	118	11
47kD C-PCR/Q-PCR	OtsuFP630 (5'-AACTGATTTTATTCAACTAATGCTGCT- 3') OtsuRP747 (5'-TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT- 3')	118	11
56kD N-PCR (External Primer)	P34 (5'-TCAAGCTTATTGCTAGATCTGC- 3') P55 (5'-AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG- 3')	1003	15
56kD N-PCR (Internal Primer)	P10 (5'-GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC- 3') P11 (5'-CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC- 3')	483	15
56kD C-PCR	P10 (5'-GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC- 3') P11 (5'-CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC- 3')	483	15

Table 2. Comparison of sequences of designed primers with 16s ribosomal RNA genes of various *Orientia tsutsugamushi* strains.

Orientia tsutsugamsushi strain 16s rRNA gene	accession No.	Forward Primer Position	Reverse Primer Position
Orientia tsutsugamushi strain 07-280	HM352765	AGGGATGATAATGACAGTACCTACAG ---------+---------+----- 416 442 ---------+---------+-----	CTGTTAGGCTAGAGTATGGTAGAGG ---------+---------+----- 592 616 ---------+---------+-----
primer(Kim)		.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain 07-280	HM352765	.....	.....
Rickettsia tsutsugamushi strain Gilliam	D38622	.....	.....
Rickettsia tsutsugamushi strain Kato	U17258	.....	.....G.....
Orientia tsutsugamushi strain Karp	D38623	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Boryong	AM494475	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Kuroki	D38626	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Kawasaki	D38625	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Litchfield	AF062074	.....	.....A.....G.....
Orientia tsutsugamushi	AF478127	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain TA763	AF479299	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain TH1817	AF479300	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain TA678	AF479301	.....	.....
Orientia tsutsugamushi strain TA686	AF479302	.....	.....A.....G.....
Orientia tsutsugamushi strain TC586	AF479303	.....	.....A.....
Orientia tsutsugamushi strain Ikeda	AP008981	.....	.....G.....
Orientia tsutsugamushi strain Shimokoshi	D38627	.....	.....A.....G.....
Orientia tsutsugamushi strain 07-280	HM352765	CGA-ATTAATGCTGAGCTTGC-TTAG --- ------+--------+ --- 40 65 --- ------+--------+ ---	TGTGATCTGTAGCTGGTCTGAGAG ---------+---------+---- 251 274 ---------+---------+----
primer(Sonthayanon P.)		...-.....T....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain 07-280	HM352765	...-.....-....	.....
Rickettsia tsutsugamushi strain Gilliam	D38622	...-.....T....-....	.....
Rickettsia tsutsugamushi strain Kato	U17258	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain karp	D38623	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Boryong	AM494475	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Kuroki	D38626	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Kawasaki	D38625	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Litchfield	AF062074	...-.....T.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi	AF478127	..GT.AC.GGAGAA.....T..CT	GAC.....C.....
Orientia tsutsugamushi strain TA763	AF479299	...-.....-----..	.....
Orientia tsutsugamushi strain TH1817	AF479300	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain TA678	AF479301	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain TA686	AF479302	..----------COCC	GAC....C.....
Orientia tsutsugamushi strain TC586	AF479303	..----------COCC	GAC....C.....
Orientia tsutsugamushi strain Ikeda	AP008981	...-.....-....	.....
Orientia tsutsugamushi strain Shimokoshi	D38627	...-..C.G.....-....	.....

Table 3. Demographic and clinical data of the patients with suspected scrub typhus.

Characteristics	Scrub typhus	Non-Scrub typhus	Overall
Age, median years(range)	69(17-91)	54(16-93)	67(16-93)
Sex			
Male	39(33.9%)	20(38.5%)	59(35.3%)
Female	76(66.1%)	32(61.5%)	108(64.7%)
Numbers	115	52	167

Table 4. Diagnosis of Non-Scrub typhus group as a febrile control group.

Diagnosis	Values
Viral infection	8
Soft tissue infection	7
Viral hepatitis	5
Hemorrhagic fever with renal syndrome	5
Urinary tract infection	5
Leptospirosis	4
Systemic lupus erythematosus	4
Malaria	3
Infectious colitis	2
Viral meningitis	2
Intraabdominal abscess	2
Cryptococcosis	2
Acute cholangitis	1
AIDS with Pneumocystis jiroveci	1
Pulmonary tuberculosis	1
Total numbers	52

Table 5. PCR Results according to target genes and PCR methods.

Pati-ents	impression	Results by protein genes and applicated PCR assays								
		47kDa			56kDa		groEL	16s ribosomal RNA		
		C	N	Q	C	N	C	C^{Thai}	N^{Thai}	C
1	Viral infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Viral infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Viral infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Viral infection	0	0	1	0	0	0	0	0	0
5	Viral infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Viral infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Viral infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Viral infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Soft tissue infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Soft tissue infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Soft tissue infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	Soft tissue infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	Soft tissue infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	Soft tissue infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	Soft tissue infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	Viral hepatitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	Viral hepatitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	Viral hepatitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	Viral hepatitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	Viral hepatitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	HFRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	HFRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	HFRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	HFRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	HFRS	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	Urinary tract infection	0	0	1	0	0	0	0	0	0
27	Urinary tract infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	Urinary tract infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	Urinary tract infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	Urinary tract infection	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	Leptospirosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	Leptospirosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	Leptospirosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	Leptospirosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	Systemic lupus erythematosus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	Systemic lupus erythematosus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	Systemic lupus erythematosus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	Systemic lupus erythematosus	0	0	0	0	0	0	0	0	0

39	Malaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	Malaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	Malaria	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42	Infectious colitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	Infectious colitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	Viral meningitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	Viral meningitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	Intraabdominal abscess	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	Intraabdominal abscess	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	Cryptococcosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	Cryptococcosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	Acute cholangitis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	AIDS with Pneumocystis jirovecii	0	0	0	0	0	0	0	0	0
52	Pulmonary tuberculosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	1
54	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
55	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
56	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
57	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
58	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
59	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
60	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
61	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
62	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
63	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
64	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	1	1
65	Scrub typhus	1	1	1	0	1	1	1	0	1
66	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
67	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
68	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
69	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
70	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
71	Scrub typhus	1	1	1	0	1	1	1	1	1
72	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
73	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
74	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
75	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
76	Scrub typhus	0	0	0	0	1	0	0	0	0
77	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
78	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
79	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
80	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
81	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1

82	Scrub typhus	1	1	0	0	1	1	1	1	1
83	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
84	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
85	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
86	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	0	1	1
87	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
88	Scrub typhus	0	1	1	0	0	1	0	1	1
89	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
90	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	0	1	1
91	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	
92	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	0	1	1
93	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
94	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
95	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
96	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
97	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
98	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
99	Scrub typhus	0	1	1	1	1	1	0	1	1
100	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
101	Scrub typhus	0	1	0	0	1	1	1	1	1
102	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
103	Scrub typhus	0	1	1	1	1	1	1	1	1
104	Scrub typhus	0	1	1	1	1	1	0	1	1
105	Scrub typhus	0	1	0	0	0	0	0	1	1
106	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	0	1	1
107	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
108	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
109	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
110	Scrub typhus	0	1	0	0	0	0	0	1	1
111	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
112	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	1	1
113	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
114	Scrub typhus	0	1	1	1	1	0	0	1	1
115	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
116	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
117	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
118	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
119	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
120	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
121	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
122	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
123	Scrub typhus	0	0	0	0	1	0	0	0	0
124	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	0	1	1
125	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1

126	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
127	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
128	Scrub typhus	0	1	1	1	1	1	1	1	1
129	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
130	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
131	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	0	1	0
132	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
133	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
134	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
135	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
136	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
137	Scrub typhus	0	1	1	1	1	1	1	1	1
138	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
139	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
140	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	0	1	1
141	Scrub typhus	0	1	0	0	0	0	0	1	1
142	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
143	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
144	Scrub typhus	0	0	0	1	0	0	0	0	0
145	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	0	1	1
146	Scrub typhus	0	1	0	1	0	0	0	1	1
147	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
148	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	1
149	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	1
150	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
151	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
152	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
153	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	0
154	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	0	1	1
155	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	1	1	1
156	Scrub typhus	0	0	1	0	1	0	0	1	1
157	Scrub typhus	0	1	0	0	1	1	1	1	1
158	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
159	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
160	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
161	Scrub typhus	0	1	1	0	1	0	0	1	1
162	Scrub typhus	0	0	0	1	0	1	0	0	0
163	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
164	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
165	Scrub typhus	0	0	0	0	1	0	1	1	1
166	Scrub typhus	0	1	1	0	1	1	1	1	1
167	Scrub typhus	0	0	0	0	0	0	0	0	1

- 1;postive result, 0;negative result, C; conventional PCR, N; nested PCR, Q; realtime PCR
- C^{Thai} , N^{Thai} ; conventional, Nested PCR using primers designed by Sonthayanon P. et. al.

Figure 1. Comparison of ROC curves of 16s ribosomal RNA conventional PCR with other conventional PCR.

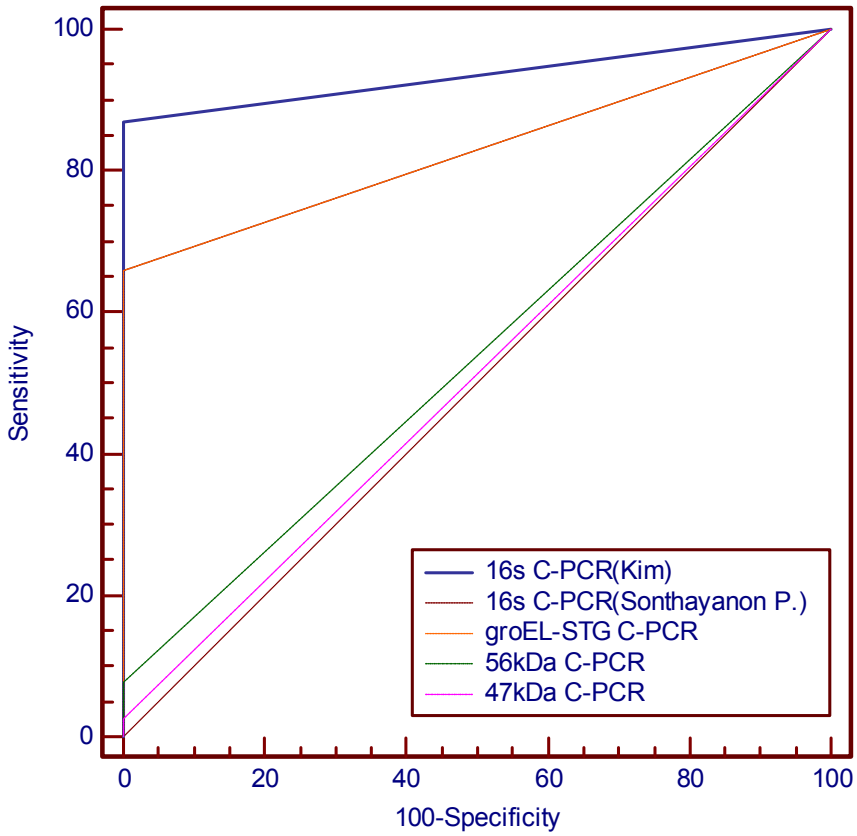
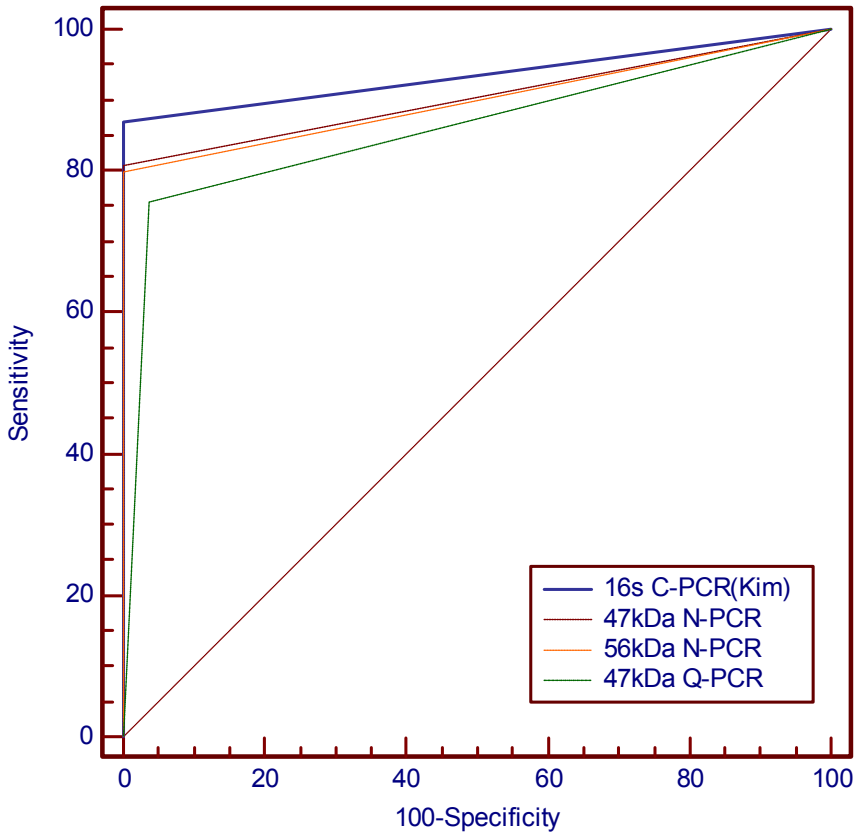


Figure 2. Comparison of ROC curves of 16s ribosomal RNA conventional PCR with other nested, real time PCR.



저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20087220	과 정	석사
성 명	한글: 조민근	한문 : 趙敏根		영문 : Cho Min-Keun	
주 소	광주시 북구 중흥동 716-6 번지				
연락처	E-MAIL : chominkeun@hanmail.net				
논문제목	한글 : Scrub typhus 의 진단에 있어서 16s ribosomal RNA gene 을 이용한 conventional PCR 의 임상적 유용성 영어 : Clinical usefulness of Conventional PCR based on the 16s ribosomal RNA gene for the Diagnosis of Scrub typhus				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB 구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집・형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포・전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5 년으로 하고, 기간종료 3 개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1 개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송・출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2010 년 8 월 25 일

저작자: 조 민 근 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하