



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](#)

2013년 2월

박사학위논문

뜨뜨가무시병 진단에서
등온증폭법과 중합효소 연쇄반응의
비교분석

조선대학교대학원

보건학과

장미선

쯔쯔가무시병 진단에서
등온증폭법과 중합효소 연쇄반응의
비교분석

Comparison of the Loop-Mediated Isothermal
Amplification Assay (LAMP) and Polymerase Chain
Reaction (PCR) for the Diagnosis of Scrub Typhus

2013 년 2 월 25 일

조선대학교대학원

보건학과

장미선

뜨뜨가무시병 진단에서
등온증폭법과 중합효소 연쇄반응의
비교분석

지도교수 김 동 민

이 논문을 보건학 박사학위신청 논문으로 제출함

2012년 10월

조선대학교 대학원

보 건 학 과

장미선

장미선의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 박 종(인)

위 원 조선대학교 교수 장숙진(인)

위 원 조선대학교 교수 임성철(인)

위 원 광주보건대학교 교수 송현재(인)

위 원 조선대학교 교수 김동민(인)

2012년 12월

조선대학교 대학원

목 차

목 차.....	I
표 목 차.....	III
그림목차.....	IV
ABSTRACT.....	V
I. 서론.....	1
II. 실험 및 방법.....	4
1. 연구대상.....	4
2. 연구방법.....	4
A. 면역형광법 (IFA).....	4
B. <i>Orientia tsutsugamushi</i> DNA 추출.....	5
C. 47 kDa protein gene cloning.....	5
D. 47 kDa protein gene LAMP.....	6
E. 47 kDa protein gene Quantitative real-time PCR.....	7

F. 47 kDa protein gene Conventional PCR.....	8
G. 47 kDa protein gene Nested PCR	8
III . 결과	9
1. 47 kDa protein gene LAMP 의 각각 최적 primer 및 적정온도 찾기.....	9
2. 47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP 의 민감도 확인.....	10
3. 47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP 의 특이도 확인	10
4. 47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP 와 C-PCR, N-PCR, Q-PCR 양성을 비교	11
IV . 고찰	12
V . 요약 및 결론	17
VI . 참고문헌.....	18

표 목 차

Table 1. A total of 72 patients in the indirect immunofluorescence assay (IFA) positivity	28
Table 2. Oligonucleotide primers and a probes used in loop-mediated isothermal amplification assay conditions.....	29
Table 3. Condition of working solutions for loop-mediated isothermal amplification assay of 47 kDa protein gene.....	30
Table 4. Oligonucleotide primers and a probe used in this study and polymerase Chain Reaction (PCR) conditions.....	31
Table 5. Appropriate temperature according to the primers of the 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay.....	32
Table 6. Results of C-PCR, N-PCR, Q-PCR and LAMP assays for the detection of <i>Rickettsia</i> species.....	33
Table 7. Comparison of accuracy on 47 kDa protein gene polymerase Chain Reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) against <i>O. tsutsugamushi</i>	34

그림목차

Figure 1. The prior test of 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay using # 25 primers on clinical samples	35
Figure 2. Isothermal amplification of 47 kDa protein gene of Clinical samples (genomic DNA).....	36
Figure 3. The sensitivity of the 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay performed using #25primers	37
Figure 4. The specificity of the 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) performed using #25primers	38

ABSTRACT

Comparison of the Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay (LAMP) and Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Diagnosis of Scrub Typhus

Mi-Sun Jang

Advisor: Prof. Dong-Min Kim M.D. Ph.D.

Department of Public Health

Graduate school of Chosun University

The causative agent of scrub typhus is *Orientia tsutsugamushi*, and is transmitted by the bite of an infected chigger. It is the representative acute febrile disease shown up for the autumn season in Korea. It shows good response to antibiotic therapy. However when diagnosis is delayed serious complications such as pneumonia, acute renal failure, encephalitis, upper gastrointestinal bleeding, and death may develop.

Rapid and accurate diagnosis for appropriate treatment is required. Loop-mediated Isothermal Amplification Assay (LAMP) and Polymerase Chain Reaction (PCR) were compared to detect against a 47 kDa protein gene of *O. tsutsugamushi* for the diagnosis of scrub typhus.

In this study, we used the specimens of 72 adult patients aged 18 years or older who visited Chosun University Hospital between September 2006 and December 2008 within 4 weeks of fever onset. Scrub typhus was confirmed as a four-fold greater increase in antibody titers or Ig M antibody greater than 1:10 measured by Indirect Immunofluorescence Assay

The LAMP assay had a sensitivity of 17.31% (n = 9) and Q-PCR of 73.08% (n = 38) out of 52 positive samples. The LAMP assay performed without Loop-primers showed a sensitivity of 61.54%. Both LAMP and PCR assays evaluated were 100% specific for *O. tsutsugamushi*.

In conclusion, the LAMP assays targetting a 47 kDa protein gene of *O. tsutsugamushi* are not more sensitive than Q-PCR for the diagnosis of scrub typhus, even though it is more simple and easier to achieve.

Key word : *Orientia tsutsugamushi*, LAMP, PCR

1. 서론

쯔쯔가무시병(scrub typhus)은 초원열, 열대 티푸스로 알려져 있으며 우리나라에서는 신증후군 출혈열, 렙토스피라증, 발진열 등과 함께 가을철에 발생하는 대표적인 급성 열성 질환으로, 일본, 태국 및 필리핀과 같은 동남아시아에 광범위하게 분포하고 있다(1-4).

쯔쯔가무시병은 들쥐 및 야생동물에 기생하는 병원균인 *Orientia tsutsugamushi* 에 감염된 털진드기의 유충(chigger mite)이 축축한 토양, 관목숲이 우거진 지역에서 사람의 피부를 물어 조직액을 흡입하는 순간 균이 사람의 몸속에 들어가 감염을 일으키게 된다(2,5).

최근 들어 쯔쯔가무시병이라고 명백하게 정의되지 않았지만, 두바이에서 *Orientia chuto* 라는 *Orientia* 의 새로운 종이 발견되었고(6) 뿐만 아니라 칠레에서 또한 쯔쯔가무시병과 유사한 질병이 보고되었다(7,8).

이와 같은 보고는 세계각지에 질병이 점차적으로 확대되어질 수 있음을 보여주므로, 서로 다른 지역에서도 여러 종의 *Orientia* 를 검출 할 수 있는 빠르고 정확한 방법이 필요하다는 것을 보여준다(5-8). 쯔쯔가무시병의 임상증상은 보통 1 - 3주일 정도의 잠복기를 거쳐 나타나는데, 갑작스럽게 시작되는 오한, 발열, 두통을 초기 증상으로 기침, 근육통, 오심, 구토가 동반된다. 그리고 발병 7일 후 몸통에서 시작 되어 사지로 퍼지는 소양감이 동반되지 않는 반점모양의 구진상 피부 발진이 나타나고, 털진드기 유충에 물린 자리에서 쯔쯔가무시병의 가장 특징적인 증상이 보인다. 그 증상은 가려움증 및 압통이 동반되지 않는 0.5 - 2 cm 크기의 가운데가 검은 가피(eschar)가 형성되어 이는 초기 진단에 도움을 준다(9-14).

쯔쯔가무시병의 임상경과를 살펴보면 대부분 중증도가 높지는 않지만

진단이 늦어 치료가 늦추어 질 경우 폐렴, 급성신부전증, 위장관 출혈, 심근염 등의 합병증이 나타나고 심각할 경우 사망에 이르기도 한다(14-18).

이에 쓰쓰가무시병의 적절한 치료 및 관리를 위해 신속하고 정확한 진단방법이 필요하다.

쓰쓰가무시병을 진단하기 위한 방법에는 혈청학적인 방법과 분자생물학적 방법이 이용된다(7,14).

먼저 혈청학적 방법으로는 간접면역형광법(Indirect Immunofluorescence Assay, IFA)이 사용되는데, 항체역가가 4배 이상 상승된 소견을 진단에 이용하기 때문에 환자의 추적검사가 필요하지만 환자의 재방문 자체가 쉽지 않아 모든 환자에서 확인 할 수 없다는 단점이 있고 환자혈청에 항체가 오래 남아있기 때문에 과거 감염과의 구분이 쉽지 않아 지역적으로 감염이 주로 발생하는 곳에서는 환자의 진단에 어려움이 있다(7,19-21).

분자생물학적 방법으로는 주로 중합효소연쇄반응법(polymerase chain reaction, PCR)이 사용되는데(7), 56 kDa, 47 kDa 과 GroEL 을 포함하여(7, 22-24), 다양한 유전자를 대상으로 한 quantitative real-time PCR(Q-PCR) 및 nested PCR(N-PCR) 등이 이용된다. PCR 은 매우 복잡한 유전자 DNA 증폭을 이용하는 방법으로 실험 절차가 까다롭고 어려워 충분한 기계 등의 자원이 갖추어지지 않은 지역에서 사용하기가 어려운 단점이 있다(7, 25).

이에, 질병발생이 많고 토착화된 지역에서는 손쉽고 빠르게 진단을 할 수 있는 민감하고 특이적인 방법이 필요하다(7).

Notomi 등(26)에 의해 고안된 등온증폭법(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)은 기존 PCR 과 유사하지만, 일반적인 PCR 이 2개의 primer를 사용하는 것과는 달리 6개의 유전자 위치를 인지하는 4개의 primer를 사용함으로써 대상이 되는 DNA에 대한 특이도가 높아진다고 보고되어왔다(27-30).

또한 LAMP 는 PCR 에서 사용되어온 *Taq.* polymerase 가 아닌 *Bst.* polymerase 를 사용하여 이중나선구조가 열에 의한 변성을 거치지 않고, 등온에서 특정 유전자에서 고리구조를 이용하여 증폭시키는 과정을 거친다.

이 방법은 일정한 온도에서 신장 및 접합이 가능하고, 상대적으로 반응시간이 짧으며, DNA 의 손상 등이 적어 증폭의 효율성이 높다(26,27,31-34).

따라서, 등온증폭법은 고가의 PCR 장비가 아닌 일정한 온도의 유지가 가능한 항온수조, 오븐, 온장고와 같은 저가의 장비에서도 증폭이 가능하여 장소 등에 구애 받지 않게 됨에 따라 현장진단에 있어 적용이 쉽다(27,28,35-37). 그리고 다양한 감염성 질병 진단방법 비교 연구를 보면, LAMP 역시 PCR 및 Q-PCR 과 비슷하게 높은 민감도를 보인다고 알려져 있다(7, 38-42). 또한 LAMP 는 찻찻가무시병 환자 10 개의 샘플 중 9 개에서 양성으로 확인 되고, 10 개의 음성 샘플 중 2 개를 제외한 8 개에서 음성으로 나왔다는 Erin 등(7)의 연구결과가 있었다.

이와 같은 LAMP 분석은 다양한 감염성 질병에 대한 진단 및 임상적용에 활발히 이용되고 있지만, *O. tsutsugamushi* 를 대상으로 한 LAMP 연구는 극히 드물다. 따라서 LAMP 가 찻찻가무시병 진단에 있어서 유용하게 적용될 수 있는지에 대해 알아보려고 하였다.

이에 본 저자는, *O. tsutsugamushi* 를 검출하는데 있어, 47 kDa protein gene 을 대상으로 하여 LAMP 와 PCR 을 시행하여 그 결과 등을 비교 분석하고자 한다.

II. 실험 및 방법

1. 연구대상

2006년 9월부터 2008년 12월까지, 급성열성질환으로 조선대학교 병원에 내원한 18세 이상의 성인 환자를 대상으로 환자 및 보호자의 동의를 얻은 후 시행한 연구 후 남아있는 검체를 이용하여 검사를 시행하였다.

임상시료로는 총 72 명의 임상 샘플 중, IFA 결과 Ig M 항체가(titer)가 1:10 이상 증가되거나 급성기와 회복기의 항체가가 4 배 이상 증가한 소견을 보여 쯔쯔가무시병 환자로 정의하여, 52 명의 임상 샘플을 양성 실험군으로 사용하였고, 쯔쯔가무시병을 제외한 다른 진단명을 가진 20 명의 임상 샘플을 가지고 본 실험의 음성 대조군으로 사용하였다(Table 1).

2. 연구방법

A. 간접면역형광법 (IFA; Indirect Immunofluorescence Assay)

IFA test 는 Robinson 등(43) 이 기술한 방법을 약간 수정, 보완하여 표준 *O. tsutsugamushi* 항원 (Gilliam, Karp, Kato 과 Boryong)에 대한 Ig M 과 Ig G 항체를 조사하고자 다음과 같은 방법을 이용하였다.

수집된 혈청을 PBS (phosphate buffer saline) 에 1:16 비율로 희석하여 2 배수 연속 희석시킨 뒤 *Orientia* 항원이 찍혀있는 슬라이드에 떨어뜨렸다.

일차반응으로 37°C에서 20 분간 incubation 하고, PBS 와 증류수로 세척한 후 슬라이드를 말렸다. 그리고 FITC-conjugated goat anti-mouse Ig M, Ig G(CDC, Korea)를 각각의 slide 에 떨어뜨리고 37°C에서 이차반응으로 다시 한번 20 분간 incubation 시켰다. 그런 다음 PBS 와 3 차 증류수로 세척 및 건조시키고, 마지막으로 건조된 슬라이드 위에 커버글라스를 씌우고

400 배로 확대한 형광현미경(Axioskop2;Carl Weiss, Germany)으로 결과를 판독하였다(9,44). *O. tsutsugamushi* 에 대한 IFA Ig M 항체가(titer)가 1:10 이상이거나 또는 급성기와 회복기의 항체가가 4 배 이상 증가하였을 경우 쯔쯔가무시병 항체 양성으로 정의하였다(21).

B. *O. tsutsugamushi* DNA 추출

세포내에 존재하는 *Orientia* 의 DNA 정제를 위해 전혈 중의 백혈구 연층(Buffy coat)을 채취한 후 QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 다음과 같은 방법으로 DNA를 정제하였다.

200 μ l 백혈구 연층 에 proteinase K 20 μ l를 넣어 섞은 후, AL buffer 200 μ l를 넣고 56°C water bath에서 10 분 동안 반응시켰다. 그리고 Ethanol 200 μ l(100%)를 넣고 15 초간 vortexing 한 다음 spin column 으로 옮겨 14,000 rpm으로 원심분리 하였다. Washing buffer인 AW1 500 μ l를 넣고 8,000 rpm으로 원심분리 시킨 후, AW2 500 μ l를 넣고 14,000 rpm으로 원심분리 하였다. 마무리단계로 AE buffer 70 μ l를 넣은 후 8,000 rpm에서 1 분간 원심분리를 두 번 반복하였다. 이러한 방법으로 추출된 DNA 는 -20°C 냉장고에 보관하면서 실험에 이용하였다(9,44).

C. 47 kDa protein 유전자 클로닝

O. tsutsugamushi Gililliam형의 47 kDa 항원의 유전자 정보를 함유한 nucleotide sequence인 L11697 (GenBank accession no.)를 근거로 OtsuFPS622 와 OtsuRPS622(45) primer 로 이용하여 다음과 같은 방법으로 gene cloning 을 진행하였다.

PCR은 DNA 1 μ l, 2.5 U의 *Taq* DNA polymerase (Takara Bio, Japan) 0.2 μ l, 10 μ M의 OtsuFPS622 primer와 OtsuRPS622 primer 각각 1 μ l, dNTPs 2

μl , 10X PCR buffer 2 μl , 그리고 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 μl 의 반응액을 만들었다.

PCR(Applied Biosystems Veriti™ 96-well thermal cycler) 수행조건으로 94°C에 5분 pre-denature 한 후, 94°C에서 30 초, 56°C에서 30 초, 72°C에서 1 분의 3 단계를 39 주기로 하였으며, 마지막으로 72°C에서 10 분 동안 연장시켰다. PCR 산물을 0.5 ng/ml ethidium bromide (Etbr, bioneer, Korea)을 넣은 1.2% agarose gel (Seakem® LE agarose, Lonza, Rokland, ME, USA)에 100 V (0.5X TBE buffer)로 전기영동(Electrophoresis)하였다. PCR 결과 산물로 증폭된 DNA 를 QIAquick® gel extraction kit (Qiagen, Germany)로 정제하였다. 정제된 DNA 는 pGEM-T easy vector(Promega, Madison, WI, USA) 에 ligation 하여 *E. coli* 에 형질전환 시킨 후 X-gal 과 IPTG 를 넣어준 LB plate 상에 도말하여 30°C에서 배양하였다.

이렇게 선별한 집락을 ampicillin (50 mg/ml)을 넣은 LB broth에 배양하여 plasmid DNA를 Gene ALL™ Plasmid Quick kit (General Biosystems, Korea)로 정제하였다.

D. 47 kDa protein gene LAMP

LAMP 는 GeneBank 에 등록 되어있는 *O. tsutsugamushi* 의 Karp strain 의 47 kDa protein gene 의 sequence (Accession No. L31934)를 바탕으로 하였다. 각각 두 세트의 outer 인 F3/B3, 두 개의 inner 인 FIP/BIP 의 primer 그리고 고리형성을 가속화시킬 수 있는 Loop primer 인 FLP/BLP 로 구성되었다. 그리고 모든 LAMP primer 는 Primer Explore version4 를 이용하여 디자인 하였다 (7).

위와 같이 디자인된 primer 들은 bioneer 사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 주문제작 하였고, inner primer 인 FIP/BIP 는 PAGE 정제된 것을 사용하였다.

이에 LAMP는 위의 과정과 같은 방법으로 실시된 Erin Huber 등(7) 이 디자인한

#5 primer에 FLP/BLP primer를 추가하여 사용하였고, 본 연구를 위하여 디자인한 #25, #38 Lamp primer set (Table 2)를 사용하여 Isothermal Master Mix (1X) 시약과 Genie II[®] (OptiGene, Horsham, West Sussex, UK) 장비로 수행되었다.

LAMP 는 총 20 μl 의 반응 액으로 genomic DNA 는 1 μl , 8 pmole 의 F3, B3 primer 와 40 pmole 의 FIP, BIP primer, 20 pmole 의 FLP/BLP primer, 1x Isothermal master mix, 1 μl SDW 로 수행하였다 (Table 3). 수행조건으로 63 °C 에서 40 분 동안 증폭시켰다.

LAMP 의 결과 증폭된 샘플은 2 μl Gel Red 를 넣은 1% Agarose gel(Seakem[®] LE agarose)에 Bioneer electrophoresis machine (Bioneer, Daejeon, Korea)으로 100V (0.5X TBE, Bioneer, Korea)에 20 분간 전기영동 하여 250 bp 에서 특정 band 를 확인 하였다.

E. 47 kDa protein gene Q-PCR

Plasmid DNA 의 정량은 spectrophotometer (DU[®] 530 Life science UV/vis spectrophotometer, BECKMAN COULTER)를 이용하였다.

Plasmid DNA 는 1×10^8 copies / μl 를 기준으로 10 배 희석하여 standard curve 를 구하였으며, Q-PCR 은 총 20 μl 의 반응액(5 μl 의 genomic DNA, 각각 1 μl 씩의 5 pmole/ μl forward 와 reverse primer (OtsuFP630 and OtsuRP747(45)(Table 4)), 1 μl 의 2 pmole/ μl probe (OtsuPR665), 4 μl 의 master mix (reaction buffer, Fast Start Taq DNA polymerase, MgCl₂ and dNTP (with dUTP instead of dTTP)), and water)으로 수행하였다.

반응은 95°C에서 10 분, 그리고 두 단계의 95°C 10 초, 60°C 30 초를 45 주기로 하며, 40°C에서 30 초 진행하였다. Q-PCR 은 Light Cycler software 4.0 program 으로 결과를 분석하였다.

F. 47 kDa protein gene Conventional PCR (C-PCR)

47 kDa protein gene 을 대상으로한 OtsuFP630 와 OtsuRP747 Primer(45)(Table 4)를, 2X EXCEL-Taq™ PreMix (Taq polymerase 2U, 400 μM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂ KCl and Tris-Cl, Bioneer, Korea), 증폭하고자 하는 DNA 2 μl 그리고 멸균된 3 차 증류수로 총 20 μl를 만들어 수행하였으며, PCR 조건은 94°C에 10 분, 그리고 94°C에 1 분, 60°C에 1 분, 72°C에 1 분의 3 단계를 30 주기로 하며, 마지막으로 72°C에서 7 분 동안 연장시켰다.

G. 47 kDa protein gene nested PCR (N-PCR)

*Orientia tsutsugamushi*의 47 kDa protein gene 경우, internal primer 로 OtsuFP630와 OtsuRP747(45)를, external primer로는 OtsuFP555와 OtsuRP771을 사용하였다(Table 4). 첫 번째 PCR은 primer(10 pmoles/ μl OtsuFP555와 OtsuRP771), 2X EXCEL-Taq™ PreMix (Taq polymerase 2U, 400 μM dNTPs, 2.0 mM MgCl₂ KCl and, Tris-Cl), DNA 그리고 멸균된 3차 증류수로 총 50 μl를 만들어 수행하였으며, 그 수행조건은 C-PCR의 수행조건과 같지만 결합온도는 56°C로 하였다. 두 번째 PCR 반응은 첫 번째 반응액에서 primer를 OtsuFP630과 OtsuRP747 (10 pmoles/ul)로 바꾸며 template로 첫 번째 PCR 산물을 2 μl 넣는다. PCR 산물은 2% agarose gel에서 100 V (Embi Tec, Sandiego, USA) 전기 영동 하여 100 bp 의 특정 band를 확인 하였다.

III. 결과

1.47 kDa protein gene LAMP 의 각각 최적 primer 및 적정온도

LAMP 의 최적 반응 조건을 측정하기 위하여 *O. tustusgamushi* 의 4 가지 항원 중 Boryong 을 1:100 으로 희석하여 주형 DNA 로 사용 하였고, 적정 온도 측정을 위해 본 연구를 위해 디자인 및 수정보완 된 각각 3 쌍의 #5, #25, #38 primer 를 60 °C ~ 67°C 로 각기 등온 조건을 유지시킨 후, 30 ~ 40 분 동안 47 kDa protein gene LAMP 를 진행 하였다.

각각 3 쌍으로 이루어진 #5, #25, #38 primer 는 모두 63°C에서 증폭이 활발함을 확인 하여 각각의 primer 마다 반응 시간은 11 분, 13 분, 33 분으로 달랐음을 확인 할 수 있었다(Table 5).

이에 본 실험에서는 63°C의 등온조건에서 40 분간 수행하는 표준조건으로 하였고, 증폭시간이 길었던 3 쌍의 #38 primer 를 제외한 각각 3 쌍으로 이루어진 #5, #25 primer 를 이용하여 무작위로 정한 10 개의 샘플을 대상으로 47 kDa protein gene LAMP 의 적정 표준 온도 및 조건을 결정하였다.

10 개의 샘플은 각각 찻뜨가무시병 이외의 진단명을 가진 음성 샘플 2 개, 찻뜨가무시병으로 진단된 양성 샘플 8 개로 LAMP 를 수행하였다.

그 결과 수정 보완된 3 쌍으로 이루어진 #5 primer 는 모든 양, 음성 샘플이 증폭이 되어, Erin Huber 등(7)이 디자인한 대로 FLP/BLP 를 제외한 3 쌍의 #5 primer 를 이용하여 수행한 결과 또한 모든 양, 음성 샘플이 증폭됨을 확인하였다. 이에 양, 음성 확인의 불가능으로 임상샘플을 대상으로 한 본 실험에서는 3 쌍으로 이루어진 #5 primer 를 제외시켰다.

본 연구를 위해 디자인된 3 쌍으로 이루어진 #25 primer 는 2 개의 음성샘플에서 증폭되지 않았음을 확인하였고, 8 개의 양성 샘플에서 증폭을 확인하여(Figure 1 & 2), 최종적으로 3 쌍으로 이루어진 #25 primer 를 가지고 민감도, 특이도 및 임상샘플을 대상으로 실험을 수행하였다

2. 47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP 의 민감도 확인

47 kDa protein gene 을 대상으로 한 LAMP 의 경우 Boryong antigen 을 연속 2 배 희석하여 검출한계를 측정한 결과 0.75ng/ μ l 까지 검출 할 수 있음을 확인 하였다 (Figure 3).

3. 47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP 의 특이도 확인

47 kDa protein gene 을 대상으로 한 LAMP 의 기질 특이성 확인을 위하여 *Orientia* 종을 제외한 *Rickettsia* 속 (*Rickettsia honei*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazaki*)(Australian Rickettsial Reference Laboratory, Australia) 을 이용하여 실험을 수행 하였다. 총 8 가지의 *Rickettsia* 종을 가지고 검사를 수행해본 결과 증폭반응이 전혀 나타나지 않았음을 확인하였다 (Table 6)(Figure 4).

4. 47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP 와 C-PCR, N-PCR, Q-PCR 양성률 비교

47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP 와 C-PCR, N-PCR, Q-PCR 을 비교한 결과, 총 72 명의 임상샘플 중 음성대조 샘플 20 개에서 모두 음성으로 나왔다.

총 72 개의 임상 샘플 중 음성대조 샘플 20 개를 제외한, 찻뜨가무시병으로 진단된 52 개를 대상으로 실험을 하였을 때, C-PCR 의 경우 1 개의 임상샘플이

양성으로 확인되어 1.92 %의 양성률을 보였고, N-PCR 의 경우 44 개의 임상샘플이 양성으로 확인 되어 84.62%의 양성률을 보여 가장 높았음을 확인 하였다. 그리고 Q-PCR 의 경우 ct 값이 <40 인 경우를 양성으로 판단하는데, 38 개의 ct 값이 <40 로 나타나 양성으로 판단하여 양성률은 73.08% 로 두번째로 높았음을 확인 하였다.

LAMP 는 반응 시간 안에 증폭되는 경우 또는 반응 후 증폭물이 결합되었을 경우를 양성으로 판단하는데, 9 개만 증폭되어 17.31%의 양성률을 확인하였다(Table 4).

9 개의 샘플 중 2 개는 amplification time 에는 잡히지 않았지만, 81℃에 결합 됨에 따라 양성으로 판단하였고, 나머지는 7 개는 각각 10 분에서 최대 32 분 사이에 증폭된 것을 확인 할 수 있었다.

IV. 고찰

쯔쯔가무시병(scrub typhus)은 병원균인 *O. tsutsugamushi*에 의해서 사람에게 감염을 일으키는 지역 풍토병으로(1,2,5) 우리나라에서는 충청, 전라, 경상도 지역의 농촌을 중심으로 다발하고 있으며, 최근에는 도시지역에서도 환자가 증가하는 추세를 나타내고 있다(46-48).

쯔쯔가무시병의 임상 경과는 중증도가 높지 않으며, 항생제만으로도 잘 치유된다. 그러나 진단이 늦어질 경우 폐렴, 급성신부전, 뇌염, 상부위장관 출혈 및 다기관 기능부전 등의 합병증이 나타나고, 면역력이 약화된 환자들의 경우 사망에 이르기도 한다(9-14). 이에 적절한 치료와 관리를 위해서는 정확하고 신속한 진단이 필요하다

이러한 쯔쯔가무시병의 진단을 위해서 분자 생물학적으로 사용되는 진단 방법으로는 일반적으로 PCR 이 많이 이용되고 현재 민감도와 특이도가 높은 Q-PCR 또한 연구가 활발히 진행되고 있다(23,49,50-52)

이에 본 연구자는 분자 생물학적으로 사용하는 진단 방법인 PCR과 비슷하지만, 일정한 온도에서 핵산을 증폭하여 온도 변화에 따른 시간 손실이 없이 신속하게 진단되며 *Bst.* polymerase 를 사용하여 등온에서 특정 유전자에서 고리구조를 이용하여 증폭시키는 과정을 거치(7,26-32)는 LAMP 방법이 쯔쯔가무시병의 진단을 위한 방법 중 하나로 적절한지 평가하고자 하였다.

이에 47 kDa protein gene을 이용한 C-PCR, N-PCR, Q-PCR 및 LAMP 의 민감도 및 특이도를 비교하고자 하였다. 대상이 되는 47 kDa protein gene 은 *Orientia* 종 중에 *O. chuto*를 제외하고 25종의 *O. tsutsugamushi* 유전형에서 97% 이상의 상동성(7,8,25,53)을 가지고 있어 본 연구에서

분자생물학적 진단방법의 대상으로 선택하였다

다른 PCR 방법과 다르게 LAMP 는 높은 특이성 및 효율성을 나타내기 위해 3 쌍의 primer 를 사용하는데(7,26) 본 연구에서는 각각 3쌍으로 이루어진 #5 primer, #25 primer, #38 primer 3 가지를 사용하여 초기 실험을 진행하였다(Table 1).

총 3가지의 Primer 는 증폭되는 시간적 차이는 있었으나, 증폭온도는 모두 63°C에서가 가장 좋았음을 확인하였다. 하지만 3 쌍으로 이루어진 #38 primer 의 경우 40 분 안팎으로 증폭시간이 상당히 늦었음을 확인 할 수 있었다. Erin Huber 등(7) 이 디자인한 primer 에 loop primer 를 추가 디자인한 3 쌍으로 이루어진 #5 primer 의 경우 임상시료의 양, 음성에 관계없이 모든 시료에서 증폭됨을 확인할 수 있었다(Table 5). 이에 본 실험에서는 #5 primer 와 #38 primer 를 제외하고, 3쌍으로 이루어진 #25 primer 만을 선택하여 실험을 하였다.

김 등(49)의 연구에 따르면 47 kDa protein gene 을 대상으로 C-PCR, N-PCR, Q-PCR 의 민감도를 확인한 결과 환자의 genomic DNA 의 경우에는 C-PCR의 경우 검출이 되지 않았고, N-PCR, Q-PCR 의 경우 환자의 genomic DNA를 가지고 민감도를 확인한 결과 64 fold, 18 fold (Cp, 37.7; 426 copies/ μ l)까지 검출됨을 보고하였다.

47 kDa protein gene 을 이용한 LAMP의 경우 *O. tsutsugamushi* Boryong antigen genomic DNA 를 대상으로 검출한계를 실험한 결과 0.75 ng/ μ l까지 검출됨을 확인하였다(Figure 3).

또한 본 연구에서 수행된 LAMP 가 *Orientia* 만을 검출하는지에 대한 특이도 검사 확인 시 다른 *Rickettsia* 속 중 대표성을 지닌 *Rickettsia honei*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsiaconorii*, *Rickettsia akari*,

Rickettsia sibirica, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazaki* 등의 8 가지 종에서 모두 검출되지 않았다(Figure 4).

위와 같은 결과들을 확인한 후 이에 본 연구에서는 총 72 개의 임상 샘플을 대상으로 47 kDa protein gene을 이용하여 각각의 C-PCR, N-PCR, Q-PCR 그리고 LAMP 를 비교 분석하였다.

20 개의 음성 대조 샘플에서는 모든 실험 결과 음성으로 확인 되었으며, 52 개의 양성 샘플에서는 C-PCR, N-PCR, Q-PCR 그리고 LAMP 의 경우 각각 1.92% (n=1), 84.62% (n=44), 73.08% (n=38), 17.31% (n=9)의 양성률을 보여, N-PCR 이 가장 양성률이 높고 두번째로 Q-PCR, LAMP 그리고 C-PCR 순임을 확인하였다 (Table 4).

LAMP 수행 결과 9 개의 임상샘플 중 7 개의 샘플은 각각 10 분, 14 분, 18 분, 18 분, 23 분, 30 분, 32 분에 증폭됨을 확인 할 수 있었으며, 2 개의 임상 샘플은 마지막 결합 단계인 81.78°C에서 증폭된 DNA 가 풀림을 확인할 수 있었다. LAMP 수행 시 양성인 샘플을 Q-PCR 의 copy수와 비교해본 결과 특별한 상관성을 찾지 못했다.

양성률 비교에 있어서 N-PCR 의 경우에서 가장 높은 양성률을 보였으나 진단 시간이 210분으로, 두번째로 양성률이 높은 Q-PCR 에 비해 시간이 3 배 이상 소요된다는 단점이 있었다. 그리고 LAMP 의 경우는 40 분이 소요되어 다른 Q-PCR, N-PCR 에 비해 시간적으로 빠르나 양성률에 있어서 17.3% 로 상당히 낮은 결과를 보였다. 이와 같이 양성률이 낮게 나온 것은 많은 Primer 의 종류로 인한 것으로 생각되어 본 연구자는 고리형성을 가속화시킬 수 있는 loop primer 인 FLP/BLP 를 제외한 후 2 쌍으로 구성된 #25 primer 를 이용하여 LAMP 실험을 진행 하였다. 이에 총 31 개(음성샘플; 5 개, 양성샘플; 26 개)의 임상시료를 가지고 재 실험을 한

결과 5 개의 음성샘플에서는 모두 음성으로 나타났고, 26 개의 양성 샘플 중 16 개의 샘플이 증폭하여 61.54%의 양성률을 보임을 확인 할 수 있었다 (data not shown). Erin 등(7)의 연구 결과에서는 LAMP를 이용하여 쯔쯔가무시병으로 진단된 10개의 양성 샘플 중에 9 개의 샘플에서 양성이나왔음을 보고하였다. 또한 Daniel H.paris 등(54)의 연구에 따르면 LAMP는 *O. tsutsugamushi*를 검출하는데 있어 94%의 특이도, 53%의 민감도를 보였음을 보고 하였다. 또한 Daniel H.paris 등(54)의 연구에서 환자들의 샘플링 시간에 따른 GroEL real time PCR 및 panbio ICT, LAMP의 양성률을 비교한 결과 LAMP의 경우 입원 2일째 샘플에서 25%의 양성률을 보여 가장 높았고, 입원 8 일째 LAMP는 38%의 양성률로 다른 방법에 비해 세번째로 높은 양성률을 보였음을 보고 하였다. 이에 LAMP는 다른 진단 방법에 비해 쯔쯔가무시병을 초기에 확인 하는데 있어 특이도가 상당히 좋다고 생각된다.

LAMP는 기존 PCR과 유사하지만 6개의 유전자 위치를 인지하는 4개의 primer를 사용함으로써 DNA에 대한 특이도가 높고 일정한 온도에서 신장 및 접합이 가능하고, 상대적으로 반응시간이 짧아 DNA의 손상 등이 적어 증폭의 효율성이 높다 (26,27,30-34). 그러나 LAMP는 다른 PCR에 비해 primer의 디자인이 어렵고, 반복되는 고리의 형성으로 전체적인 유전자의 증폭 형태로 나타나기 때문에, 염기서열의 특이도에 대해 확인 하는 것이 어려워 *O. tsutsugamushi*의 strain의 판단 확인이 힘들다.

본 연구에서 LAMP 시행을 위한 시약과 Genie II[®] 기계(55)는 GSP polymerase를 이용하여 보다 빠르게 유전자를 증폭 가능하게 하며, 형광 dye인 eva green을 이용하여 실시간으로 유전자의 증폭 여부를 확인 할 수 있다. 또한 이 장비는 배터리가 내장되어 있고, 무게 역시 가벼워 휴대성이 간편하며, 다른 PCR 장비에 비해 저렴한 가격으로 현장검증을 하는데 있어

사용이 용이하다는 장점이 있다. 하지만 이 장비는 한번에 최대 16개의 샘플만을 검사할 수 있어, 많은 검체를 검사하는데 있어서 여러 번의 실험 수행이 되어야 하고, 또한 실험에 사용되는 시약과 튜브는 이 장비 전용으로 특이화 되어 있다는 단점이 있다.

본 연구에서 LAMP 수행 시 양성 대조군으로 사용한 Boryong antigen 의 경우 증폭되는 시간이 30 분 이내에 증폭이 됨을 확인 가능하였고, 환자의 genomic DNA 의 경우 30분 이후 증폭하는 임상샘플도 있었고 또한 결합하는 단계에서 반응하는 샘플들이 있었다. 이는 Boryong antigen 과 환자의 genomic DNA 를 이용하였을 때의 시간적인 차이가 있음을 확인하였다.

본 연구 결과에 따르면 LAMP 의 양성률이 다른 PCR 등에 비해 생각 보다 낮은 양성률을 보였고, Loop primer 의 추가 여부에 따른 양성률도 각각 17.3%, 61.54% 로 큰 차이를 보였다. 이는 샘플에서의 추출한 47 kDa protein gene 을 포함하고 있는 DNA 의 양이 적기 때문일 것이라 생각되며, primer 를 디자인 하는데 있어 모든 strain 의 conserve 한 부분을 대상으로 하여야 할 것이다. 이에 앞으로 LAMP 의 검출 한계를 좀더 넓히고 더욱 낮은 농도의 DNA 에서도 검출이 가능한 조건을 재 확립하여, 쯔쯔가무시병 진단에 유용한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

V. 요약 및 결론

쯔쯔가무시병은 우리나라에서 가을철에 호발하는 급성열성질환 중 하나로서 *O. tsutsugamushi* 의 감염으로 발생한다. 항생제만으로도 잘 치유되지만, 진단이 늦어질 경우 폐렴, 급성 신부전, 뇌염, 상부위장관 출혈, 사망 등과 같은 합병증이 나타난다. 이에 적절한 치료 및 관리를 위해서는 신속하고 정확한 진단이 요구된다. 이에 본 연구에서는 *O. tsutsugamushi*를 검출하는데 있어, 47 kDa protein gene 을 대상으로한 LAMP 와 PCR에 대해서 비교하고자 하였다.

2006 년 09 월부터 2008 년 12 월까지, 급성열성질환으로 조선대학교 병원에 내원한 18 세 이상 성인 환자 중, 면역형광법(IFA)결과 Ig M 이 1:10 이상이거나, 급성기와 회복기의 항체가가 4 배 이상 상승한 경우 쯔쯔가무시병 환자로 정의하여 총 72 명의 혈액 샘플로 실험을 수행하였다.

47 kDa protein gene 을 이용하여 Q-PCR 그리고 LAMP 를 시행한 결과, 20 개의 음성 대조 샘플에서는 모든 실험 결과 음성으로 확인 되었으며, 52 개의 양성 샘플에서는 각각 73.08%(n=38), 17.31%(n=9)의 양성률을 확인하였다. 그리고 LAMP 에서 사용하는 Loop primer 를 변형하여 실험한 결과 61.54%로 양성률이 높아졌다.

결론적으로 LAMP는 검출한계를 좀더 높인다면 *O. tsutsugamushi*를 검출하는데 있어 일반적인 검사방법 보다 빠른 시간 안에 진단이 가능 할 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

- 1) Seong SY, Choi MS & Kim IS. (2001) Orientia tsutsugamushi infection: overview and immune responses. *Microbes and infection*. 3(1):11-21.
- 2) 김현숙, 조관호, 강상건, 차만진, 황혜언. (2002) 2000년 가을 정읍 및 인근지역에서 발생한 쯔쯔가무시병의 임상조사. *가정의학회지*. 23(1):87-95.
- 3) Watt G, Parola P. (2003) Scrub typhus and tropical rickettsioses. *Curr Opin Infect Dis*. 16(5):429-436.
- 4) 김동민.(2011) 가을철 열성 질환의 치료 (증례중심으로). *대한내과학회지*.81(3):322-327.
- 5) 공우석, 신이현, 이희일, 황태성, 김현희, 이난영, 성지혜, 이슬기, 윤광희. (2007) 쯔쯔가무시병증의 시·공간적 분포와 환경생태요인. *대한지리학회지*. 42(6):863-878.
- 6) Izzard L, Fuller A, Blacksell SD, Paris DH, Richards AL, et al. (2010) Isolation of a novel Orientia species (O. chuto sp. nov.) from a patient infected in Dubai. *J Clin Microbiol* 48(12): 4404-4409
- 7) Erin Huber, Darder Ji, Lee Howell, Zhiwen Zhang, Hua-Wei Chen, Wei-Mei Ching & Chien-Chung Chao. (2012) Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting the 47 kDa Gene of Orientia

tsutsugamushi: A Rapid and Sensitive Alternative to Real-Time PCR. *J Med Microb Diagn.* 1(4):1-5.

8) Balcells ME, Rabagliati R, García P, Poggi H, Oddó D, et al. (2011) Endemic scrub typhus-like illness, Chile. *Emerg Infect Dis* 17(9): 1659-1663.

9) 장미선. (2010) 찻찻가무시병 환자에서 성별 및 원인균의 유전자형에 따른 가피 형성 부위. 석사학위논문. 조선대학교

10) 김효열. (2004) 찻찻가무시병의 최근 국내동향. *대한내과학회지.* 67:516-522.

11) Kim DM, Won KJ, Park CY, Yu KD, Kim HS, Yang TY, Lee JH, Kim HK, Song HJ, Lee SH, & Shin H. (2007) Distribution of Eschars on the Body of Scrub typhus Patients: A Prospective Study. *Am J Trop Med Hyg.* 76(5):806-809.

12) 대한내과학회. (2004) 내과전공의를 위한 진료지침. *감염분과* : 704 - 706.

13) 최명식, 장원종, 박세광, 허명숙, 김항래, 한태희, 김익상. (1997) 1995년 및 1996년에 발생 찻찻가무시병의 혈청역학적 연구. *대한미생물학회지.* 32(2):219-225.

14) 김동민. (2009) 찻찻가무시병의 임상 특징과 진단. *Infection and*

Chemotherapy. 41(6):315-322.

15) Berman SJ, Kundin WD. (1973) Scrub typhus in South Vietnam. A study of 87 cases. *Ann Intern Med 79(1):26-30,*

16) Silpapojakul K, Chupuppakarn S, Yuthasompob S, Varachit B, Chaipak D, Borkerd T, & Silpapojakul K. Scrub and murine typhus in children with obscure fever in the tropics. *Pediatr Infect Dis J 10(3):200-3, 1991*

17) Satari HI, Brabin BJ, Samuel S, Tanskul P & Vasanawathana S. Scrub typhus in Thai children: clinical features and serological study. Abstract of a presentation at the 45th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, USA. *Am J Trop Med Hyg 55 Suppl:219, 1996*

18) Aronoff DM, Watt G. Prevalence of relative bradycardia in Orientia tsutsugamushi infection. *Am J Trop Med Hyg 68(4):477-9, 2003*

19) Brown GW. Scrub typhus; pathogenesis and clinical syndrome, Biology of rickettsial disease, vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Fla 93-100, 1988

20) Korea Center for Disease Control and Prevention. Available

from:URL:<http://www.cdc.go.kr/kcdchome/jsp/general/search/tot/HPSSE0001.jsp>. Accessed 19 June 2009.

21) World Health Organization (2004) WHO recommended surveillance standards. 2nd ed. Available at <http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr isr992.pdf>. Accessed 19 June 2004

22) Prakash JA, Reller ME, Barat N & Dumler JS (2009) Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 2: 292-293.

23) Jiang J, Chan TC, Temenak JJ, Dasch GA, Ching WM, et al. (2004) Development of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay specific for *Orientia tsutsugamushi*. *Am J Trop Med Hyg* 70(4): 351-356.

24) Paris DH, Aukkanit N, Jenjaroen K, Blacksell SD & Day NP (2009) A highly sensitive quantitative real-time PCR assay based on the groEL gene of contemporary 339 Thai strains of *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Microbiol Infect* 15(5):488- 495.

25) Eamsila C, Singsawat P, Duangvaraporn A & Strickman D (1996)

Antibodies to *Orientia tsutsugamushi* in Thai soldiers. *Am J Trop Med Hyg* 55(5): 556-559.

26) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N & Hase T (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 15:28 (12):E63.

27) 노지나, 이보람, 유미선, 윤병수 (2011) IAPV내의 capsid protein gene의 검출을 위한 RT-LAMP 법의 개발. *한국양봉학회지* 26(2) : 119-127.

28) 안영창, 서재원, 최재구, 장원철 (2011) 등온증폭반응법과 변성 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 B형간염 바이러스의 검출. *Journal of the Korean Chemical Society.* 55(2):262-267.

29) 안영창, 조민호, 윤일규, 정덕현, 이은영, 김진호, 장원철 (2011) 등온 증폭법과 Real-time PCR을 이용한 *Salmonella* 검출. *Journal of the Korean Chemical Society.* 54(2):215-221.

30) 안영창, 남윤형, 박수민, 조민호, 서재원, 윤일규, 박용현, 장원철 (2008) 등온 증폭법을 이용한 결핵균의 빠른 검출 시스템 개발. *Journal of the Korean Chemical Society.* 52(3):273-280.

31) 유미선, 김을환, 강민희, 한상훈, 권순환, 윤병수. 2007. 국내 양봉장

에서 Kashmir Bee Virus (KBV)의 검출과 이의 분자생물학적 고찰. 한국양봉학회지 22(1): 33-42.

32) 유미선, Kim Cuc Nguyen Thi, 김동수, 김일욱, 권순환, 윤병수. 2008. Israel Acute Paralysis Virus의 진단을 위한 Real-Time PCR 진단법의 개발. 한국양봉학회지 24(1): 31-36.

33) Aoi Y, Hosogai M, & Tsuneda S. 2006. Real-time quantitative LAMP (Loop-mediated isothermal amplification of DNA) as a simple method of monitoring ammonia-oxidizing bacteria. *J. Biotechnol.* 125(4): 484-491.

34) Blomström AL, Hakhverdyan M, Reid SM, Dukes JP, King DP, Belák S, & Berg M. 2008. A one-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification assay for simple and rapid detection of swine vesicular disease virus. *Journal of Virology Methods.* 147(1): 188-193.

35) Kiatpathomchai W, Jareonram W, Jitrapakdee S, & Flegel TW. 2007. Rapid and sensitive detection of Taura syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 146(1-2): 125-128.

36) Ohori A, Endo S, Sano A, Yokoyama K, Yarita K, Yamaguchi M, Kamei K, Miyaji M, & Nishimura K. 2006. Rapid identification of *Ochroconis*

gallopava by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Vet. Microbiol.* 114(3-4): 359-365.

37) Xu HD, Feng J, Guo ZX, Ou YJ & Wang JY. 2010. Detection of red-spotted grouper nervous necrosis virus by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods.* 2010 Jan;163(1):123-8

38) Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Fujita A, Sugata K, Suga S, Ohashi M, Nishimura N, Ozaki T, Asano Y & Yoshikawa T. (2007) Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol* 39(1): 22-26.

39) Iwamoto T, Sonobe T & Hayashi K (2003) Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples. *J Clin Microbiol* 41(6): 2616-2622.

40) Iwata S, Shibata Y, Kawada J, Hara S, Nishiyama Y, Morishima T, Ihira M, Yoshikawa T, Asano Y & Kimura H. (2006) Rapid detection of Epstein-Barr virus DNA by loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Virol* 37(2): 128-133.

41) Peyrefitte CN, Boubis L, Coudrier D, Bouloy M, Grandadam M, Tolou

HJ & Plumet S. (2008) Rapid and simple detection of eight major periodontal pathogens by the loop-mediated isothermal amplification method. *FEMS Immunol Med Microbiol* 53(3): 314-321.

42) Paris DH, Blacksell SD, Newton PN & Day NP (2008) Simple, rapid and sensitive detection of *Orientia tsutsugamushi* by loop-isothermal DNA amplification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102(12): 1239-1246.

43) Robinson DM, Brown G, Gan E & Huxsoll DL. (1976) Adaptation of a microimmunofluorescence test to the study of human *Rickettsia tsutsugamushi* antibody. *Am J Trop Med Hyg.* 25(6):900-905.

44) 이유미. (2009) 우리나라 남서부 지역에서 확인된 *Orientia tsutsugamushi*의 56KDa 단백질 유전자의 계통분석. 석사학위논문. 조선대학교.

45) 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):351-356.

46) 이정희, Murshed S, 박정수. (2009) 국내 쯔쯔가무시병증의 감염자 분포와 유병자 수 추정. 한국데이터정보과학회지. 20(1):149-158.

- 47) 장우현. (1994) 쯔쯔가무시병. 대한의사협회지. 37(12):1400-1406.
- 48) 조현대, 김주인, 류홍옥, 강창일, 전중휘. (1995) 쯔쯔가무시병 59례의 임상적 고찰 (1986-1993). 인제의학. 16(1):51-59.
- 49) Dong-Min Kim, Geon Park, Hyong Sun Kim, Joo Young Lee, Ganesh Prasad Neupane, Stephen Graves, John Stenos. (2011) Comparison of Conventional, Nested, and Real-Time Quantitative PCR for Diagnosis of Scrub Typhus. *J Clin Microbiol.* 49(2): 607-612.
- 50) Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Kawamori F, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A, & Kawamura A Jr. (1991) Specific amplification of *Rickettsia tsutsugamushi* DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29(11):2628-2630.
- 51) Horinouchi H, Murai K, Okayama A, Nagatomo Y, Tachibana N & Tsubouchi H.(1996) Genotypic identification of *Rickettsia tsutsugamushi* by restriction fragment length polymorphism analysis of DNA amplified by the polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54(6):647-651.
- 52) Murai K, Tachibana N, Okayama A, Shishime E, Tsuda K & Oshikawa T. (1992) Sensitivity of polymerase chain reaction assay for *Rickettsia tsutsugamushi* in patients ' blood samples. *Microbiol Immunol.*

36(11):1145-1153.

53) Kumar K, Saxena VK, Thomas TG & Lal S. (2004) Outbreak investigation of scrub Typhus in Himachal Pradesh (India). *J Commun Dis* 36(4):277-283.

54) Paris DH, Blacksell SD, Nawtaisong P, Jenjaroen K, Teeraratkul A, Chierakul W, Wuthiekanun V, Kantipong P, Day NP. (2011) Diagnostic Accuracy of a Loop-Mediated Isothermal PCR Assay for Detection of *Orientia tsutsugamushi* during Acute Scrub typhus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5(9):1307-1314.

55) <http://www.optigene.co.uk/instruments/instrument-genie-ii/>

Table 1. A total of 72 patients in the indirect immunofluorescence assay (IFA) positivity

IFA	No	Ig M (1:10 ↑)	Ig G (4 fold ↑)
Positive patients samples	52	45	38
Negative patients samples	20	0	0

Table 2. Oligonucleotide primers and a probes used in loop-mediated isothermal amplification assay conditions.

Primer Name	Length(bp)	T_m(°C)	Sequence 5'- 3'
Primer Set 1 (#5)			
F3	24	57.7	TGAAGTTATAAAAGAAGGATCTGC
B3	23	57.4	GCTTTGATCATTACTTTGTTGCT
FIP	47	70.0	ACCTGTAAATCTCTTCCTGTTTTGAT-TTTTGAATTGCTCCTGGAGA
BIP	49	70.6	CTGAAAGAGAAGTTGAGCTTTTACG-TTTTACTATCCTCACCTTTGTTGG
FLP	26	45.9	TCTTTATCATGAAATTTAGTAATTAC
BLP	27	54.6	TGGTAAGTCGATGACTCTAAAATGTAA
Primer Set 2 (#25)			
F3	20	56.3	GCAGCATTATCTTATGCGAC
B3	19	56.0	TTAAACATCGGTCCACCAA
FIP	45	75.9	TTCCTCTTAAACCAAAGGACTTCC-TTTGGCGACTCAAATCAGTC
BIP	49	73.2	TGGCATTATTTCTTCTAAAGGACCA-CATATGAATAGCAGCATTAGTTTG
FLP	26	54.9	ATTGCAATAACCTGATCTCCTACTCT
BLP	24	54.8	ATGGGTAACGGCATAGTAACTGAT
Primer Set 3 (#38)			
F3	22	56.6	GGAACAGTAACAAATGGCATT A
B3	21	56.2	TCAACTGCTTCAAGTACAGTA
FIP	48	74.5	CCAAAGCTACCCATATGAATAGCAG-CTAAAGGACCAGATATGGGTAAC
BIP	47	76.0	TGGACCGATGTTTAATCTTGAAGG-GAATAGCAAACTTATGCCTGAG
FLP	28	51.4	TTAGTTTGAATAAAATCAGTTACTATGC
BLP	27	55.7	TATTGGAATTAATCCATTCACGTATC

Table 3. Condition of working solutions for loop-mediated isothermal amplification assay of 47 kDa protein gene.

Components of premix solution	concentration
Isothermal Master mix	1x
Primer	
F3	0.2 μ M
B3	0.2 μ M
FIP	1.6 μ M
BIP	1.6 μ M
FLP	0.4 μ M
BLP	0.4 μ M
SDW(SIg Ma Distilled Water)	
DNA Template	

Table 4. Oligonucleotide primers and a probe used in this study and polymerase Chain Reaction (PCR) conditions.

Primers and a probe name (Sequence)	Condition	Amplicon Size (bp)	Ref	PCR assay function(s)
OtsuFPS622 (5'-GAAGTGTTCTTAGGTTCTGGGGTTATC-3')	94°C 5min	622	45	47 kDa Cloning Primer
OtsuRPS622 (5'-CTTTTATAACTTCAGTTATTAGAACTCC-3')	94°C 30sec 56°C 30sec 72°C 1min	39 cycles	45	
OtsuFP630 (5'-AACTGATTTTATTCAACTAATGCTGCT- 3')	72°C 10min 1 st 30 cycles 94°C 10min	2 nd 25 cycles 94°C 10min	45	47 kDa Q-PCR, C-PCR, N-PCR Internal Primer
OtsuRP747 (5'-TATGCCTGAGTAAGATACRTGAATRGAATT- 3')	94°C 1min 56°C 1min 72°C 1min	94°C 30sec 60°C 30sec 72°C 1min	45	
OtsuPR665 probe (5'-FAM-TGGGTAGCTTTGGTGGACCGATGTTAATCT-BHQ1-3')	72°C 7min	72°C 7min	45	47 kDa Q-PCR Probe
OtsuFP555 (5'-TCCTTTCGGTTTAAGAGG AACA-3')	Q-PCR 45 cycles 95°C 10min	238		47 kDa N-PCR External Primer
OtsuRP771 (5'-GCATTCAACTGCTTCAAGTACA- 3')	95°C 10sec 60°C 30sec			

Table 5. Appropriate temperature according to the primers of the 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay

	#5 primer	#25 primer	#38 primer
Reaction time (min)	11	13	33
Sample			
Positive (n = 8)	8	8	-
Negative (n = 2)	2	0	-

Table 6. Results of C-PCR, N-PCR, Q-PCR and LAMP assays for the detection of *Rickettsia* species.

<i>Rickettsia</i> species	Result by indicated assay			
	C-PCR	N-PCR	Q-PCR	LAMP
<i>R. honei</i>	-	-	-	-
<i>R.rickettsii</i>	-	-	-	-
<i>R.conorii</i>	-	-	-	-
<i>R.akari</i>	-	-	-	-
<i>R.sibirica</i>	-	-	-	-
<i>R.typhi</i>	-	-	-	-
<i>R.prowazaki</i>	-	-	-	-

*Conventional PCR (C-PCR), Nested PCR (N-PCR), Quantitative real-time PCR(Q-PCR), and Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay(LAMP)

Table 7. Comparison of accuracy on 47 kDa protein gene polymerase Chain Reaction (PCR) and loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) against *O.tsutsugamushi*.

Impression	Result	47 kDa protein gene (n=52)			
		Conventional PCR	Nested PCR (N-PCR)	Quantitative real-time PCR (Q-PCR)	LAMP
Scrub typhus patients	Positivity	1.92% (n=1)	84.62% (n=44)	73.08% (n=38)	17.31% (n=9)
	Amplification Time	90 min	210 min	60 min	40 min

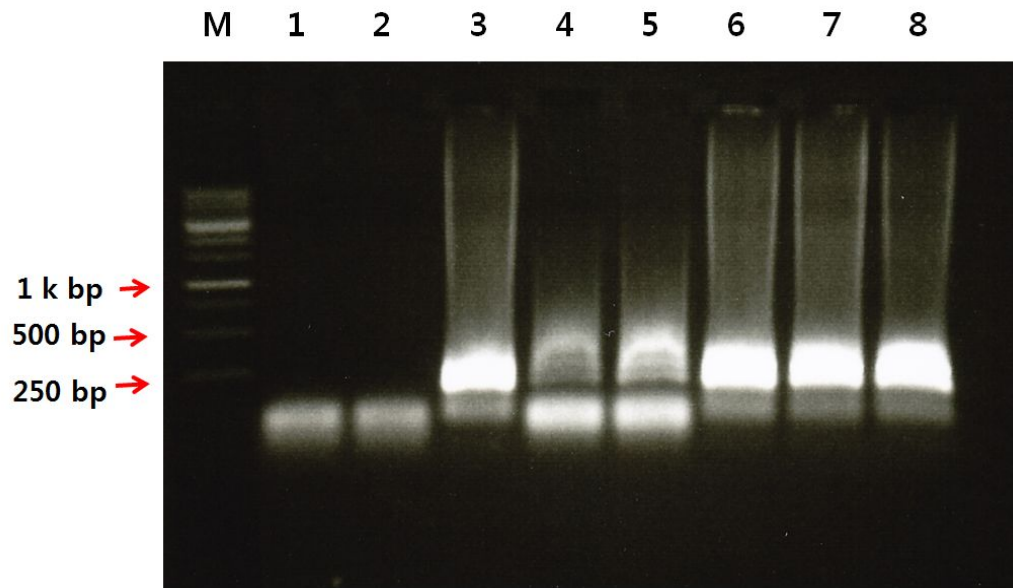


Figure 1. The prior test of 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay using # 25 primers on clinical samples

Lane M: 250bp ladder, Lane 1-2 : Negative sample, Lane3-7: positive sample, Lane 8: *Orientia tsutsugamushi* Boryong antigen

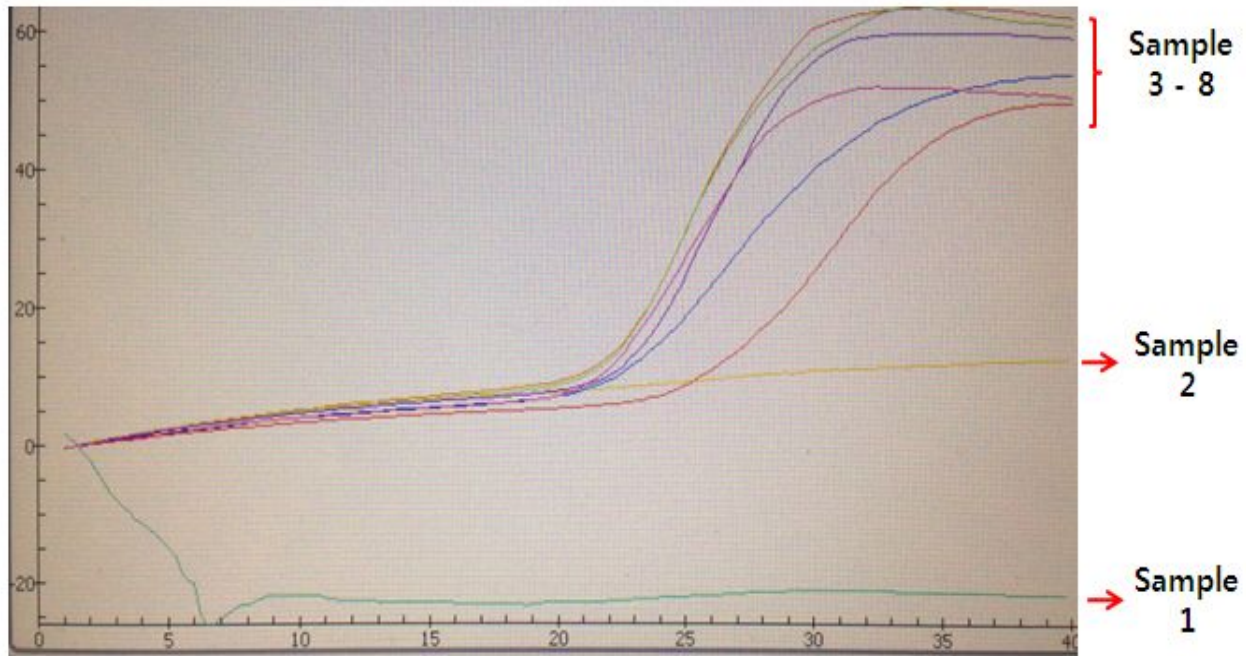


Figure 2. Isothermal amplification of 47 kDa protein gene of Clinical samples (genomic DNA)

Sample 1-2 : Negative clinical sample, Sample3-7 : positive clinical sample, Sample 8 : *Orientia tsutsugamushi* Boryong antigen

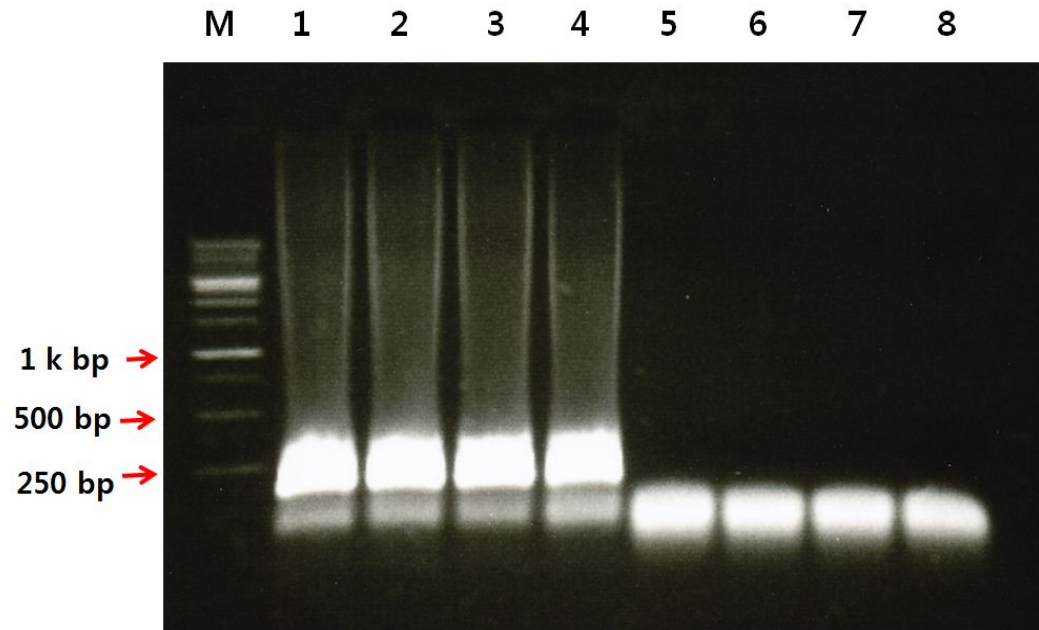


Figure 3. The sensitivity of the 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay performed using #25primers
Lane M: 250bp ladder, Lane 1-8: $6\text{ ng}/\mu\text{l}$, $3\text{ ng}/\mu\text{l}$, $1.5\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0.75\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0.375\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0.1875\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0.09375\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0.046875/\mu\text{l}$ of diluted Boryong antigen.

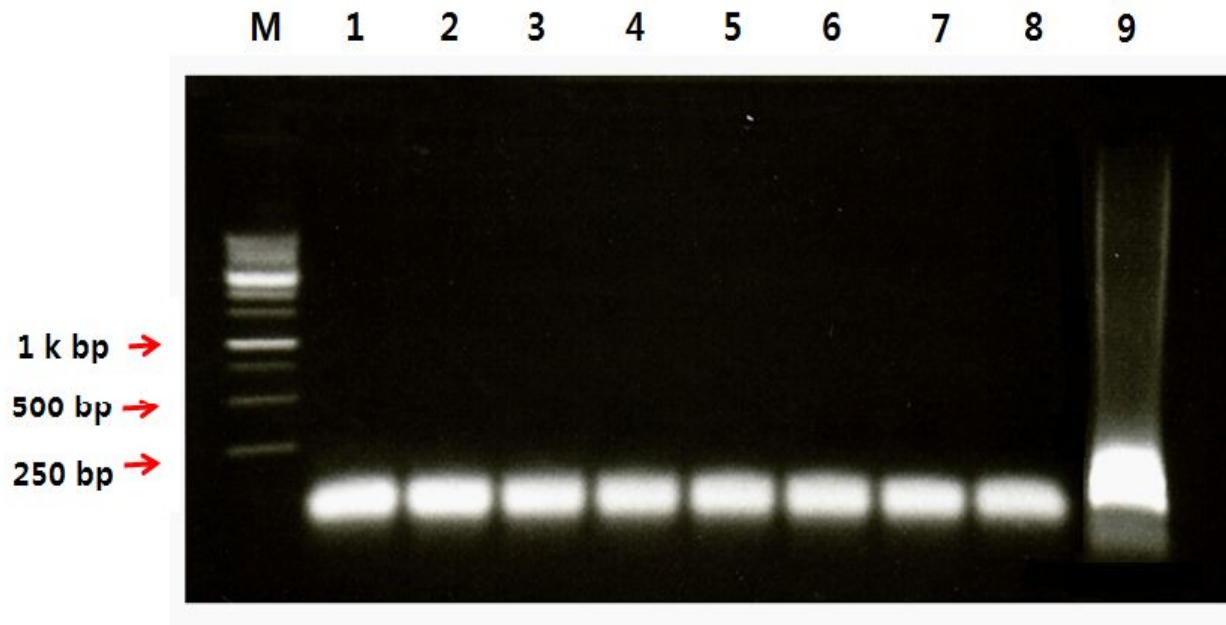


Figure 4. The specificity of the 47 kDa protein gene loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) performed using #25primers

Lane M:250bp ladder, Lane 1-8: products from LAMP reactions containing genomic DNA from bacteria which are phylogenetically similar to *Orientia* including *Rickettsia honei*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsiaconorii*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia prowazaki*., Lane 9: *Orientia tsutsugamushi* Boryong antigen