

이중 중합효소연쇄반응을 이용한 *Orientia tsutsugamushi*의 혈청형의 동정

한림대학교 의과대학 피부과학교실¹, 미생물학교실²
고려대학교 의과대학 피부과학교실³, 미생물학교실⁴, 내과학교실⁵, 홍피부과의원⁶

노주영¹ · 기선호² · 송해준³ · 김수남³ · 최영주⁴ · 송기준⁴ · 김우주⁵ · 홍승민⁶

= Abstract =

Identification of Serotypes of *Orientia Tsutsugamushi* Using Nested PCR

Joo Young Roh,¹ M.D., Sun Ho Kee,² M.D., Hae Jun Song,³ M.D.
Soo Nam Kim,³ M.D., Young Ju Choi,⁴ M.D., Ki Joom Song,⁴ M.D.
Woo Ju Kim,⁵ M.D. and Seung Min Hong,⁶ M.D.

Department of Dermatology¹, and Microbiology² Hallym University School of Medicine,
Choon Cheon, Korea and department of Dermatology³, Microbiology⁴, Internal Medicine⁵,
College of Medicine, School of Medicine, Korea University Seoul, Korea
Dr. Hong's Dermatologic Clinic⁶, Pyungchon, Korea

Background : For the early diagnosis of tsutsugamushi disease, polymerase chain reaction(PCR) using skin specimen might be a precise and useful diagnostic tool. The purpose of this study is to detect and identify the serotype of the *Orientia tsutsugamushi* from the skin lesions of the patients with tsutsugamushi disease by nested PCR.

Methods : Nested PCR was used to diagnose tsutsugamushi disease and identify the serotype of the *O. tsutsugamushi*; Karp, Kato, Gilliam or Boryong/Kuroki. The primer sets were derived from serotype-specific DNA sequences encoding the 56kDa antigen of *O.tsutsugamushi*. The PCR products were analyzed by using direct cyclic sequencing.

Results : The serotype-specific DNA bands with 1% agarose gel electrophoresis of amplified DNAs by nested PCR were observed in all 11 skin biopsy specimens from 8 patients with tsutsugamushi disease. Among 8 patients, 7 were proved to be infected with Boryong/Kuroki strains and one with Karp. One Karp strain showed one base mutation with amino acid sequence variation, but all the Boryong/ Kuroki strains showed no mutation.

Conclusion : We suggest that serotype-specific nested PCR is a simple, rapid and precise diagnostic method, and useful for early diagnosis of tsutsugamushi disease. Furthermore, we might detect the sequence variations of serotype-specific DNA sequences encoding 56 kDa antigen among strains.

Key Words : Nested PCR, *Orientia tsutsugamushi*, Identification

기존의 *Rickettsia tsutsugamushi*로 불리워졌던 *Orientia tsutsugamushi*¹⁾는 고열 및 피부증상을 주 증상으로하는 쯔쯔가무시병의 원인 미생물이다. 주증상인 고열, 오한 등은 진드기에 물린후 약 8-10일간의 잠복기를 거친 후 발생하나 가피(eschar)를 주증상으로 하는 피부증상은 진드기에 물린 후 수 시간내에 작은 구진형태로 생기기 시작한다²⁾.

쯔쯔가무시병의 조기 진단으로는 비슷한 임상증상을 보이는 다른 국내 풍토병인 신증후 출혈열 및 렙토스피라증과의 감별진단을 위하여 초기 피부병변의 관찰 및 원인균의 증명이 중요하다. 이러한 목적을 위해서는 원인균의 분리 혹은 PCR법 등이 사용될 수 있다. 그러나 원인균의 분리 및 그 분리균주의 항원 혹은 유전학적 분석은 그 실험 소요시간이나 제반 기술적인 문제로 실제 임상진단에는 큰 도움이 되고 있지 않다. 또한 혈청내의 *O.tsutsugamushi*의 항체를 검출하는 혈청학적 방법은 질환의 초기에 낮은 항체 역가 및 임상경과에 따라 항체가의 증가를 확인하여야 하는 문제 등을 가지고 있다.

따라서, 본 연구에서는 국내에 존재하는 것으로 알려진 보령(Boryong)³⁾, Karp, Gilliam 혈청형 및 국내에 존재가 밝혀지지는 않았지만 원형균주로 알려진 Kato혈청형을 중심으로 이들의 혈청형을 감별할 수 있는 혈청형 특이 PCR을 이용하여 피부 병변에서의 *O. tsutsugamushi*를 조기 검출하고 염기서열 분석을 통해 원인혈청형을 감별하였다.

1. 대 상

1994년 9월 부터 11월까지 고려대학교 부속병원에 내원한 환자중 임상 및 면역혈청학적 검사상 쯔쯔가무시병으로 진단된 환자 8명에서 건조 가피 및 홍반성 구진 또는 반점 부위 11개를 조직생검하여 실험에 사용하였다. 혈청학적 검사는 Bozeman 등⁴⁾의 방법에 따라 간접 면역형광항체검사를 실시하였으며, *O. tsutsugamushi*; Karp, Kato, Gilliam주를 항원으로 사용하였다.

2. 피부생검 조직으로부터 DNA정제

병변 조직으로부터의 DNA 검출은 Sambrook 등⁵⁾의 방법을 변형하여 시행하였다. 동결시킨 조직을 1 ml의 homogenization buffer(0.25M sucrose, 25mM Tris.HCl, pH 7.5, 25mM NaCl, 25mM MgCl₂)에 넣고 조직을 분쇄한 후, 1ml의 cold lysis buffer (0.32M sucrose, 10mM Tris-HCl, pH 7.6, 5mM MgCl₂, 1% Triton X-100)에 부유시키고, SDS와 proteinase K를 각기 최종농도 1%, 200 µg/ml 되게 추가로 넣고, 50°C에서 3시간동안 반응시켰다. 이 용해액에서 Furuya 등⁶⁾이 기술한 방법으로 DNA만을 순수 정제하였다.

3. 이중 중합효소 연쇄반응(nested PCR)

PCR증폭에 필요한 oligonucleotide primer들은 Furuya 등⁶⁾에 의해 제시된 nested PCR 방법을 다소 변형하여 사용하였다(Table 1).

일차 PCR은 10×PCR buffer 10 µl [10mM Tris-HCl(pH 7.4), 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl,

Table 1. Primer Sequences Used for Nested PCR

R56f(5'primer for 1st PCR) : 5'-ATT-GCT-AGT-GCA-ATG-TCT-GC-3'
R56r(3'primer for 1st PCR) : 5'-CTT-CTT-GCG-CTG-TAG-CTT-GA-3'
R56c(5'primer for 2nd PCR) : 5'-CAG-CCT-ACT-ATG-AGT-CCT-AT-3'
B/K(Boryong/Kuroki specific 3'primer for 2nd PCR): 5'-CAC-CGG-ATT-TAC-CAT-CAT-AT-3'
KP(Karp specific 3' primer for 2nd PCR) : 5'-ACA-ATA-TCG-GAT-TTA-TAA-CC-3'
KT(Kato specific 3' primer for 2nd PCR) : 5'-GGA-ATA-TTT-AAT-AGC-ACT-GG-3'
GM(Gilliam specific 3' primer for 2nd PCR) : 5'-CTT-TAT-ATC-ACT-ATA-TAT-CTT-3'

0.1% Triton X-100], 1ng의 template DNA, 200 μ M dNTPs, 각 혈청형에 공통적인 3'(R56r) 및 5' 말단 primer(R56f)를 각기 10pmol씩, Taq DNA polymerase(DynaZyme; Finnzymes, Finland)를 1 unit 넣고 최종 반응부피를 100 μ l로 하여 programmed thermal cycler(Perkin-Elmer Cetus 480, Norwalk, CT, USA)에서 PCR을 시행하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C 1분 30초, 72 $^{\circ}$ C 2분 30초로 25 cycle 반응시키고, 최후 반응후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켜 최종 PCR산물의 연장을 유도하였다. 이차 PCR은 template DNA로 first round PCR에서 얻은 산물을 5 μ l, 10 \times PCR buffer 10 μ l, 200 μ M dNTPs, 각 혈청형에 공통적인 5' 말단 primer(R56c)와 3' 말단 primer는 각 혈청형에 특이한 primer들을 각기 20 pmole씩, DynaZyme을 1 unit 넣고 최종 반응부피를 100 μ l로 하여, PCR을 시행하였다. 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨후 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 60 $^{\circ}$ C 2분 30초, 72 $^{\circ}$ C 3분 30초로 25 cycle 반응시키고, 최후 반응후 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 반응시켰다. 각 반응시마다 음성 대조군으로 template DNA대신 증류수를 사용하였으며, 교차오염을 예방하기 위해 aerosol resistant micropipet tip을 사용하였다.

4. PCR산물의 정제

PCR반응중 사용되지 않은 primer들과 dNTPs 등을 제거하고 buffer의 조성을 바꾸기위해 centricon-100(Amicon, USA)을 이용하여 PCR산물을 정제하였다.

5. 주기적 염기서열 분석법 (cyclic DNA sequencing)

주기적 염기서열 분석은 chain-termination sequencing 반응을 응용한 PCR과정을 거쳐 증폭된 산물의 염기서열을 결정하는 방법으로 CyclistTM Exo⁻ Pfu DNA Sequencing kit(Stratagene, USA)를 이용하여 시행하였다. 우선 4개의 tube에 3 μ l의 dideoxynucleotide triphosphate(ddNTP)를 분주하였다. Master mixture에는 10 \times sequencing buffer[200 mM Tris-HCl(pH 7.5), 100mM KCl, 20mM MgSO₄, 100 μ M (NH₄)₂SO₄, 1% Triton, 1mg/ml bovine serum albumin(BSA), 20 μ M dATP, 50 μ M dCTP, 50 μ M dGTP, 50 μ M dTTP]와

1pmol primer, 15 μ l template DNA(200 fmol), 10 μ Ci [α -³⁵S]dATP, 4 μ l DMSO(Dimethyl sulfoxide), 2.5 unit Exo⁻ Pfu DNA polymerase에 최종 반응부피가 30 μ l가 되도록 증류수를 넣은후, 미리 ddNTPs 가 분주된 tube에 7 μ l씩 넣고 thermo cycler (Perkin-Elmer Cetus, USA)에서 PCR을 시행하였다. 먼저 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨후, 95 $^{\circ}$ C 30초, 60 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 30초로 30 cycle이 끝난후, 5 μ l의 stop solution[80% formamide, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1mM EDTA, 0.1% bromphenol blue (BPB), 0.1% xylene cyanol(XC)]을 넣어 반응을 종결시켰다. polyacrylamide gel 전기영동을 실시하기 전에 84 $^{\circ}$ C에서 4분간 sample을 끓여 DNA를 변성시키고 반응을 마친 시료는 50% urea가 함유된 6% polyacrylamide gel 전기영동을 실시하여 염기서열을 분석하였다. 이러한 과정을 2회씩 검증하여 염기서열 분석 착오의 가능성을 배제하였다.

결 과

1. 간접 면역형광항체 검사

피부증상을 포함한 임상증상을 토대로 쓰쓰가무시병으로 의심되는 8명의 환자를 선별하였다. 이들 환자들은 대부분 특징적인 가피를 보였으나, 가피의 관찰 없이 반점(macule)만이 관찰된 환자도 있었다(Table 2). 또한 세 환자에서는 가피이외에 구진 결절 및 반점이 동반되었다. 이들 환자의 혈청학적 소견으로는

Table 2. Results of Indirect Immunofluorescent Antibody Assay Using Sera of 8 Patients with Tsutsugamushi Disease

Case	Age/Sex	Immunofluorescence	Serotype
1	F/64	1: 800	karp/Gilliam
2	F/50	1: 400	karp/Gilliam
3	F/59	1: 1600	Boryong/Gilliam
4	M/59	1: 400	karp/Gilliam
5a*	F/57	1: 1600	Boryong/Gilliam
5b*	F/57	1: 1600	Boryong/Gilliam
6	M/50	(-)	Karp
7a	F/70	1: 3200	Boryong
7b	F/70	1: 3200	Boryong
8a	F/67	1: 800	Boryong/Gilliam
8b	F/67	1: 800	Boryong/Gilliam

a, b: paired sera from the same patient

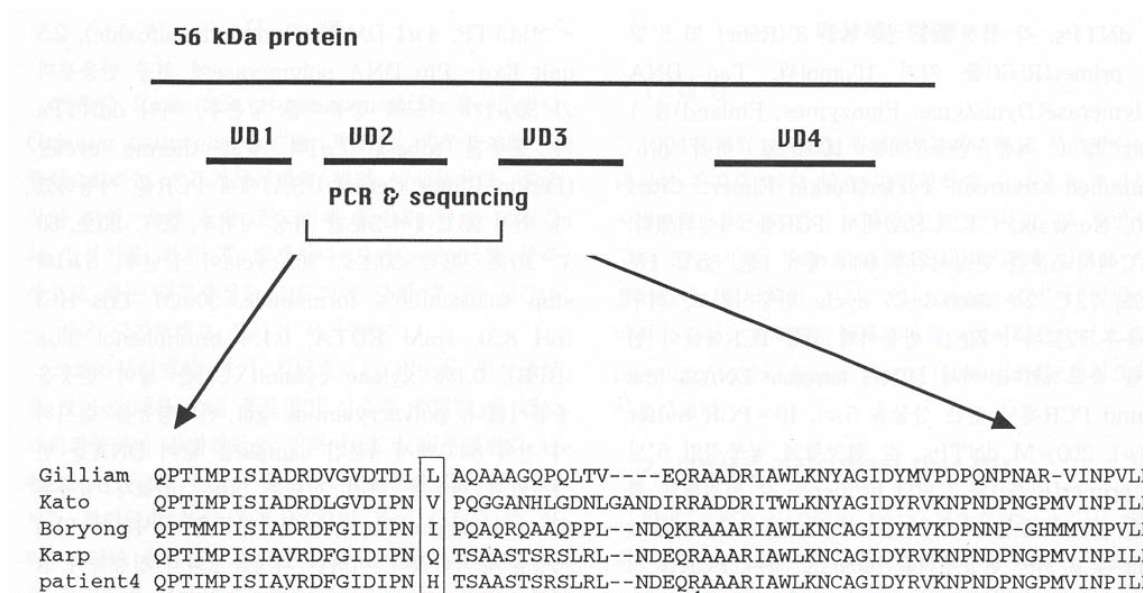


Fig. 1. Comparison of amino acid sequences among four strains and patient 4. The box indicates mutated amino acid sequence of patient and four prototype strains. VD, Variable domain.

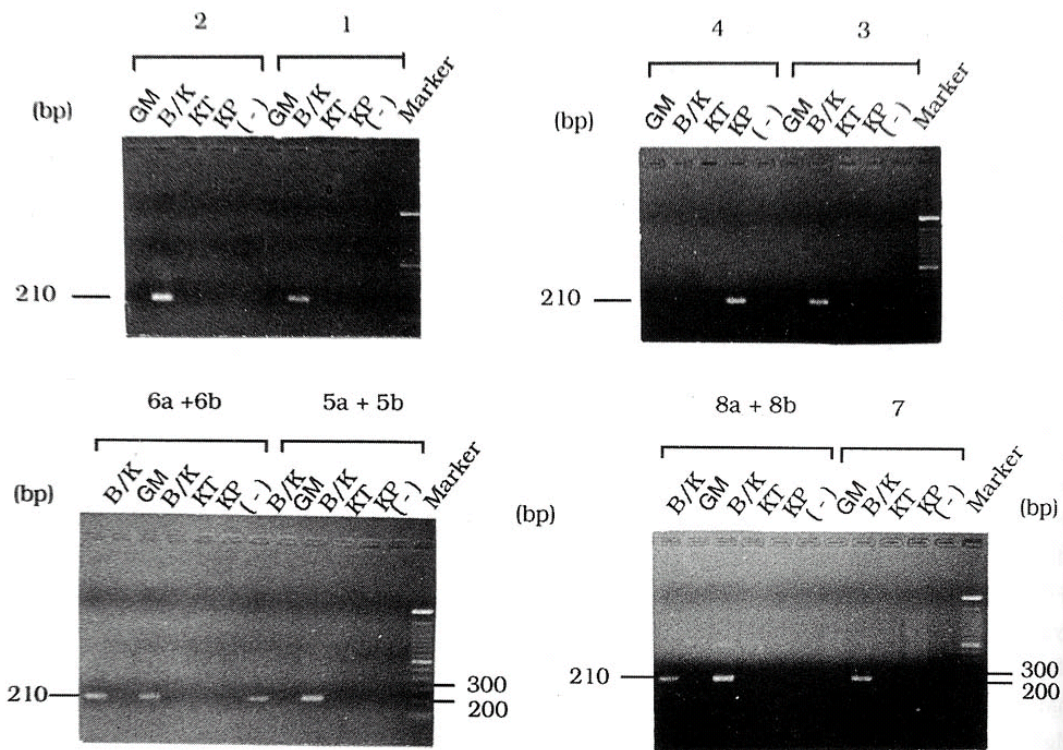


Fig. 2. 1% agarose gel electrophoresis of amplified DNAs by nested PCR with serotype-specific primers, and template DNAs prepared from eschars or rashes. DNA size marker was shown in marker lane(100bp ladder, Gibco-BRL, Bethesda, USA). Numeral represents the case of the patients. KP; Karp, KT; Kato, B/K; Boryong/Kuroki, GM; Gilliam, (-);negative control.

피부병변으로서의 반점만을 보이거나, 반점을 동반하는 경우에 비교적 낮은 항체역가를 보였고(1:400-800), 항체가가 음성으로 나타난 환자에서도 가피를 관찰한 경우가 있었다. 3가지 혈청형에 속하는 군주(Karp, Kato, Gilliam)의 항원을 개별적으로 사용하여 검사를 시도했으나 혈청형사이의 높은 교차반응에 의해 혈청형을 파악하기에는 어려움이 있었다.

2. PCR 증폭산물의 확인

8명 환자의 가피 및 반점, 구진에서 조직생검한 11개의 검체를 대상으로 혈청형 특이 PCR을 실시한 결과 11개의 검체 모두에서 증폭산물을 관찰할 수 있었다. 또한 한 검체만을 제외한 10개의 검체에서 혈청형 보령주에 특이한 증폭산물을 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 한 검체는(Patient No. 4) 혈청형 Karp에 특이한 증폭산물이 관찰되었다. Case 4환자의 경우에는 반점만이 관찰된 환자였으며 항체 역가 등으로 미루어 비교적 초기환자로 사료되는 환자였다. 또한 혈청학적으로 음성을 보이는 환자(Case No. 6)에서도 뚜렷한 증폭산물을 관찰할 수 있었다. 따라서 이 결과는 PCR을 이용한 찌르가무시 병의 조기진단을 위해서는 피부 병변은 매우 효율적인 가검물이 될 수 있음을 시사한다. 본 연구를 수행중에 본 실험실에서는 혈청형 보령주를 배양한 바가 없는 점과 전 실험을 aerosol resistant tip 및 일회용 제품만을 사용하고 매 실험마다 음성 시료를 사용한 점으로 미루어 위양성의 가능성을 배제할 수 있으리라 사료된다.

3. PCR산물의 염기서열 분석

총 11개의 PCR산물을 주기적 염기서열 분석법을 이용하여 PCR 산물을 직접 분석하였다. 이 PCR산물은 56kDa 유전자 안의 4개의 variable domain (VD) 중 VDII 및 VDIII의 일부가 포함되는 부위이며, 특히 VDII의 경우는 Boryong/Kuroki의 염기서열과 다른 혈청형 사이에 상동성이 가장 낮은 부위로 우리나라에서 가장 많은 것으로 알려진 혈청형 보령주³⁾의 분석에 가장 적합하리라 사료되는 부위이다. 염기서열의 분석 결과 예상되는 보령 혈청형 특이 PCR산물과 Karp 혈청형 특이 PCR산물은 각각 210 bp, 220 bp였다. 염기서열에 있어서는 11개의 가검물에서 얻어진 보령 특이 PCR산물은 혈청형 보령주의 56kDa 유전자의 상응되는 유전자와 완전히 일치하는 염기서열을 보였다.

그러나 혈청형 Karp 특이 PCR산물의 경우에는 VDII 부위에서 아미노산 서열의 변이를 동반하는 점변이(point mutation)가 관찰되었다. 이 부위는 Karp형의 56kDa 유전자 시작 부위로 부터 474번째 염기로서 glutamine이 histidine으로 치환되는 변이이다(CAG → CAT)(Fig. 1). 이 결과는 두번의 독립적인 PCR산물의 염기서열 분석을 통해 일치되는 결과였다. Karp 분리주에서 관찰된 단일 아미노산 변이가(glutamine → histidine) 이차단백 구조에 미치는 영향을 Chou와 Fasman algorithm 방법⁸⁾으로 분석한 결과 turn 구조가 감소함으로써 약간의 경결성(rigidity)이 증가된 양상을 보였다. 하지만 Kyte와 Dolittle의 방법으로 분석해 본 hydrophobic profile에는 큰 변화가 없었다.

고 찰

*O. tsutsugamushi*는 Rickettsiaceae에 속하며, 과거에는 genus *Rickettsiae*에 포함되었으나, 구조적인 특성, 생물학적인 특성 및 ribosomal gene을 이용한 계통적인 연구 결과 등을 토대로 genus *Orientia*로 분류되는 균이다¹⁾. *O. tsutsugamushi*는 또다시 항원적, 유전적 특성에 따라 다양한 혈청형으로 분류되고 있다. 이러한 혈청형의 분류는 주로 혈청형 특이 항체를 사용, 분리균주와의 반응성을 토대로 분류되어 왔으나 최근 분자생물학적 수기의 발달로 PCR 등의 방법을 이용하여 균 분리 없이 혈청형을 분류하는 방법 등이 제시되었다⁹⁻¹¹⁾. 특히 56kDa 단백질은 *O. tsutsugamushi* 세포 표면의 주 항원이라는 점, 종 특이 혹은 혈청 특이 항원을 가지고 있다는 점에서 많은 연구가 집중되었으며 그 결과 대부분의 혈청형들의 56kDa 유전자의 염기서열이 밝혀졌다^{7, 12-14)}. 이러한 결과를 바탕으로 Furuya 등⁶⁾은 혈청형 특이 PCR법을 개발 보고한 바 있으며, 본 연구에서는 이 방법을 다소 변형하여 실제 임상 가검물에서의 적용 가능성을 조사하였다. 대상 가검물로는 피부병변을 사용하였다. 찌르가무시병에 있어서 가피는 우선 가장 초기에 나타나는 병변이며 둘째, 혈액 등의 가검물은 항생제 등에 의한 검색율의 저하 등의 문제점을 안고 있는 반면, 피부병변은 이러한 영향이 비교적 적고 세제로는 *O. tsutsugamushi*가 진드기로 부터 처음 옮겨온 자리로서 비교적 균이 농축되어 있는 부위이다. 따라서 찌르

가무시병의 조기 진단에 가장 효과적인 가검물이 될 수 있을 것이다. 실제로 본 연구 결과에서 모든 피부 병변 가검물에서 56-kDa 유전자를 증명할 수 있었고, *O. tsutsugamushi*에 대한 항체가 생성되기 전의 초기 환자에서도 효율적으로 진단이 가능하였다. 본 연구에서 사용한 PCR은 이중 PCR(nested PCR)법으로서 1차 PCR을 통해 유전자를 증폭하고 2차 PCR에서 그 혈청형을 감별하는 방법이다. 이 방법은 Furuya 등⁶⁾에 의해 이미 그 유용성이 보고된 바 있으나, 본 연구에서는 국내에 가장 많이 분포하는 것으로 알려진 보령주³⁾의 효율적인 증폭을 위해 일부 primer(R56c) 염기서열을 다소 변형하였다. 그러나 혈청형 특이 primer의 서열은 Furuya 등⁶⁾이 제시한 서열을 그대로 사용하였다. 이러한 PCR을 통해 얻어진 혈청형 특이 산물의 검증을 위해 그 PCR산물의 염기서열을 분석하였다. 본 PCR이 혈청형 특이성을 검증하는 방법으로는 표준 균주에 대하여 PCR을 시행한 후 그 산물의 크기 및 특이성을 비교하는 방법 혹은 형 특이 DNA probe 등으로 Southern blot analysis를 실시하는 방법이 있겠으나, 본 연구에서는 PCR산물의 염기서열을 직접 분석하여 그 특이성을 검증하고자 하였다. 이러한 전략의 장점은 점 변이 등의 변이도를 측정할 수 있으며 이러한 결과는 혈청형 분류 이외에도 많은 정보를 제공할 수도 있으리라 사료되었다.

염기서열 분석을 실시한 결과 대부분의 가검물은 역시 혈청형 보령과 동일한 염기서열을 가지고 있었다. 그러나 혈청형 Karp와 동일한 염기서열을 보인 가검물의 경우는 가피가 관찰되지 않은 환자로서 가검물은 반점이었다. 아직까지 *O. tsutsugamushi*의 혈청형에 따른 임상증상의 특이성에 대해서는 뚜렷한 보고가 없는 상태이다. 본 실험의 결과도 뚜렷한 결론을 내리기에는 가검물의 수가 너무 적기는 하지만 혈청형과 임상증상과의 관련성을 연구하는데 본 혈청형 특이 PCR이 유용하게 사용될 수 있으리라고 사료되었다.

따라서, 본 연구에서 사용한 혈청형 특이 PCR 및 그 염기서열의 분석은 *O. tsutsugamushi*의 배양이 힘든 실험실에서 정확하고 객관적으로 혈청형을 동정할 수 있는 방법으로 사용 가능하리라 사료된다.

요 약

목 적 : 임상적으로 쯔쯔가무시병이 의심되는 환자

의 혈청에서 면역형광항체검사를 실시함과 동시에 피부 병변 조직에서 혈청형 특이 이중 PCR을 시행하여 신속하고 정확한 진단 및 혈청형의 동정을 위한 임상 가검물로서의 적용 가능성을 보고자 하였다.

방 법 : 1994년 9월부터 11월까지 고려대학교 부속 병원에 내원한 환자중 임상 및 면역혈청학적 검사상 쯔쯔가무시병으로 진단된 환자 8명에서 건조 가피 및 홍반성 구진 또는 반점 부위 11개를 조직생검 하여 실험에 사용하였다 Karp, Kato, Gilliam, Boryong/Kuroki를 효과적으로 증폭 시키기 위한 혈청형 특이 이중 PCR을 시행하여 혈청형을 분류하고, PCR 산물로 주기적 염기서열 분석법을 실시하여 염기서열의 변이를 관찰하였다.

결 과 :

1) 총 8명의 환자의 혈청에서 실시한 간접 면역형광항체검사는 비교적 높은 민감도를 보였지만, 1명의 환자에서 발병 2일째 시행한 검사상 음성소견을 보였으며, 면역형광항체 검사로 분류된 혈청형은 비특이적 양상을 보였다.

2) 8명의 환자의 11개의 조직병변에서 시행한 PCR은 한가지 혈청형에만 특이한 band를 관찰할 수 있어, 진단과 동시에 혈청형 분류가 가능하였다. 8명중 7명에서 보령/Kuroki에 감염된 것으로 밝혀졌고, 1명이 Karp균주에 감염되어 있음을 확인할 수 있었다.

3) PCR 산물을 확인하는 한편 *O. tsutsugamushi*의 주단백 항원인 56kDa단백을 전사하는 부분의 염기서열을 분석하기 위하여, PCR산물로 주기적 염기서열 분석법을 시행한 결과, 7개의 보령 균주는 모두 정상 염기서열을 보였고, 1개의 Karp균주는 한 염기의 점 돌연변이로 glutamine에서 histidine으로 아미노산 서열의 변이를 보였다.

결 론 : 쯔쯔가무시병의 초기환자에서 피부병변을 이용한 혈청형 특이 이중 PCR법은 혈청형의 동정 및 신속하고 정확한 조기진단법으로 유용하리라 사료된다.

REFERENCES

- 1) Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S : Classification of *Richettsia tsutsugamushi* in a new genus *Orientia* gen. nov. as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Bacteriol* 45: 589-591, 1995

- 2) Chang TW: *Rickettsial diseases*. In: Moschella SL, Hurley HJ, eds. *Dermatology*. 3rd ed. p 857, Philadelphia, WB Saunders Co, 1992
- 3) Chang WH, Kang JS, Lee WK, Choi MS, Lee JH: *Serological classification by monoclonal antibodies of Rickettsia tsutsugamushi isolated in Korea*. *J Clin Microbiol* 28:685-688, 1990
- 4) Bozeman FM, Elisberg BL: *Serological diagnosis of scrub typhus by indirect immunofluorescence*. *Proc Soc Exp Biol Med* 112:568-575, 1963
- 5) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. p14.13-14.20 1989 New York: Cold Spring harbour Lab
- 6) Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Yamamoto S, Kawamura A: *Serotype-specific amplification of Rickettsia tsutsugamushi DNA by nested polymerase chain reaction*. *J Clin Microbiol* 31:1637-1640, 1993
- 7) Ohashi N, Hashimoto H, Ikeda H, Tamura A: *Diversity of Immunodominant 56-kDa type-specific antigen(TSA) of Rickettsia tsutsugamushi*. *J Biol Chem* 267:12728-12735, 1992
- 8) Chou PY, Fasman GD: *Production of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence*. *Adv Ezymol* 47:145-148, 1978
- 9) Furuya Y, Yoshida Y, Katayama T, Kawamori F, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A, Kawamura A: *Specific amplification of Rickettsia tsutsugamushi DNA from clinical specimens by polymerase chain reaction*. *J Clin Microbiol* 30:2628-2630, 1991
- 10) Murai K, Tachibana N, Okayama A, Shishimi E, Tsuda K, Oshikawa T: *Sensitivity of polymerase chain reaction assays for Rickettsia tsutsugamushi in patients' blood samples* *Microbiol Immunol* 36:1145-1153, 1992
- 11) Kee SH, Choi IH, Choi MS, Kim IS, Chang WH: *Detection of Rickettsia tsutsugamushi in experimentally infected mice by PCR*. *J Clin Microbiol* 32:1435-1439, 1994
- 12) Stover CK, Marana DP, Carter JM, Roe BA, Mardis E, Oaks EV: *The 56-kilodalton major protein antigen of Rickettsia tsutsugamushi: Molecular cloning and sequence analysis of the sta56 gene and precise identification of a strain-specific epitope*. *Infect Immunol* 58:2076-2084, 1990
- 13) Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, Tamura A: *Cloning and sequencing of the gene(tsg56) encoding a type-specific antigen from Rickettsia tsutsugamushi*. *Gene* 31:119-122, 1990
- 14) Oaks EV, Stover CK, Rice RM: *Molecular cloning and expression of Rickettsia tsutsugamushi genes for two major proteins in Escherichia coli*. *Infect Immunol* 55:1156-1157, 1987