



## 저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#) 

2009년 2월

석사학위논문

우리나라 남서부 지역에서 확인된 *Orientia tsutsugamushi*의 56kDa 단백질유전자의 계통분석

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 유 미

우리나라 남서부 지역에서 확인된 *Orientia tsutsugamushi*의 56kDa 단백질유전자의 계통분석

Phylogenetic analysis of the 56 kDa Protein genes of *Orientia tsutsugamushi* in Southwestern Korea

2009年 2月 25日

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 유 미

우리나라 남서부 지역에서 확인된 *Orientia tsutsugamushi*의 56kDa 단백질유전자의 계통분석

지도교수 김 동 민

이 논문을 이학석사학위 청구논문으로 제출함

2008年 12月

조선대학교 대학원

바이오신약개발학과

이 유 미

# 이유미의 석사학위 논문을 인준함

위원장    조선대학교    교수    장숙진    인

위    원    조선대학교    교수    임성철    인

위    원    조선대학교    교수    김동민    인

2008年 12月

조선대학교 대학원

# TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS.....	I
LIST OF TABLES.....	III
LIST OF FIGURES.....	IV
ABSTRACT.....	V
I . 서론.....	1
II . 재료 및 방법.....	3
1. 대상 환자.....	3
2. 면역형광법에 의한 항체검사.....	3
3. <i>O. tsutsugamushi</i> DNA 정제.....	3
4. Nested polymerase chain reaction.....	4
5. 염기서열 정렬 및 계통분석.....	5
III . 결과.....	6
1. 대상환자의 특징.....	6
2. Nested PCR 결과.....	6
3. <i>O. tsutsugamushi</i> 에 대한 항체양성을.....	6
4. 염기서열 정렬 및 계통분석.....	6
IV . 고찰.....	9
V . 요약 및 결론.....	11
VI . 감사의 말씀.....	12

VII. 참고문헌.....13

## LIST OF TABLES

Table 1. Primers used in this study.....	20
Table 2. Strains of 56kDa protein genes of <i>O. tsutsugamushi</i> used in this study.....	21
Table 3. Genotypes of <i>O. tsutsugamushi</i> isolated from patients.....	23
Table 4. The detection of <i>O. tsutsugamushi</i> in the patient's blood by IFA.....	24
Table 5. Homology of nucleotide 56kDa gene among <i>O. tsutsugamushi</i> strains.....	25
Table 6. Homology of the deduced amino acid of 56kDa gene among <i>O. tsutsugamushi</i> strains.....	27



## LIST OF FIGURES

Figure 1. Position of primer used for 56-kDa gene amplification. Open reading frame of the gene is represented by the heavy line, and boxes I, II, III and IV show the position of variable domains.....	29
Figure 2. Alignment of deduced amino acid sequence of 56kDa protein genes.....	30
Figure 3. Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of <i>O. tsutsugamushi</i> genes.....	32
Figure 4. Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequence of <i>O. tsutsugamushi</i> genes.....	34

## ABSTRACT

### Phylogenetic analysis of the 56 kDa Protein genes of *Orientia tsutsugamushi* in Southwestern Korea

Lee Yu-Mi

Adviser: Prof. Kim Dong-min

Department of Bio new drug development

Graduate School of Chosun University

**OBJECTIVE:** The serotype of *Orientia tsutsugamushi* shows the differences in virulence in mouse. Up to now, Few genotypes of *O. tsutsugamushi* has been reported in the southwest of Korea. The anther studied new sort of genotypes of *O. tsutsugamushi* in the southwest of Korea. To determine genotype, the analisis of *O. tsutsugamushi* isolated in southwestern Korea were investigated.

**METHODS:** The anther performed nested polymerase chain reaction (PCR) to the target 56 kDa protein gene in the blood and eschar of patients suffering with possible scrub typhus infection admitted to Chosun University Hospital. The anther also conducted immunofluorescent antibody assay (IFA) in the serum of blood. All patients were admitted from September 1, 2004 to December 31, 2004. The DNA sequences were compared with nucleotide sequences of *O. tsutsugamushi* registered in the GenBank for sequence homology analysis. Phylogenetic analysis of the isolates and some published sequences from 67 strains characterized previously were carried out with Neighbor-joining method by clustal X software.

**RESULTS:** The author found that a variety of genotypes were isolated in southwestern Korea such as Boryong, Jecheon, Kato, Neimeng-65, Kawasaki strain. DNA similarity was observed highest 98~99%, and lowest 65~73% with clinical strains. Among 66 samples, 58 samples belonged to either the Boryong Cluster(Kuroki strain) or Karp Cluster(Jecheon strain) isolated from Korea. However, remaining 7 samples from other clusters (Kato, Kawasaki and Neimeng-65 strain) are none isolated for the first time in Korea.

**CONCLUSION:** It found that Boryong genotype generally distributed dominantly in the southwest of Korea. Additionally, other genotypes, for example Jecheon, Kato, Neimeng-65 and Kawasaki genotype appeared in the southwest of Korea.

---

**Key words:** *Orientia tsutsugamushi*, scrub typhus, Nested PCR, 56kDa protein

# 1. 서론

초원열, 열대 티푸스 등으로 알려진 쯔쯔가무시병은 *Orientia tustugamushi*에 의해 감염되는 급성열성질환으로 동남아시아의 농촌지역에 광범위하게 분포하고 있다(1-3). 우리나라에서는 1951년 주한 UN군에서 쯔쯔가무시병의 발병이 있었다고 보고되었으며(4-6), 1986년 한국인에서 처음으로 혈청학적 진단으로 발병이 증명되었다(7,8). 그리고 1987년에 한국인 환자 혈액에서 *O. tsutsugamushi*를 분리하여 이 질환의 발생이 세균학적으로 증명되었고(9) 현재는 제주도를 포함한 전국에서 발생하고 있다(10,11).

감염원인 *O. tsutsugamushi*는 절대 세포 내 기생세균으로 숙주세포의 세포질에서 증식하며 그람음성균으로 Giemsa 염색시 짙은 보라색의 간균 혹은 단간균의 형태로 관찰된다. *O. tsutsugamushi*는 야생들쥐 등에 기생하는 털진드기(*Leptotrombidium* spp.)를 매개로 사람에게 감염된다(12).

*O. tsutsugamushi*는 다른 *Rickettsia* 중에서도 항원의 변이가 특징적으로 많은 종으로 현재까지 8 가지의 항원 유전자(scrub typhus antigen genes; sta 150, 110, 72, 58, 56, 49, 47, and 20)가 발견되고 있다(13,14). 이 중 56kDa 형 특이항원(type-specific antigen: TSA)는 *Orientia* 표면에 존재하는 주 외막단백(major outer membrane protein)으로 숙주세포를 침투하는데 관여하리라 추측된다(13). 56kDa 항원은 감염된 숙주에서 체액성 면역을 강하게 유발하는 주 면역항원(immunodominant antigen)으로 알려져 있는데, 이는 단백질내 군 특이항원기(group-specific epitope) 및 형 특이항원기(type-specific epitope)를 모두 포함하고 있어 진단에 중요한 항원으로 알려져 있다(15). Ohashi 등에 의하면 56kDa 단백질의 유전자는 균주마다 차이를 보이는 변이부분(variable domain: VD)이 있으며(16), 이의 변이에 따라 다양한 혈청형으로 구분되는데(17), 주로 세가지의 원형균주(prototype) 즉 Karp, Kato, Gilliam이 분리균주의 대부분을 차지하며, 그 외 지역적으로 주항원의 변이에 의해 Shimokosshi, Kuroki, Kawasaki, Boryong 등의 다른 형이 존재한다. 56kDa TSA는 균주에 따라 차이가 있으나 기본 구조는 유사하며 약 1,600bp정도의 open reading frame(ORF)을 갖고 있다(13,16,18).

쥐를 대상으로한 연구에서 *O. tsutsugamushi*의 혈청형에 따라 병원성

(virulence)이 다르다는 보고가 있다(19). 특히 어떤 지역에서는 36.8%의 높은 사망률을 보였으나 그 외의 지역에서는 경증만 나타났다. 이처럼 병원성의 차이는 *O. tsutsugamushi*의 혈청형의 차이와 연관이 있다. 그러므로 혈청형의 지역적 분포를 조사하는 것은 중요하다.

*O. tsutsugamushi*의 항원에 의해 분류되는 혈청형은 혈청형마다 염기서열의 변이가 존재하기 때문에 더욱 더 세분화된 유전형이 존재한다.

현재 우리나라 남서부 지역에 대한 연구가 이뤄지지 않았기 때문에 우리나라 남서부 지역에 어떤 유전형이 존재하는지, 그리고 새로운 유전형이 존재하는지 확인해 볼 필요가 있다.

본 연구에서는 세포외막에 다량으로 존재하는 56kDa 단백 유전자를 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction: PCR)으로 증폭하고, 염기서열과 아미노산 서열을 확인하여 기존에 알려진 다른 국내외 분리주들과의 유전학적 계통분석을 시행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상환자

2004년 9월 1일부터 2004년 12월 31일 사이 우리나라 남서부에 위치한 조선대병원에 급성열성질환으로 내원한 환자 중 가피나 반구진성의 피부 발진이 있고 두통, 쇠약감, 근육통, 기침, 오심, 복부 불쾌감 중 두 가지 이상의 증상이 동반된 발열이 있는 18세 이상의 성인을 대상으로 환자나 그 보호자에게 승낙을 받은 후 연구에 참여시켰다(20).

PCR을 위한 검체로 가피와 혈액을 이용하였고, 면역형광법(Immunofluorescent Assay: IFA)를 시행하는데 혈청을 이용하였다.

### 2. 면역형광법에 의한 항체 검사

IFA 검사는 Robinson 등에 의해 기술된 방법에 약간의 수정을 통해, 표준 *O. tsutsugamushi* 항원(Gilliam, Karp, Kato, and Boryong)에 대한 IgM과 IgG 항체를 검사하였다(21). 간략하게 기술하면, 혈청은 phosphate buffer saline(PBS)으로 1:32로 희석하였고 2배수 연속 희석액을 오리엔차 항원이 고정되어 있는 슬라이드 위에 떨어뜨렸다. 실험 슬라이드는 37°C에서 20분간 일차반응 시킨 후 PBS와 증류수로 세척하고 건조시킨다. 1:32로 희석한 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG, IgM을 각각의 well에 5 $\mu$ l씩 가하여 동일한 방법으로 이차 반응시키고 세척, 건조 시킨 후 FA mounting solution(Bacto, USA)으로 고정시켜 400배로 확대한 형광현미경(Axioskop2; Carl Weiss, Germany)으로 관찰하였다. 환자의 IFA 항체역가는 각각의 Gilliam, Karp, Kato와 Boryong 항원에 대한 항체역을 확인하였고 이중 가장 높은 항체역가를 환자의 IFA 항체 역가로 이용하였다. Scrub typhus는 *O. tsutsugamushi*에 대한 IFA IgM 항체역가가 1:10 이상 증가되거나 급성기와 회복기의 항체역가가 4배 이상 상승 소견을 보이는 경우 확진으로 정의하였다(22).

### 3. *O. tsutsugamushi* DNA 정제

오리엔차는 세포내에 존재하기 때문에, 전혈 중의 백혈구 연층(buffy

coat)에서 DNA를 정제하였다. 또한 가피가 있는 경우 가피에서도 DNA를 정제하였다. QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였는데 자세한 방법은 다음과 같다. 200  $\mu\text{l}$  buffy coat에 20  $\mu\text{l}$  proteinase K (20 mg/ml)를 넣고 살짝 섞는다. 그 후 200  $\mu\text{l}$  AL buffer를 넣고 56°C에서 10분 동안 반응시킨 후 200  $\mu\text{l}$  Ethanol (100%)을 넣고 섞은 후, 14,000 rpm으로 원심분리를 한다. 분리된 상층액을 column에 넣고 8,000 rpm에 원심분리한 후 Washing buffer 1,2 (500  $\mu\text{l}$ )를 넣고 차례차례 원심분리 한다. 마지막으로 50  $\mu\text{l}$ ~80  $\mu\text{l}$ 의 AE buffer를 넣고 8,000 rpm에서 1 분간 원심분리를 두 번 반복한다. 정제된 DNA는 -20°C에 저장한다.

#### 4. Nested polymerase chain reaction

Nested PCR은 Furuya 등이 이용한 방법에 약간의 수정을 통해 시행되었다 (23). Nucleotide primer는 *O. tustusgamushi* Gilliam 형의 56kDa 항원을 암호화하는 유전자의 nucleotide sequence에 근거하였다(Table 1)(23). 이들 primer들은 56kDa 단백질 유전자의 variable domain II, III부분을 증폭한다 (Figure 1). 첫 번째 PCR에서는 primer 34와 primer 55를 사용했으며, 두 번째 PCR에서는 primer 10과 primer 11를 사용하였다. 모든 primer는 Bioneer(Daejeon, Korea)에 주문, 합성하여 사용하였다.

첫 번째 PCR은 2  $\mu\text{l}$  DNA, 각각 1  $\mu\text{l}$ 씩 5 pmole/ $\mu\text{l}$ 의 forward, reverse primer, 10  $\mu\text{l}$  2X EXCEL-Taq™ PreMix (Taq polymerase 2 U, 400  $\mu\text{M}$  dNTP, 2.0 mM MgCl<sub>2</sub> KCl, Tris-Cl; Corebio, Korea), 멸균된 3차 증류수를 넣어 총 20 $\mu\text{l}$ 의 반응액을 만들었다. PCR 수행조건은 94°C에 10분, 그리고 94°C에서 1분, 61°C에서 1분, 72°C에서 1분의 3단계를 35주기로 하며, 마지막으로 72°C에서 10분 동안 연장시킨다. 두 번째 PCR은 template로 DNA대신에 1  $\mu\text{l}$ 의 첫 번째 결과물을 넣었으며, PCR 수행조건은 94°C 10분, 94°C 30초, 63°C 30초, 72°C 1분을 30주기, 72°C에서 7분 동안 연장시킨다. PCR은 Biosystems Veriti™ 96-well Thermal cycler를 이용하였으며, 0.5 ng/ml Etbr (Ethidium bromide)을 넣은 1.2% agarose gel (Seakem® LE agarose)에 Bioneer electrophoresis machine (Bioneer, Korea)으로 100 V (0.5X TAE, Bioneer, Korea)에 40분 동안 전기영동 하였다.

## 5. 염기서열 정렬 및 계통분석

PCR 결과 증폭이 확인된 샘플들은 QIAquick gel extraction kit(Qiagen, Hilden, Germany)로 다시 정제하여 (주)제노텍(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였다. (주)제노텍에서는 sequencing을 하기 위해 3730xl DNA Analyzer(Applied Biosystems, Foster, CA, USA)을 사용하였다.

National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Blast를 이용하여 증폭된 샘플들의 strain을 확인하였으며, Crustal X 프로그램을 사용하여 염기서열 및 아미노산 서열을 정렬하고 분석하였다. 계통분석에서는 neighbor joining method로 실시 하였으며, 계통도의 신뢰성을 높이기 위해 1,000번의 bootstrap을 행하였다. 한국 및 외국에 분포하는 GenBank에 보고된 *O. tsutsugamushi* 56kDa 유전자 부위의 염기서열 및 아미노산서열을 이용하여(Table 2) 계통도를 작성하였다. 계통도를 보기 위해 TreeExplorer를 사용하였으며, strain과 환자들의 상동성을 비교하기 위해 LaserGene program(DNASTAR, USA)를 사용하였다.

계통도에서 Serotype으로 구분짓는 것은 Tamura 등(24), Fournier 등(25)의 논문을 참고로 하였다.



# III . 결과

## 1. 대상환자의 특징

총 88명의 환자들이 이 연구에 참여하였는데, 이 환자들 중 렙토스피라증이나 신증후군 출혈열 등의 타질환이 동반된 환자나, scrub typhus로 확진되지 않은 12명은 연구에서 제외되었다. 76명의 확진환자 중 66명의 환자의 혈액과 가피에서 PCR 검사 양성으로 확인되었다.

## 2. Nested PCR 결과

66개의 샘플 중 58개 샘플은 Boryong 형으로 확인 되었는데 이는 84.1%를 차지하였다. 그 외에도 Kawasaki, Kato, Karp type과 Neimeng-65 형이 확인되었다(Table 3).

## 3. *O. tsutsugamushi*에 대한 항체양성을

Boryong cluster로 확인된 환자가 총 58명이었으며 이 중 IFA상 Boryong 이외의 항원에 비해 Boryong 항원 대한 항체역가가 가장 높은 경우는 IgM은 55명으로 94.8%, IgG는 56명으로 96.6%를 차지하였다(Table 4). 하지만 대부분 다른 항원과도 교차반응을 보였다. Karp cluster로 확인된 환자는 IgM, IgG 항체가 네 항원과 모두 높은 반응을 보였으며 Kato cluster로 확인된 CUH4-3은 모든 항원에 반응하였으며, CUH4-6은 IgM에서 Karp 항원과, IgG에서 Boryong 항원과 가장 높은 항체를 나타냈다. Kawasaki cluster로 확인된 환자에서는 IgM, IgG 모두 Gilliam 항원에서 가장 높은 항체를 보였지만 다른 항원과도 높은 교차반응을 보였다. Neimeng-65 cluster로 확인된 환자는 Boryong, Kato 항원과 가장 높은 항체를 보였다.

## 4. 염기서열 정렬 및 계통분석

*O. tsutsugamushi* 56kDa 단백질 유전자를 증폭하여 염기서열을 확인하였다. NCBI의 Blast로 염기서열을 확인한 결과 66개의 양성샘플 중 58개의 샘플들은 Boryong cluster에 속하였으며, Karp cluster에 1개, Kato cluster

에 2개, Kawasaki cluster에 4개, Neimeng-65 cluster에 1개가 나타났다 (Table 3).

샘플들의 염기서열 상동성을 비교하면 각각의 cluster들과 98.9~99.8%의 상동성을 보였다(Table 5). Boryong cluster에 속하는 58개의 샘플들은 Boryong strain과는 98.9~99.3%의 상동성을 보였으며 CUH4-271의 경우 Jecheon strain과 99.8%, CUH4-3, CUH4-6은 Omagari strain과 99.3~99.5%, CUH4-57은 Kanda strain과 99.5%, CUH4-31, CUH4-142, CUH4-324는 Taguchi strain과 99.5%의 상동성을 보였다. 그리고 CUH4-117은 Neimeng-65 strain과 99.3%의 상동성을 보였다. TA678 strain과 65.7~73.7%로 가장 낮은 상동성을 보였다.

아미노산 서열분석 결과 10개의 샘플 중 7개의 샘플들은 각각의 strain들과 100% 일치하였다(Table 6). CUH4-3,6은 Kato cluster의 Kato, Omagari strain과, Kawasaki cluster의 CUH4-31, 142, 324는 Oishi, Taguchi strain과, CUH4-57은 Kanda, Kawasaki strain과, Karp cluster의 CUH4-271은 Jecheon strain과 100% 일치하였다. CUH4-134, CUH4-485의 경우 Boryong strain과 각각 98.6, 99.3%의 상동성을 보였다. 그리고 CUH4-117의 경우 Neimeng-65 strain과 86.9%로 가장 낮은 상동성을 보였다.

56kDa 단백질 유전자의 증폭 부위는 VDII, III부위로 샘플들을 아미노산 정렬해 보면 strain의 변이 정도를 볼 수 있다(Figure 2). Karp strain과 CUH4-271을 보면 VDII 부분은 많이 다르지만 VDIII 부분은 100% 일치하였으며, CUH4-31,142,324의 경우 VDII, III부분만 보면 Kawasaki strain과 아미노산 하나의 차이를 보였다. 나머지 샘플들은 VDII, III부분만 본다면 cluster를 이루는 strain들과 100% 일치하였다.

한국 및 외국에 분포하는 GenBank에 보고된 *O. tsutsugamushi*의 56kDa 단백질 유전자의 67개 strain과 염기서열과 아미노산서열에 따른 계통도를 작성하였다.

염기서열 계통도를 보면 PCR 결과 일반적으로 많이 확인된 샘플들은 Boryong, Kuroki, Nishini strain들과 함께 Boryong cluster를 이루고 있으며, CUH4-271은 국내 분리주인 Jecheon strain과 가지를 형성하며 Hirahata, Kamimoto, Matsuzawa strain들과 함께 Karp cluster를 이룬다. CUH4-3, CUH4-6은 Akita-7, Omagari, kato strain과 한 가지를 형성하며

Kato cluster를 이루고 있으며, CUH4-31, CUH4-57, CUH4-142, CUH4-324는 Kanda, Kawasaki, Oishi, Taguchi strain과 한 가지를 형성하며 Kawasaki cluster를 이루고 있다. CUH4-117은 Neimeng-65 strain과 별개의 cluster를 형성하였다(Figure 3).

아미노산서열 계통도를 보면 염기서열 계통도와 마찬가지로 CUH4-134, 485는 Boryong cluster를 형성하며, CUH4-271은 Karp cluster를, CUH4-3, 6은 Kato cluster를, CUH4-31, 57, 142, 324는 Kawasaki cluster를, CUH4-117은 Neimeng-65 strain과 별개의 cluster를 형성하였다(Figure 4).

## IV. 고찰

쯔쯔가무시병의 원인균인 *O. tsutsugamushi*는 그 혈청형이 다양하고, 유행하는 지역에 따라 혈청형이 다르다고 보고되고 있다(26-29). 따라서 각 지역에서 유행하는 혈청형의 분포를 분석하는 것은 *O. tsutsugamushi*의 분류에 대한 기초연구뿐만 아니라 임상 및 실험실에서의 진단 및 예방백신의 개발에 필수적으로 요구된다.

*O. tsutsugamushi*에는 다양한 항원이 존재하는데(13,14), 이 중 56kDa 단백질 유전자에는 균주마다 변이가 있어(16), 이의 변이에 따라 다양한 혈청형으로 구분된다(17). 주로 세 가지의 원형균주(prototype) 즉 Karp, Kato, Gilliam이 분리균주의 대부분을 차지하며, 그 외 지역적으로 주항원의 변이에 의해 Shimokosshi, Kuroki, Kawasaki, Boryong 등의 다른 형이 존재한다.

우리나라에서는 분리주인 Boryong 형의 경우 최 등(30)이 1995년부터 1996년 발생한 쯔쯔가무시병의 혈청 역학적 연구에서 제주를 제외한 전국적으로 분포된 주요 혈청형으로 보고하였다. 또한 국립보건연구원의 2001년 실험실 진단 자료에 의하면 Boryong 형, Karp 형, Gilliam 형, Kato 형 순으로 보고하였다. 한편 경증환자가 많은 것으로 알려진 남쪽 지역에서는 Boryong 형이 우점형인데 반해 중증환자가 많은 강원, 경기지역에서는 Gilliam, Karp 형이 많은 점으로 보아 혈청형에 따른 병독성의 차이를 추측할 수 있다(31).

본 연구는 그 동안 우리나라 남서부지역의 유전형에 대한 연구가 없었기 때문에 *O. tsutsugamushi*의 56kDa 단백을 이용한 PCR을 수행하여 분포하는 유전형을 알아보았다. Nested PCR에 의해 56kDa 단백질 유전자의 VDII와 VDIII를 포함하는 483bp를 증폭시키는데 일반적으로 이 유전자 부위는 변이가 크기 때문에 대부분의 유전형을 확인할 수 있다(32).

56kDa 단백질 유전자 증폭 결과 우리나라 남서부지역에는 Boryong 형이 많이 나타났는데 이것은 충남 이남에는 Boryong 형이 주를 이루며, 경기 강원지역에서는 Karp와 Gilliam 형이 주를 이뤄 지역적으로 다른 분포양상을 보인다는 보고(33-35)와 일치하는 결과로 해석할 수 있겠다.

하지만 Boryong 형 이외에도 Jecheon, Kato, Kawasaki, Karp, Neimeng-65 형들이 다양하게 나타나고 있음을 알 수 있었으며, 특히 아직까지 우리나라에서 분리된 바 없는 Kato Cluster된 CUH4-3, CUH4-6이 처음으로 확인되었다. 이러한 다양한 유전형이 확인됨에 따라 추후 유전형에 따라 임상적 특징에서의 차이 및 중증도에서 차이를 보이는지 등에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

*O. tsutsugamushi* 16s rRNA 유전자의 Gilliam, Karp, Kato, Kawasaki, Kuroki 그리고 Shimokoshi strain의 상동성을 분석한 결과 모든 strain 간의 상동성이 98.4% 이상임이 알려져 있어(36) 16s rRNA 유전자는 다른 species와 genus에 속하는 microorganism과의 구분에는 유용하나 *O. tsutsugamushi*에 속하는 strain의 typing에는 적합하지 않으며 56kDa 단백질 유전자를 사용하는 것이 더 유용할 것이라 생각된다(37). 본 연구 결과 우리나라 남서부지역에 기존에 나타나지 않은 유전형이 확인됨에 따라 앞으로 이 유전형에 대한 연구가 꾸준히 이루어져야 할 것이다.

결론적으로 우리나라 남서부지역에서는 가장 흔한 유전형이 Boryong 형임을 확인하였고, 그동안 국내에 확인되지 않았던 Kato, Neimeng-65 그리고 Kawasaki 형들도 확인되어 우리나라 남서부지역에는 다양한 유전형이 존재함을 확인하였다.

## V. 요약 및 결론

배 경: 쥐를 이용한 연구에서 *Orientia tsutsugamushi* 혈청형의 차이는 병독성의 차이와 연관이 있다고 알려져 있어, 혈청형의 지역적 분포를 조사하는 것은 중요하다. 현재 우리나라 남서부 지역에 *O. tsutsugamushi*의 어떤 유전형이 존재하는지에 대한 연구가 거의 이뤄지지 않았기 때문에 *O. tsutsugamushi*의 56kDa 단백질 유전자를 이용하여 유전학적 계통분석을 시행하였다.

방 법: 2004년 9월 1일부터 12월 31일까지 급성발열성질환으로 조선대학교병원을 내원한 환자를 대상으로 환자의 혈액과 가피를 이용하여 *O. tsutsugamushi*의 56kDa 단백질유전자를 대상으로 한 nested PCR을 시행하였다. PCR 증폭산물을 GenBank에 보고된 67개의 sequence들과 상동성 및 계통도를 비교 분석 하였다.

결 과: PCR 결과 Boryong, Jecheon, Kato, Neimeng-65, Kawasaki strain들이 확인되었다. 증폭된 환자 샘플들은 각각의 strain들과 최고 98~99%의 상동성을, 최저 65~73%의 상동성을 보였다. PCR결과 66개의 양성샘플 중 58개가 기존 국내 분리주인 Boryong strain과 Boryong cluster를 이루며, 또 다른 1개 샘플은 Jecheon strain과 Karp cluster를 보였다. 이외에도 기존 국내에서는 분리되지 않았던 Kato, Kawasaki 그리고 Neimeng-65 strain이 확인되었다.

결 론: 우리나라 남서부지역에서는 가장 흔한 유전형이 Boryong 형임을 확인하였고, 그동안 국내에 확인되지 않았던 Kato, Neimeng-65 그리고 Kawasaki 형들도 확인되어 우리나라 남서부지역에는 다양한 유전형이 존재함을 확인하였다.

## VI. 감사의 말씀

다시 학교를 다닌 지 벌써 2년이 넘었다니 시간이 참 빠르게 지나가는 것 같습니다. 아직도 배워야 할 것이 많은 제가 졸업하다니 참으로 영광스럽습니다.

저에게 다시 학교를 다니게 해주시고 많은 가르침을 주신 김동민 교수님께 정말 감사드립니다. 처음 여기 실험실 왔을 때 저에게 따뜻이 대해주고 같이 많은 일을 겪은, 너무나도 든든한 형선 언니, 실험에 대해 아무것도 모르는 저를 많이 가르쳐 주시고 많이 도와주신 박해령 박사님, 제 질문에 친절히 또 열심히 답해주시는 장숙진 교수님 모두 감사드립니다.

나에게 많은 즐거움을 주는 사랑스런 미선이와 어느새 벌써 같이 생활한 지 3개월이 되가는 다미, 다시 돌아오신 주영선생님, 또 날 많이 아껴주고 챙기는 Ganesh, 이번에 같이 졸업하게 된 학민씨, 또 저 멀리 가 있는 이쁜 수미까지 제게 많은 도움을 주시고 모두 고맙습니다. 어느 샌가 또 내 옆에 있는 나의 절친한 친구 효정이, 가끔씩 정말 필요한 정보를 주시는 권안성 선생님, 곤란한 일로 도움을 청하면 도와준 지윤 언니 모두 감사합니다.

그리고 제게 아주 특별한 우리 가족에게도 감사합니다. 철없는 막내지만 많이 예뻐해 주시고 우리 가족의 원동력이신 엄마, 항상 가족의 큰 힘이 되는 큰 언니, 언제나 많은 도움을 주시는 형부, 말썽꾸러기이지만 너무나도 이쁜 승혁, 승빈, 저 멀리서 막내 기운을 북돋아주는 큰 오빠, 새 언니, 요즘 아무것도 안하는 못된 동생을 그래도 이해해주는 작은 오빠, 그리고 내 마음 속의 큰 자리로 남아있는 우리 작은 언니 모두 제게 너무나도 좋은, 고마운 가족입니다.

졸업이란 마지막이 아니라 새로운 시작입니다.

앞으로도 언제나 밝게 생각하며 즐겁게 생활하는 제가 되겠습니다.

2008. 12. 이유미

## Ⅶ . 참고문헌

- (1) Leelarasamee A, Chupaprawan C, Chenchittikul M, Udompanthurat S. (2004) Etiologies of acute undifferentiated febrile illness in Thailand. *J Med Assoc Thai.* 87(5):464-72.
- (2) Phongmany S, Rolain JM, Phetsouvanh R, Blacksell SD, Soukkhaseum V, Rasachack B, Phiasakha K, Soukkhaseum S, Frichithavong K, Chu V, Keolouangkhout V, Martinez-Aussel B, Chang K, Darasavath C, Rattanavong O, Sisouphone S, Mayxay M, Vidamaly S, Parola P, Thammavong C, Heuangvongsy M, Syhavong B, Raoult D, White NJ, Newton PN. (2006) Rickettsial infections and fever, Vientiane, Laos. *Emerg Infect Dis.* 12(2):256-62.
- (3) Suttinont C, Losuwanaluk K, Niwatayakul K, Hoontrakul S, Intaranongpai W, Silpasakorn S, Suwancharoen D, Panlar P, Saisongkorh W, Rolain JM, Raoult D, Suputtamongkol Y. (2006) Causes of acute, undifferentiated, febrile illness in rural Thailand: results of a prospective observational study. *Ann Trop Med Parasitol.* 100(4):363-70.
- (4) MUNRO-FAURE AD, ANDREW R, MISSEN GA, MACKAY-DICK J. (1951) Scrub typhus in Korea. *J R Army Med Corps.* 97(4):227-9.
- (5) 406MGL. (1951) Scrub typhus in korea. 406 Annual Historical Report. p13.
- (6) Fuller, H.S, and J.E Smadel. (1954) Rickettsial disease and the Korean Conflict. Army Medical Service Graduate School, Walter Reed Army Medical Center, Washington D.C., April.



- (7) Lee JS, Ahn C, Kim YK, Lee MH. (1986) Thirteen cases of rickettsial infection including 9 cases of tsutsugamushi disease first confirmed in Korea. *J Korean Med Assoc.* 29:430-8.
- (8) Yi KS, Chong YS, Kwon OH, Lee SY, Kim KY, Ujiye A. (1986) Tsutsugamushi disease in Chinhae area confirmed by serology. *J Korean Soc Microbiol.* 21:113-20.
- (9) Chang WH, Kang JS. (1987) Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* from Korean patients. *J Korean Med Assoc.* 30:999-1008.
- (10) Chang WH. (1994) Tsutsugamushi Disease in Korea. Seoul: Seohung Press
- (11) Choi MS, Park SK, Chang WJ, Huh MS, Kim HR, Han TH, Kim IS, Chang WH. (1995) A seroepidemiological survey on the scrub typhus in Korea, 1994. *J Korean Soc Microbiol.* 30:593-602
- (12) Watt G, Parola P. (2003) Scrub typhus and tropical rickettsioses. *Curr Opin Infect Dis.* 16(5):429-36.
- (13) Stover CK, Marana DP, Carter JM, Roe BA, Mardis E, Oaks EV. (1990) 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 Immun.* 58(7):2076-84.
- (14) Oaks EV, Stover CK, Rice RM. (1987) Molecular cloning and expression of *Rickettsia tsutsugamushi* genes for two major protein antigens in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 55(5):1156-62.

(15) Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, Tamura A. (1990) Cloning and sequencing of the gene (tsg56) encoding a type-specific antigen from *Rickettsia tsutsugamushi*. *Gene*. 2;91(1):119-22.

(16) Ohashi N, Nashimoto H, Ikeda H, Tamura A. (1992) Diversity of immunodominant 56-kDa type-specific antigen (TSA) of *Rickettsia tsutsugamushi*. Sequence and comparative analyses of the genes encoding TSA homologues from four antigenic variants. *J Biol Chem*. 25;267(18):12728-35.

(17) Kawamori F, Akiyama M, Sugieda M, Kanda T, Akahane S, Yamamoto S, Ohashi N, Tamura A. (1993) Two-step polymerase chain reaction for diagnosis of scrub typhus and identification of antigenic variants of *Rickettsia tsutsugamushi*. *J Vet Med Sci*. 55(5):749-55.

(18) Ohashi N, Tamura A, Ohta M, Hayashi K. (1989) Purification and partial characterization of a type-specific antigen of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun*. 57(5):1427-31.

(19) Ree HI, Kim TE, Lee IY, Jeon SH, Hwang UW, Chang WH. (2001) Determination and geographical distribution of *Orientia tsutsugamushi* serotypes in Korea by nested polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 65(5):528-34.

(20) Kim DM, Kim HL, Park CY, Yoon SH, Song HJ, Shim SK. (2006) Scrub typhus : A Prospective Study of 76 Cases. *Infection and Chemotherapy*. Vol. 38, No. 4:186-91

(21) 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):900-5.

(22) World Health Organization (WHO) (2004) WHO recommended surveillance standards. 2nd ed. Available at [http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr\\_isr992.pdf](http://www.who.int/emc-documents/surveillance/docs/whocdscsr_isr992.pdf). Accessed 19 June.

(23) 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(6):1637-40.

(24) Tamura A, Yamamoto N, Koyama S, Makisaka Y, Takahashi M, Urabe K, Takaoka M, Nakazawa K, Urakami H, Fukuhara M. (2001) Epidemiological survey of *Orientia tsutsugamushi* distribution in field rodents in Saitama Prefecture, Japan, and discovery of a new type. *Microbiol Immunol.* 45(6):439-46.

(25) Fournier PE, Siritantikorn S, Rolain JM, Suputtamongkol Y, Hoontrakul S, Charoenwat S, Losuwanaluk K, Parola P, Raoult D. (2008) Detection of new genotypes of *Orientia tsutsugamushi* infecting humans in Thailand. *Clin Microbiol Infect.* 14(2):168-73. Epub 2007 Dec 10.

(26) Traub R, Wisseman CL Jr. (1974) The ecology of chigger-borne rickettsiosis (scrub typhus). *J Med Entomol.* 11(3):237-303.

(27) Tamura A, Takahashi K, Tsuruhara T, Urakami H, Miyamura S, Sekikawa H, Kenmotsu M, Shibata M, Abe S, Nezu H. (1984) Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* antigenically different from Kato, Karp, and Gilliam strains from patients. *Microbiol Immunol.* 28(8):873-82.

(28) Yamamoto S, Kawabata N, Tamura A, Urakami H, Ohashi N, Murata M, Yoshida Y, Kawamura A Jr. (1986) Immunological properties of

Rickettsia tsutsugamushi, Kawasaki strain, isolated from a patient in Kyushu. *Microbiol Immunol.* 30(7):611-20.

(29) Shirai A, Coolbaugh JC, Gan E, Chan TC, Huxsoll DL, Groves MG. (1986) Serologic analysis of scrub typhus isolates from the Pescadores and Philippine Islands. *Jpn J Med Sci Biol.* 35(5-6):255-9.

(30) Choi MS, Chang WJ, Park SK, Huh MS, Kim HR, Han TH, Kim IS. (1997) Seroepidemiological Survey of Scrub Typhus in Korea, 1995-1996. *Journal of Bacteriology and Virology.* 32:219-26.

(31) 김효열. (2004) 쯔쯔가무시병의 최근 국내동향. 대한내과학회. Vol.67:516-22

(32) Tay ST, Rohani YM, Ho TM, Shamala D. Sequence analysis of the hypervariable regions of the 56 kDa immunodominant protein genes of *Orientia tsutsugamushi* strains in Malaysia. *Microbiol Immunol.* 2005;49(1):67-71.

(33) Chang WH, Kang JS, Lee WK, Choi MS, Lee JH. (1990) Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. *J Clin Microbiol.* 28(4):685-8.

(34) Chang WH, Kang JS. (1992) Characteristic of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. *Progress in Clinical Biochemistry.* Elsevier Science Publishers. 981-84.

(35) Kim IS, Seong SY, Woo SG, Choi MS, Chang WH. (1993) High-level expression of a 56-kilodalton protein gene (bor56) of *Rickettsia tsutsugamushi* Boryong and its application to enzyme-linked

immunosorbent assays. *J Clin Microbiol.* 31(3):598-605.

(36) Ohashi N, Fukuhara M, Shimada M, Tamura A. (1995) Phylogenetic position of *Rickettsia tsutsugamushi* and the relationship among its antigenic variants by analyses of 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 299-304.

(37) Enatsu T, Urakami H, Tamura A. Phylogenetic analysis of *Orientia tsutsugamushi* strains based on the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *FEMS Microbiol Lett.* 1999 Nov 15;180(2):163-9.

(38) Elisberg BL, Campbell JM, Bozeman FM. (1968) Antigenic diversity of *rickettsia tsutsugamushi*: epidemiologic and ecologic significance. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 12(1):18-25.

(39) Qiang Y, Tamura A, Urakami H, Makisaka Y, Koyama S, Fukuhara M, Kadosaka T. (2003) Phylogenetic characterization of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Taiwan according to the sequence homologies of 56-kDa type-specific antigen genes. *Microbiol Immunol.* 47(8):577-83.

(40) Tamura A, Makisaka Y, Kadosaka T, Enatsu T, Okubo K, Koyama S, Yu Q, Urakami H. (2000) Isolation of *Orientia tsutsugamushi* from *Leptotrombidium fuji* and its characterization. *Microbiol Immunol.* 44(3):201-4.

(41) Seong SY, Park SG, Huh MS, Jang WJ, Choi MS, Chang WH, Kim IS. (1997) T-track PCR fingerprinting for the rapid detection of genetic polymorphism. *FEMS Microbiol Lett.* 1997 Jul 1;152(1):37-44.

(42) Cho NH, Kim HR, Lee JH, Kim SY, Kim J, Cha S, Kim SY, Darby AC, Fuxelius HH, Yin J, Kim JH, Kim J, Lee SJ, Koh YS, Jang WJ, Park KH, Andersson SG, Choi MS, Kim IS. (2007) The *Orientia tsutsugamushi* genome reveals massive proliferation of conjugative type IV secretion system and host-cell interaction genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(19):7981-6. Epub 2007 May 2.

**Table 1. Primers used in this study**

Primer name	sequence (5'→3')	Position corresponding to 56kDa gene of Gilliam (from start codon)	PCR product size
34	TCAAGCTTATTGCTAGTGCAATGTCTGC (Forward)	19 ~ 38	1003bp (1st)
55	AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTTGCTGCG (Reverse)	994 ~ 1021	
10	GATCAAGCTTCCTCAGCCTACTATAATGCC (Forward)	396 ~ 426	483bp (2nd)
11	CTAGGGATCCCGACAGATGCACTATTAGGC (Reverse)	849 ~ 879	

**Table 2. Strains of 56kDa protein genes of *O.tsutsugamushi* used in this study**

Cluster <sup>a</sup>	strain	Source (when available)	Geographical origin	GenBank accession number	Reference
Karp	4021	Human	Japan	AF173047	37
Karp	Kamimoto	Human	Japan	AF173046	37
Karp	Mori	Human	Japan	AF173044	37
Karp	Okazaki	Human	Japan	AF173045	37
Karp	CMM1	Rodent	Japan	AF302986	24
Karp	KNP1	Rodent	Japan	AF302987	24
Karp	KNP2	Rodent	Japan	AF302988	24
Karp	Hirahata	Chiggers	Japan	AF173176	40
Karp	R39	Chiggers	Japan	AF201836	40
Karp	R9	Chiggers	Japan	AF201837	40
Karp	Jecheon	Human	Korea	AF430143	Unpublished
	TW261	Rodent	Taiwan	AY222636	39
Karp	Karp	Human	New Guinea	AY956315	Direct Submission
Karp	Matsuzawa	Human	Japan	AF173043	37
	Yeoju	Human	Korea	AF430144	Unpublished
	TW73R	Rodent	Taiwan	AY222628	39
Saitama	TW121	Rodent	Taiwan	AY222639	39
Saitama	TW141	Rodent	Taiwan	AY222638	39
Saitama	TW441	Rodent	Taiwan	AY222634	39
Saitama	FAR1	Rodent	Japan	AF302989	24
Saitama	HSB1	Rodent	Japan	AF302983	24
Saitama	HSB2	Rodent	Japan	AF302984	24
Saitama	UAP1	Rodent	Japan	AF302991	24
Saitama	UAP2	Rodent	Japan	AF302992	24
Saitama	UAP4	Rodent	Japan	AF302993	24
Saitama	UAP7	Rodent	Japan	AF302995	24
Saitama	Pajoo	Human	Korea	AF430142	Direct Submission
Saitama	Yongworl	Human	Korea	AF430141	Direct Submission
	LA-1	Chiggers	Thailand	AF173049	37
	TW45R	Rodent	Taiwan	AY222632	39
	TW201	Rodent	Taiwan	AY222637	39
	TWyu81	Chiggers	Taiwan	AY222640	39
Boryong	Kuroki	Human	Japan	M63380	16
Boryong	Nishino	Human	Japan	AF173048	37
Boryong	Boryong	Human	Korea	AM494475	42
Kato	Kato	Human	Japan	M63382	16
Kato	Akita-7	Rodent	Japan	AF173041	37
Kato	Omagari	Rodent	Japan	AF173040	37
	LF-1	Chiggers	Thailand	AF173050	37
Kawasaki	Kawasaki	Human	Japan	M63383	16
Kawasaki	Kanda	Human	Japan	AF173039	37



Kawasaki	Oishi	Human	Japan	AF173037	37
Kawasaki	Taguchi	Human	Japan	AF173038	37
Gilliam	Gilliam		Taiwan	DQ485289	Unpublished
	Neimeng-65		China	AF140143	Unpublished
	TW461	Rodent	Taiwan	AY222631	39
Gilliam	405S	Human	Japan	AF173036	37
Gilliam	Ikeda	Human	Japan	AF173033	37
Gilliam	Iwataki-1	Rodent	Japan	AF173035	37
Gilliam	LP-1	Chiggers	Japan	AF173034	37
Gilliam	FAR2	Rodent	Japan	AF302990	24
Gilliam	HSB3	Rodent	Japan	AF302985	24
Gilliam	UAP6	Rodent	Japan	AF302994	24
Gilliam	Yonchon	Human	Korea	U19903	41
Gilliam	SXH951	Human	China	AF050669	Unpublished
	Shimokoshi	Human	Japan	M63381	16
	Fuji	Chiggers	Japan	AF201834	40
	LX-1	Chiggers	Japan	AF173042	37
	TA678	Rodent	Thailand	U19904	38
	TW381	Rodent	Taiwan	AY222635	39
	TW521	Rodent	Taiwan	AY222630	39
	TA763	Rodent	Thailand	U80636	38
	TA686	Rodent	Thailand	U80635	38
	TA716	Rodent	Thailand	U19905	38
	TW44R	Rodent	Taiwan	AY222633	39
	TW62R	Rodent	Taiwan	AY222629	39
	TWyu11	Chiggers	Taiwan	AY222641	39

<sup>a</sup> Cluster denotes clustering system proposed by Tamura et al. 2001 (16), and Fournier et al. 2007 (17)

**Table 3. Genotypes of *O. tsutsugamushi* isolated from patients**

Cluster	No. positive	positive rate(%)
Boryong	58	87.9
Kawasaki	4	6.1
Kato	2	3.0
Karp	1	1.5
Neimeng-65	1	1.5
Total	66	

**Table 4. The detection of *O. tsutsugamushi* in the patient's blood by IFA**

Patient	Cluster <sup>a</sup>	Strains	Time <sup>a</sup>	Seropositive to <i>O. tsutsugamushi</i>							
				Boryong		Gilliam		Karp		Kato	
				Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M	Ig G	Ig M
CUH4-271	Karp	Jecheon	9	≥ 1:4096	≥ 1:1280	≥ 1:4096	≥ 1:1280	≥ 1:4096	≥ 1:1280	≥ 1:4096	≥ 1:1280
			27	≥ 1:4096	≥ 1:1280	1:2048	1:640	≥ 1:4096	≥ 1:1280	≥ 1:4096	≥ 1:1280
CUH4-134	Boryong	Boryong	6	1:2048	< 1:10	-	-	-	-	-	-
			12	≥ 1:4096	≥ 1:1280	1:2048	1:640	1:2048	1:640	1:2048	1:640
CUH4-485	Boryong	Boryong	7	≥ 1:4096	1:1280	1:4096	1:1280	1:4096	1:1280	≥ 1:4096	1:1280
			13	≥ 1:4096	1:1280	≥ 1:4096	1:1280	≥ 1:4096	1:1280	≥ 1:4096	1:1280
CUH4-3	Kato	Omagari	9	1:1024	1:640	1:128	1:320	1:512	1:640	1:1024	1:640
			21	≥ 1:4096	≥ 1:1280	≥ 1:4096	≥ 1:1280	≥ 1:4096	≥ 1:1280	≥ 1:4096	≥ 1:1280
CUH4-6	Kato	Omagari	7	-	-	-	-	-	-	-	-
			21	≥ 1:4096	-	1:512	1:160	1:512	1:1280	1:1024	1:320
CUH4-117	Neimeng-65	Neimeng-65	21	≥ 1:4096	1:640	1:2048	1:160	1:2048	1:320	≥ 1:4096	1:640
			29	1:4096	1:1280	1:1024	1:640	1:2048	1:1280	1:4096	1:1280
CUH4-57	Kawasaki	Kanda	10	-	-	1:4096	1:1280	-	-	-	1:80
			17	-	-	1:4096	≥ 1:1280	-	-	-	1:320
CUH4-31	Kawasaki	Taguchi	6	1:64	-	1:256	1:320	-	-	1:128	1:40
CUH4-142	Kawasaki	Taguchi	7	1:128	-	1:128	-	-	1:80	-	-
			13	1:1024	1:320	≥ 1:4096	≥ 1:1280	1:256	-	1:1024	1:320
CUH4-324	Kawasaki	Taguchi	16	1:256	1:80	1:512	1:1280	1:64	-	1:64	-
			20	1:1024	1:160	1:1024	1:1280	1:64	1:160	1:1024	-

<sup>a</sup> Cluster denotes clustering system proposed by Tamura et al. 2001 (16)

<sup>b</sup> Time means the days from symptoms onset to sample collection

Table 5. Homology of nucleotide 56kDa gene among *O. tsutsugamushi* strains

	CUH4-134	CUH4-485	CUH4-271	CUH4-3	CUH4-6	CUH4-117	CUH4-57	CUH4-31	CUH4-142	CUH4-324
Hirahata	90.5	90.9	99.1	71.4	71.6	75.2	72	72.3	72.3	72.3
Mori	89.5	90	98	70.7	70.9	74.3	71.8	72	72	72
Kamimoto	89.5	90	98	70.7	70.9	74.3	71.8	72	72	72
Okazaki	89.5	90	98	70.7	70.9	74.3	71.8	72	72	72
Jecheon	90.2	90.7	<b>99.8</b>	70.7	70.9	75	71.8	72	72	72
Karp	90.5	90.9	98.6	70.7	70.9	75	72.5	72.7	72.7	72.7
Matsuzawa	88.9	89.3	96.4	70.5	70.7	73.2	71.4	71.6	71.6	71.6
Yeojoo	90.5	90.9	98.2	71.1	71.4	74.5	71.8	72	72	72
Yongwor I	90.2	90.7	93.4	72	72.3	74.8	72.7	73	73	73
Pajoo	91.1	91.6	94.3	71.4	71.6	75.7	73.4	73.6	73.6	73.6
LA-1	90	90.5	93.2	71.4	71.6	75.7	73.4	73.6	73.6	73.6
Nishino	97.5	97.9	89.7	72.8	73	73.7	71.9	72.1	72.1	72.1
Boryong	<b>98.9</b>	<b>99.3</b>	90.8	72.3	72.5	74.4	72.5	72.8	72.8	72.8
Kuroki	<b>98.9</b>	<b>99.3</b>	90.8	72.3	72.5	74.4	72.5	72.8	72.8	72.8
Akita-7	73.6	74.1	72.4	99.1	99.3	71.3	70.6	70.3	70.3	70.3
Omagari	73.8	74.3	72.7	<b>99.3</b>	<b>99.5</b>	71.5	70.8	70.6	70.6	70.6
Kato	73.8	74.3	72.7	<b>99.3</b>	<b>99.5</b>	71.5	70.8	70.6	70.6	70.6
LF-1	75	75.5	74.1	94.2	94.4	75.2	72.7	72.4	72.4	72.4
Kanda	76.5	77	76.3	73.1	73.4	91.5	<b>99.5</b>	99.3	99.3	99.3
Kawasaki	76.5	77	76.3	73.1	73.4	91.5	<b>99.5</b>	99.3	99.3	99.3
Oishi	76.8	77.2	76.5	72.9	73.1	91.8	99.3	<b>99.5</b>	<b>99.5</b>	<b>99.5</b>
Taguchi	76.8	77.2	76.5	72.9	73.1	91.8	99.3	<b>99.5</b>	<b>99.5</b>	<b>99.5</b>
Neimeng-65	78.7	79.2	79.9	74.1	74.3	<b>99.3</b>	91.8	92	92	92
Gilliam	78.9	79.4	79.9	74.3	74.6	98.8	91.3	91.5	91.5	91.5

Ikeda	75.8	76.3	77	73.4	73.6	93.7	90.8	90.6	90.6	90.6
Iwataki-1	75.8	76.3	77	73.4	73.6	93.7	90.8	90.6	90.6	90.6
Yonchon	75.8	76.3	77	73.4	73.6	93.7	90.8	90.6	90.6	90.6
Shimokoshi	77.9	78.4	78.4	74.2	74.2	75.4	75.4	75.7	75.7	75.7
Fuji	74.6	75.1	72.7	70.1	70.4	69.6	69.9	69.6	69.6	69.6
LX-1	75.4	75.9	74.2	69.8	70.1	66.6	66.6	66.8	66.8	66.8
TA678	73.3	73.7	72.4	73.7	74	66.8	65.7	65.9	65.9	65.9
TA763	78.9	79.4	77.5	72	72.3	71.8	70.9	70.6	70.6	70.6
TA686	78	78.4	74.5	67.5	67.7	68.4	68	67.7	67.7	67.7
TA716	76.8	77.3	74.9	74.7	74.9	69.2	67.5	67.8	67.8	67.8

---

Table 6. Homology of the deduced amino acid of 56kDa gene among *O. tsutsugamushi* strains

	CUH4-134	CUH4-485	CUH4-271	CUH4-3	CUH4-6	CUH4-117	CUH4-57	CUH4-31	CUH4-142	CUH4-324
Hirahata	85.6	86.3	97.9	58.2	58.2	54.1	60.3	60.3	60.3	60.3
Mori	77.4	78.1	87.7	54.1	54.1	52.1	59.6	59.6	59.6	59.6
Kamimoto	77.4	78.1	87.7	54.1	54.1	52.1	59.6	59.6	59.6	59.6
Okazaki	77.4	78.1	87.7	54.1	54.1	52.1	59.6	59.6	59.6	59.6
Jecheon	85.6	86.3	<b>100</b>	56.8	56.8	54.1	58.9	58.9	58.9	58.9
Karp	79.5	80.1	87.7	54.1	54.1	52.1	58.9	58.9	58.9	58.9
Matsuzawa	78.8	79.5	86.3	55.5	55.5	50.7	58.2	58.2	58.2	58.2
Yeojoo	86.3	87	95.9	58.9	58.9	52.7	58.9	58.9	58.9	58.9
Yongwor I	81.5	82.2	86.3	58.2	58.2	52.7	61	61	61	61
Pajoo	75.3	76	78.8	48.6	48.6	49.3	52.7	52.7	52.7	52.7
LA-1	86.3	87	90.4	58.2	58.2	54.8	61.6	61.6	61.6	61.6
Nishino	95.2	95.9	84.1	61.4	61.4	53.1	59.3	59.3	59.3	59.3
Boryong	<b>98.6</b>	<b>99.3</b>	86.2	60.7	60.7	53.1	60	60	60	60
Kuroki	<b>98.6</b>	<b>99.3</b>	86.2	60.7	60.7	53.1	60	60	60	60
Akita-7	61.3	62	57.7	99.3	99.3	56.3	64.1	64.1	64.1	64.1
Omagari	62	62.7	58.5	<b>100</b>	<b>100</b>	57	64.1	64.1	64.1	64.1
Kato	62	62.7	58.5	<b>100</b>	<b>100</b>	57	64.1	64.1	64.1	64.1
LF-1	64.8	65.5	62	89.4	89.4	61.3	69	69	69	69
Kanda	63.5	64.2	62.8	66.4	66.4	76.6	<b>100</b>	99.3	99.3	99.3
Kawasaki	63.5	64.2	62.8	66.4	66.4	76.6	<b>100</b>	99.3	99.3	99.3
Oishi	63.5	64.2	62.8	66.4	66.4	77.4	99.3	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Taguchi	63.5	64.2	62.8	66.4	66.4	77.4	99.3	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
Neimeng-65	65.7	66.4	67.9	66.4	66.4	<b>86.9</b>	86.9	87.6	87.6	87.6
Gilliam	65.7	66.4	67.2	66.4	66.4	86.1	86.1	86.9	86.9	86.9

Ikeda	62	62.8	63.5	66.4	66.4	78.8	87.6	86.9	86.9	86.9
Iwataki-1	62	62.8	63.5	66.4	66.4	78.8	87.6	86.9	86.9	86.9
Yonchon	62	62.8	63.5	66.4	66.4	78.8	87.6	86.9	86.9	86.9
Shimokoshi	70.4	70.4	67.4	65.2	65.2	59.3	66.7	67.4	67.4	67.4
Fuji	66	66.7	61	58.2	58.2	49.6	61.7	61	61	61
LX-1	67.8	68.5	66.4	59.4	59.4	47.6	55.9	56.6	56.6	56.6
TA678	63.2	63.9	61.1	57.6	57.6	50	55.6	56.2	56.2	56.2
TA763	70.7	71.4	66.4	62.1	62.1	55.7	63.6	62.9	62.9	62.9
TA686	69.2	69.2	63.7	56.8	56.8	47.9	58.2	57.5	57.5	57.5
TA716	66.9	67.6	62.6	64.7	64.7	50.4	59	59.7	59.7	59.7

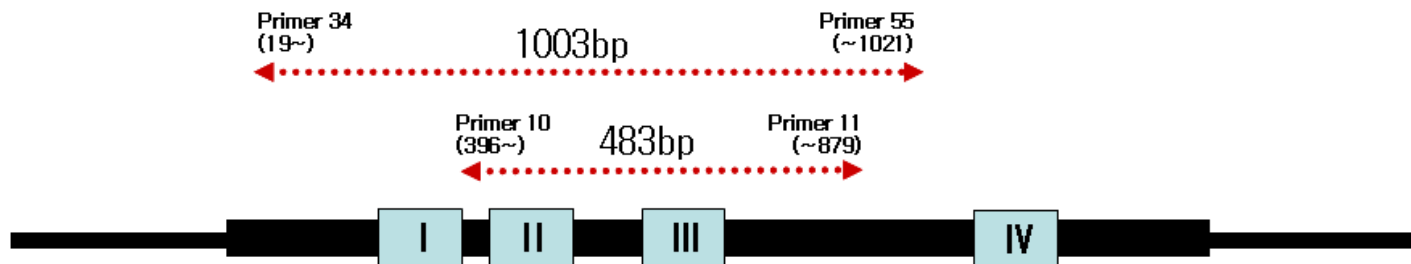
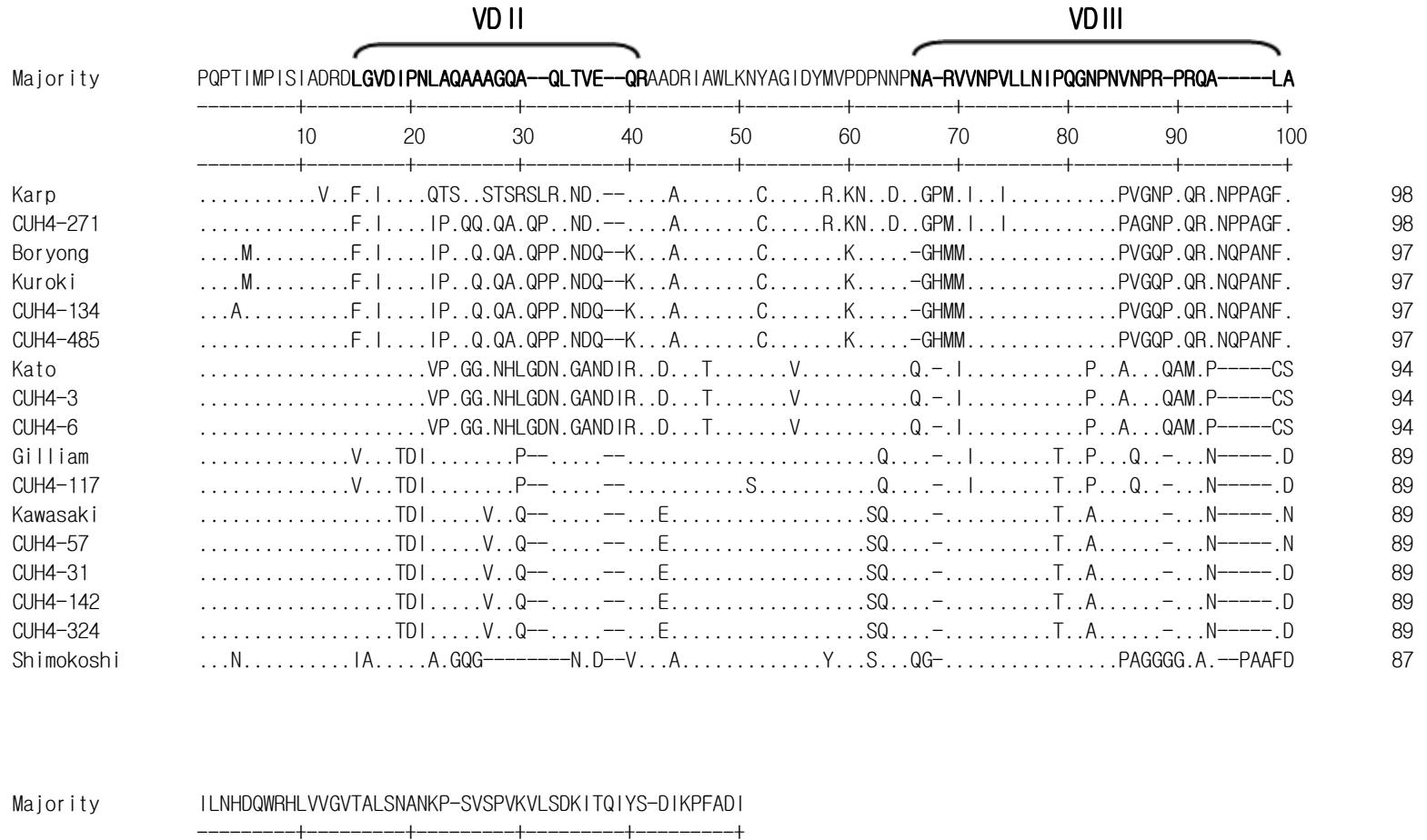


Figure 1. Position of primer used for 56-kDa gene amplification. Open reading frame of the gene is represented by the heavy line, and boxes I, II, III and IV show the position of variable domains.

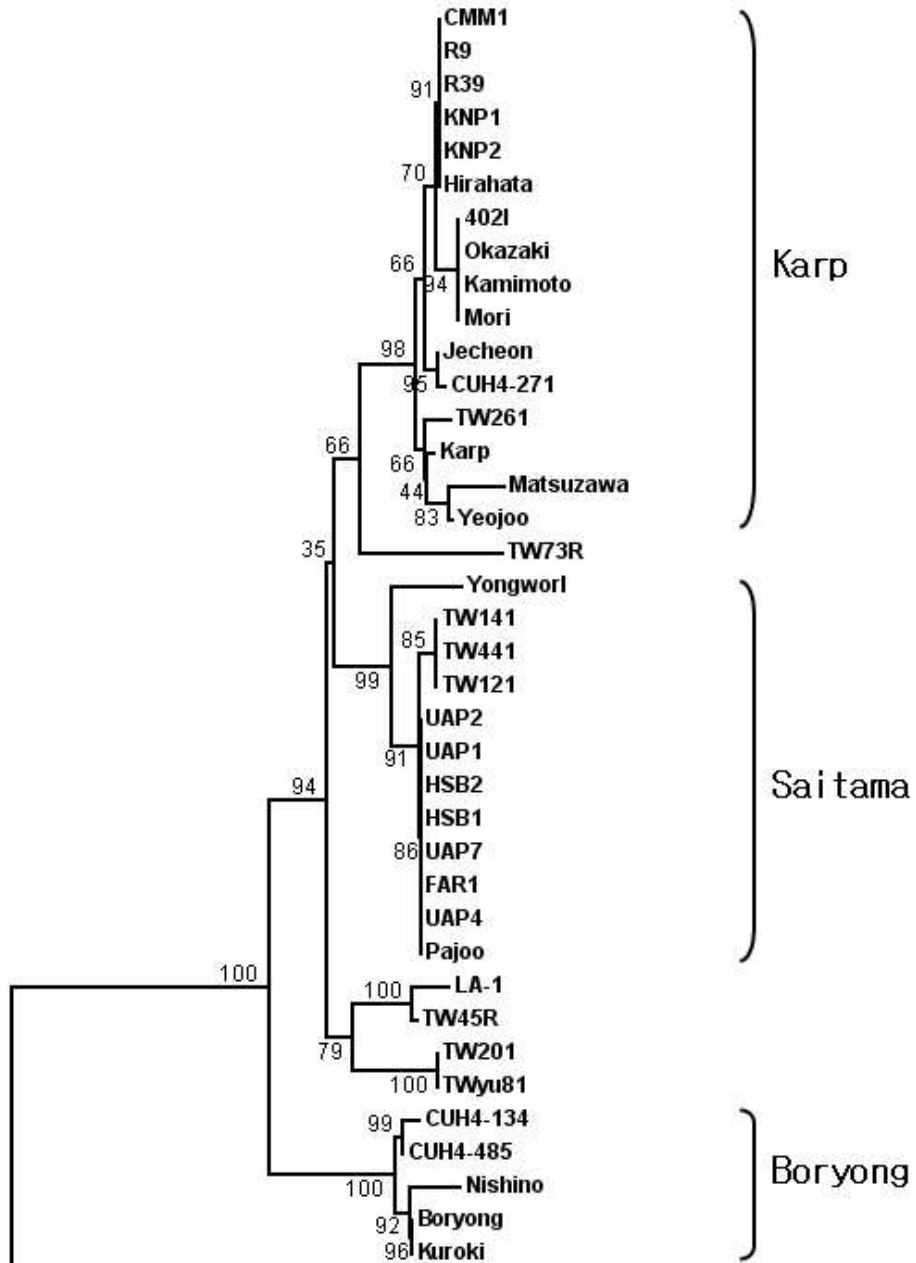


Figure 2. Alignment of deduced amino acid sequence of 56kDa protein genes



	110	120	130	140	150	
	----- ----- ----- ----- -----					
Karp	.H.	.E.	.....LA.	.....-A.	.....-HL	146
CUH4-271	.H.	.E.	.....LA.	.....H-AP	.....-	146
Boryong	.H.	.E.	...S...LA.	.....-A.	.....I...-	145
Kuroki	.H.	.E.	...S...LA.	.....-A.	.....I...-	145
CUH4-134	.H.	.E.	...S...LA.	.....-A.	.....I...-	145
CUH4-485	.H.	.E.	...S...LA.	.....-A.	.....I...-	145
Kato	....H.	....I.	..M.	.....-I.	...E..V..R-V...RV	142
CUH4-3	....H.	....I.	..M.	.....-I.	...E..V..R-V...RV	142
CUH4-6	....H.	....I.	..M.	.....-I.	...E..V..R-V...RV	142
Gilliam	..D.G.	.....H.	...-T.	.....K.	...-	137
CUH4-117	..D.G.	.....H.	...T.RY.CQRY.GEQNY.G.	IG.	.....	139
Kawasaki	..D.	...Y.	.....-S.	.....-RQ.	..K.	137
CUH4-57	..D.	...Y.	.....-S.	.....-RQ.	..K.	137
CUH4-31	..D.	...Y.	.....-S.	.....-RQ.	..K.	137
CUH4-142	..D.	...Y.	.....-S.	.....-RQ.	..K.	137
CUH4-324	..D.	...Y.	.....-S.	.....-RQ.	..K.	137
Shimokoshi	..D.A.	...DV.	...I.	.....-N.A.	...I...S...A-...NV	135

Figure 3. Phylogenetic tree based on nucleotide sequence of *O. tsutsugamushi* genes



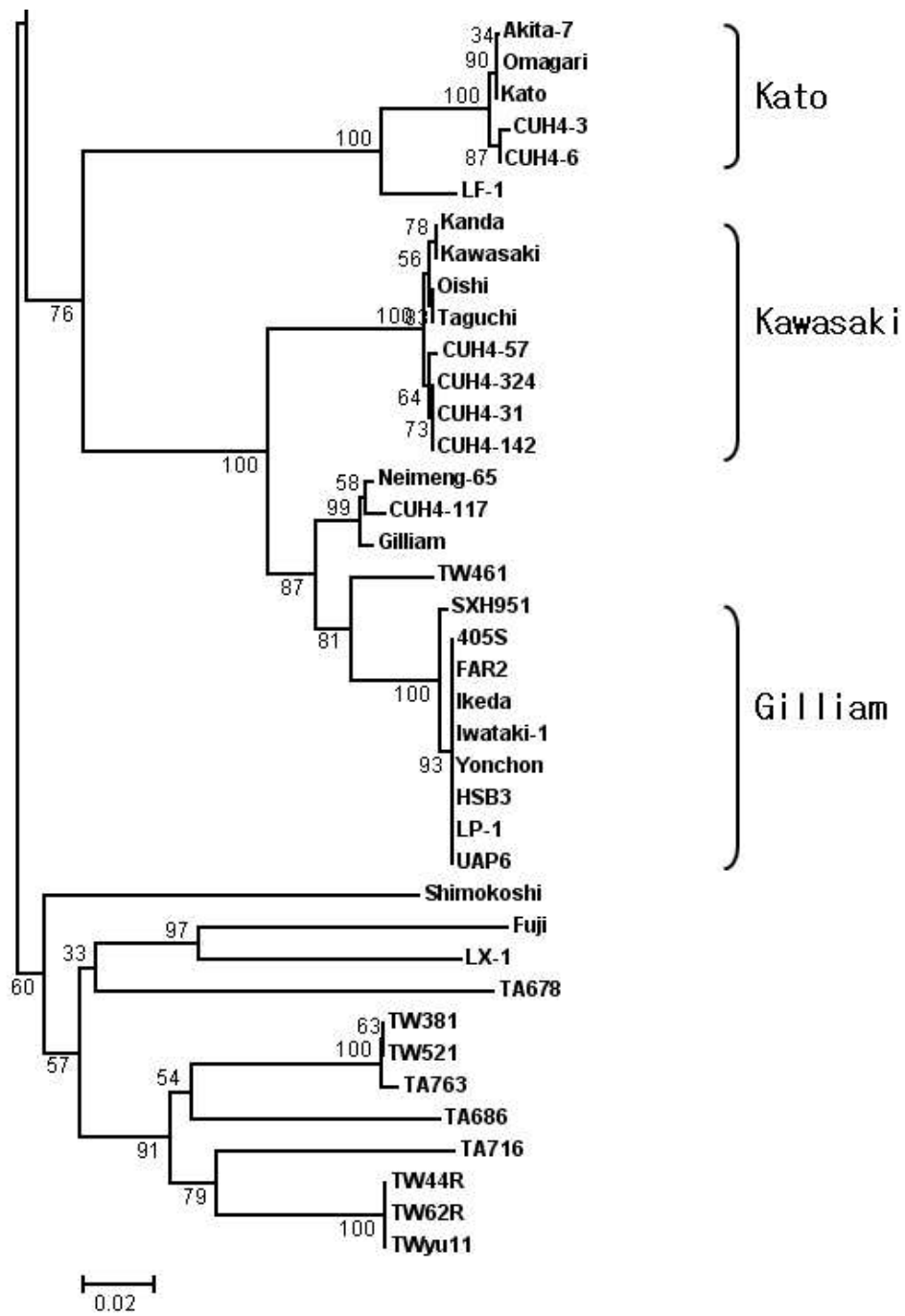
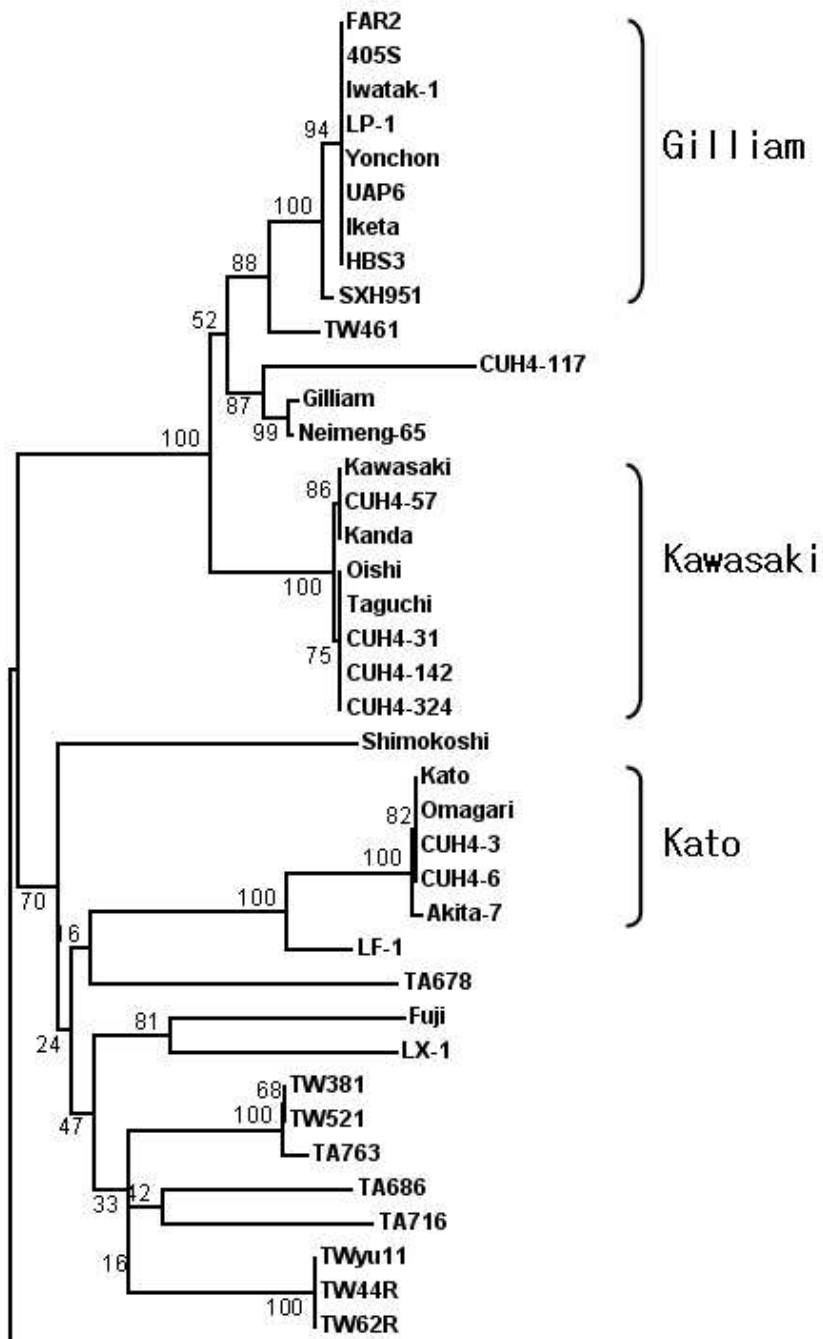
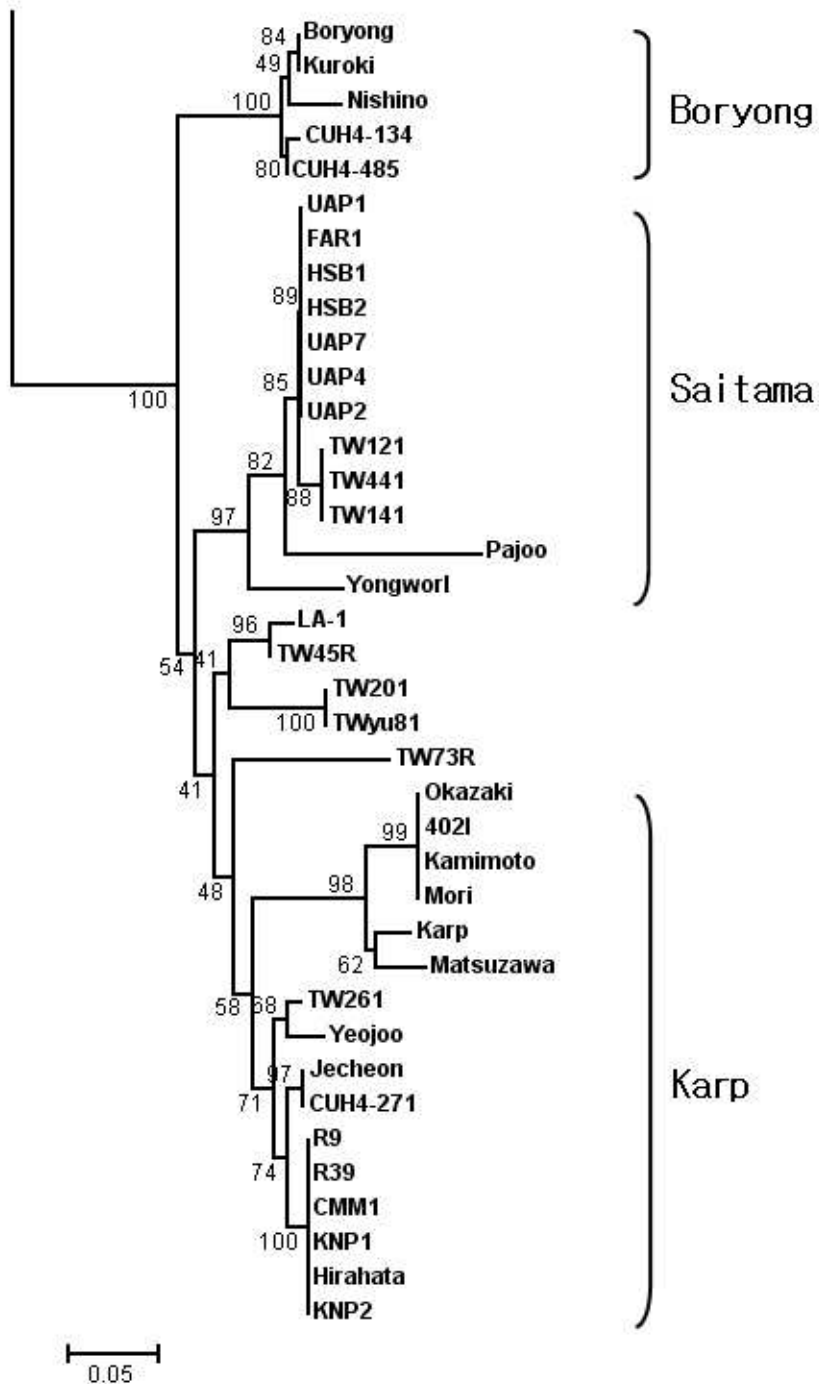


Figure 4. Phylogenetic tree based on deduced amino acid sequence of *O. tsutsugamushi* genes





## 저작물 이용 허락서

학 과	바이오 신약 개발학과	학 번	20077228	과 정	석사
성 명	한글: 이 유 미    한문: 李 裕 美    영문: Yu-Mi Lee				
주 소	광주광역시 남구 진월동 아남아파트 104동 806호				
연락처	E-MAIL : moksha1001@hanmail.net				
논문제 목	한글 : 우리나라 남서부 지역에서 확인된 <i>Orientia tsutsugamushi</i> 의 56kDa 단백질유전자의 계통분석 영어 : Phylogenetic analysis of the 56kDa Protein genes of <i>Orientia tsutsugamushi</i> in Southwestern Korea				
<p>본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다                                음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함</li> <li>2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.</li> <li>3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.</li> <li>4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.</li> <li>5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.</li> <li>6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음</li> <li>7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.</li> </ol> <p style="text-align: center;">동의여부 : 동의( <input checked="" type="radio"/> )    반대( <input type="radio"/> )</p> <p style="text-align: center;">2008 년 12 월</p> <p style="text-align: center;">저작자:                이 유 미                                (서명 또는 인)</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;"><b>조선대학교 총장 귀하</b></p>					