

단세포균항체를 이용한 *Orientia tsutsugamushi*의 단백질 분해효소에 저항하는 항원의 동정

인하대학교 의과대학 미생물학교실, 의학연구소

김미경 · 김미정 · 이선명 · 강재승*

Identification of the Proteinase K-resistant Antigen of *Orientia tsutsugamushi* by Monoclonal Antibodies

Mee-Kyung Kim, Mi-Jeong Kim, Sun-Myoung Lee and Jae-Seung Kang*

Department of Microbiology, Center for Advanced Medical Education by BK21 Project, and Research Institute for
Medical Sciences, Inha University College of Medicine, Incheon 400-1031, Republic of Korea

Received : January 3, 2008

Accepted : January 30, 2008

Orientia tsutsugamushi, the causative agent of scrub typhus, is an obligate intracellular bacterium that replicates in the cytosol of host cells. Although several protein antigens have been characterized and cloned, little information exists regarding the polysaccharide antigen of this bacterium. In this study, we characterized two monoclonal antibodies, NT19 and WT14, against the proteinase K-resistant antigen of *O. tsutsugamushi*. Western blot analysis showed that MAb NT19 and WT14 strongly recognized two antigenic bands with molecular masses of 20 kDa and 24 kDa, which were resistant to proteinase K digestion. We suggest that the proteinase-resistant antigen might be polysaccharide. One patient serum reacted with a 24 kDa band that was similar to a band observed by WT14, suggesting the possibility of the role of this proteinase-resistant antigen as an antigenic molecule in human infection.

Key Words: *Orientia tsutsugamushi*, Proteinase K-resistant antigen, Monoclonal Antibody

서 론

*O. tsutsugamushi*에 의해 발생하는 쯔쯔가무시증은 우리나라에서 많이 유행하는 매우 중요한 질환이다 (1,16). 이 병은 우리나라 전국에서 발생하여, 최근 5년 동안 매년 1,000명이 넘는 환자가 발생하였으며, 특히 2004년에는 4,627명의 환자가 발생하여 전년도에 비해 326%의 놀라운 증가를 기록하고 있다. 이렇게 매년 환자가 증가하는 추세이나 아직 효과적인 예방법이 없으며 예방 백신이 개발되지 않은 상태이다 (6). 그러므로 이 세균의

보호 항원에 대한 연구가 시급한 실정이다.

*O. tsutsugamushi*의 항원 연구는 주로 단백질 항원에 집중되어 왔다. 이 세균의 세포벽에는 다른 세균과 마찬가지로 많은 단백질 항원이 존재한다. 균체를 용해한 후 전기영동하면 약 30개의 단백질 띠가 관찰되며, 이 중 110, 80, 56, 46, 42, 35 및 28 kDa 단백질이 세포벽 표면에 노출되어 있다고 알려져 있다 (9,21). 이들 중 56 kDa 단백질은 양이 가장 많고, 혈청형을 결정할 뿐 만 아니라 면역학적으로 우세한 항원이므로 일찍부터 많은 연구의 대상이 되어 왔다 (6). 세균의 이 단백질은 세포 내 침투에 관여하며 (16), 백신 항원으로의 가능성이 검토되고 있는 단계이다 (5,17). 그러나 단백질 이외의 항원에 대해서는 거의 알려진 바가 없다.

단백질 이외의 항원 중 가장 중요한 것은 다당류 항원

*교신저자: 강재승. 400-712, 인천광역시 중구 신흥동 3가 7-241, 정석빌딩 3층, 인하대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: +82-32-890-0952, Fax: +82-32-881-8559,
e-mail: jaeskang@inha.ac.kr

**이 논문은 2005년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2005-202-E00048).

이다. 모든 세균에서 다당류 항원은 세균의 발병 기전, 진단, 백신 개발에 있어서 중요한 연구 대상이다. 세균의 협막 또는 slime layer는 다당류로 형성되어 세균의 세포 부착, 항탐식작용 등의 역할을 수행하며, 많은 세균에서는 다당류가 균체에서 외부로 분비되어 biofilm을 형성하기도 한다 (22). 그러므로 한 세균의 인체 내 감염 과정을 연구하는 데 다당류 항원에 대한 연구가 매우 중요하다. 그러나 현재까지 *O. tsutsugamushi*의 다당류 항원에 대한 연구는 거의 없으며, 전자현미경 관찰에 의한 연구 결과만이 보고된 상태이다 (23). Rikihisa 등 (14,15)은 수정된 계란에서 배양된 *O. tsutsugamushi*에서는 당질 항원으로 이루어진 구조가 전자현미경 관찰에 의해 발견되나 인공 배양된 *O. tsutsugamushi*에서는 동일한 구조가 없음을 보고하였다. 또한 수정된 계란에서 배양된 *O. tsutsugamushi*를 인공 배양을 하면 다당류 항원이 없어짐을 보고하였다. 이는 *O. tsutsugamushi*의 다당류 항원은 *in vivo* 배양에서만 발현될 가능성을 시사하며, 인체 감염에서도 다당류 항원이 발현되는가는 매우 흥미로운 주제가 될 것이다.

본 연구자들은 그 동안의 연구에서 *O. tsutsugamushi*의 항원 및 세포에 미치는 영향 등을 연구하였다. 이를 위한 방법으로 *O. tsutsugamushi*의 항원에 반응하는 단세포 균향체를 개발하여, 이들이 반응하는 항원을 분석하였다. 이 과정 중 항원의 성격이 단백질 항원과는 다른 특이한 항원에 반응하는 단세포균향체를 찾아냈고 이를 분석하였다. 본 논문에서는 *O. tsutsugamushi*의 항원들 중 단백질 분해효소에 의해 영향을 받지 않는 항원에 반응하는 두 개의 단세포균향체의 생산과 그 특성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

O. tsutsugamushi 균주를 배양하기 위한 숙주세포로는 사람의 umbilical vein에서 유래된 혈관내피세포주인 ECV-304 세포주를 사용하였다. 세포 배양을 위하여 10% 우태아혈청 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 M199 (Gibco BRL) 배지를 사용하였으며, 5% CO₂를 포함한 37°C 배양기에서 배양하였다.

2. *O. tsutsugamushi* 균주

O. tsutsugamushi 균주는 환자의 뇌척수액으로부터 분리된 한국에서 가장 많이 유행하는 보령 혈청형 균주를 사용하였다 (4). 이 균주를 혈관내피세포인 ECV304 세포에 감염시킨 후 배양하여 지속 감염 상태로 유지하였다 (13). 지속 감염된 ECV304 세포는 5% CO₂, 37°C 조건하에서 배양하였으며, 5일 간격으로 10% 우태아혈청이 포함된 M199 배양액으로 교환하면서 관찰하였다. 균주가 자란 세포는 1,500 rpm으로 5분간 원심 분리하여 회수한 후 냉동 보관하여 사용하였다.

3. 단세포균향체

본 실험에서는 4개의 단세포균향체 (NT19, WT14, FS10, FS15)를 사용하였다. 이들의 생산 방법은 전 논문에서 발표하였다 (11,18). 간단하게 기술하면, 마우스 복강에 살아있는 *O. tsutsugamushi* 균주를 감염시킨 후 마우스를 희생시켜 비장을 적출하여 세포융합에 사용하였다. 마우스 골수종 세포와 비장세포를 일반적인 방법에 따라 융합 후 이로부터 *O. tsutsugamushi* 균주에 반응하는 세포를 선택하였다. 최종적으로 생산된 단세포균향체는 protein A bead로 정제하여 사용하거나, 마우스 복수의 형태로 사용하였다.

4. Proteinase K 처리와 Western blot 분석

시료에 1% SDS를 1× PBS에 녹여 만든 lysis buffer를 가하여 얼음에서 1시간 반응시킨 후 단백질을 정량하여 100 µg/ml의 Proteinase K (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)를 56°C에서 1시간 처리 후 1× SDS sample buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol)를 넣어 100°C에서 5분간 가열하였다. 대조군 시료로서 감염이 되지 않은 ECV304 세포주도 1% SDS lysis buffer로 처리하여 동일하게 준비하였다. 준비된 시료를 11% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)에 전기영동하고, PVDF membrane에 전이시킨 후 TBST buffer [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20]에 5% nonfat dry milk를 녹여 blocking을 하였다. 단세포균향체를 제 1차 항체로 사용하였으며, 2차 항체로는 horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG 항체를 사용하여 각각 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반

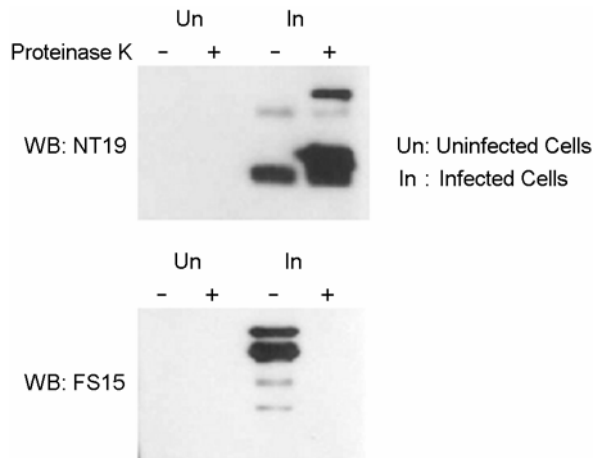


Figure 1. Western blot analysis of antigen recognized by MAb NT19. ECV304 cells infected with *O. tsutsugamushi* (In) or control cells (Un) were treated with lysis buffer containing 1% SDS, and proteins were separated by PAGE. Equal amount of samples was treated with proteinase K.

응이 끝난 후 ECL solution A, B를 1:1로 반응시킨 후 X-ray 필름에 노출시켜 표적 단백질을 관찰하였다.

5. 면역침강법

시료에 RIPA lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 1% Triton X 100, 0.25% Na-deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 50 mM iodoacetamide)를 가하여 얼음에서 1시간 동안 반응시킨 후 단백질을 정량하고, NT19, WT14 단세포균항체와 protein A bead를 각각 넣어 침강시켰다. 침강된 protein A bead를 세척한 후 1× SDS sample buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol)를 넣고 100℃에서 5분간 가열하여 시료를 준비하였다.

결 과

1. 단세포균항체의 항원 동정

본 실험실에서 생산한 단세포균항체에 반응하는 항원을 동정하기 위하여 western blot 분석을 시행하였다. 항원으로는 *O. tsutsugamushi*에 감염된 세포를 SDS를 포함하는 완충액에 용해한 후 분리하여 사용하였다. 분석한 다른 단세포균항체는 대부분 단백질 항원에 반응하였으나 두 개의 단세포균항체 (NT19와 WT14)는 그 반응성이 다른 항체와 다른 양상을 보여 이를 분석하였다. NT19 단세포균항체는 감염되지 않은 세포에는 전혀 반응하지

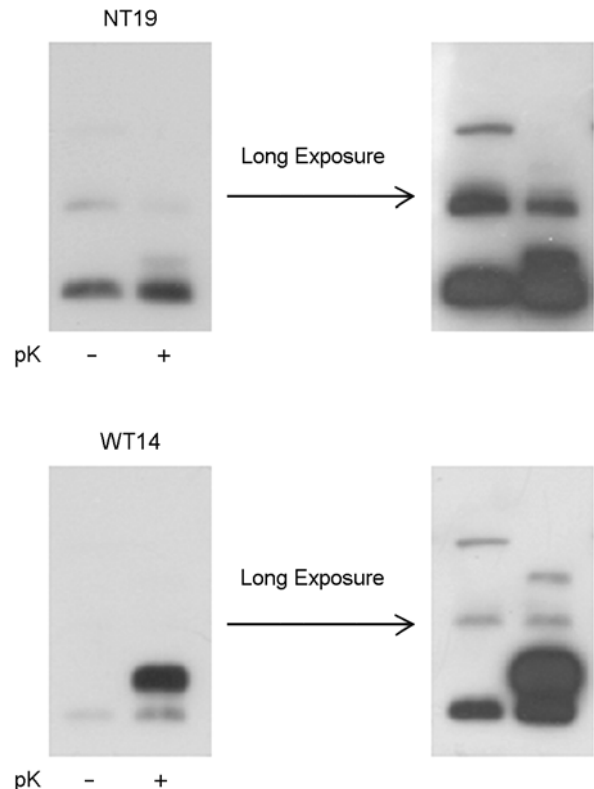


Figure 2. Distinct reactivity of two MAbs against proteinase K-treated or control sample in western blotting. Samples were separated by PAGE and blotted with NT19 and WT14. For better visualization of minor bands, additional films were taken after longer exposure time.

않았으나, 감염된 세포의 western blot 분석에서는 20 kDa 크기의 항원띠를 나타내고 있다. 흥미롭게도 이 항원띠는 항원을 proteinase K로 처리하여도 없어지지 않고 오히려 그 세기가 증가하며 30 및 24 kDa 크기의 새로운 항원띠가 나타나는 현상을 보였다. 대조실험으로 사용한 *O. tsutsugamushi*의 56 kDa 단백질에 반응하는 단세포균항체 (FS15)는 항원을 효소 처리하면 그 해당 항원띠가 사라짐을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 본 단세포균항체의 항원이 단백질이 아니며 다당류 항원일 가능성을 보이고 있다 (Fig. 1).

2. 단백질 분해효소에 저항하는 항원에 반응하는 두 개의 단세포균항체

NT19 단세포균항체와 함께 WT14 단세포균항체가 proteinase K에 의해 분해되지 않는 24 kDa 크기의 항원띠에 반응함을 발견하였다. NT19는 20과 24 kDa의 항원띠 중 주로 아래 띠인 20 kDa 항원띠에 강하게 반응하였고,

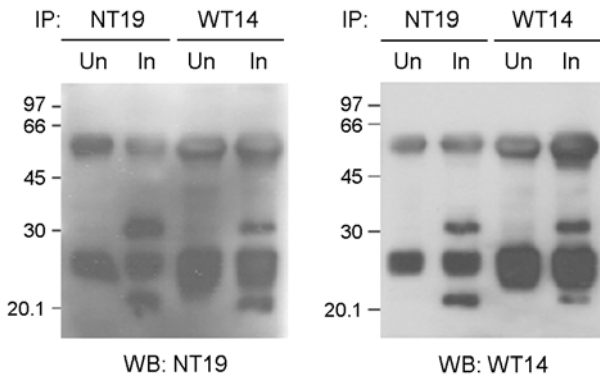


Figure 3. MAbs NT19 and WT14 recognize the same antigen. Lysates of infected cell (In) or control cells (Un) were immunoprecipitated with NT19 or WT14 and then antigen bands were visualized with western blotting with NT19 or WT14.

WT14는 20 kDa 항원띠에도 약하게 반응하지만 주로 24 kDa 항원띠에 강하게 반응함을 보이고 있었다. 이는 오랜 시간 노출을 준 필름을 비교하여 보면 분명히 알 수 있었다. 이외에도 약하게 반응하는 45, 40 및 30 kDa 항원띠도 관찰되었다 (Fig. 2).

두 단세포균항체가 반응하는 항원간의 관계를 알기 위하여, 각각의 단세포균항체를 이용하여 면역침강법으로 항원을 분리한 후 NT19와 WT14 단세포균항체로 각각 western blot 분석을 시행하였다. WT14 항체는 NT19에 의해 침강되는 30 kDa과 20 kDa 항원을 인식하고 있었으며, NT19도 WT14 항체에 의해 침강된 30 kDa과 20 kDa 항원을 인식하고 있었다 (Fig. 3). 이 결과는 두 단세포균항체는 서로 같은 항원을 인식함을 나타내고 있다.

Proteinase K에 의한 영향을 알아보기 위하여 이번에는 면역침강된 항원을 proteinase K로 처리하고 NT19 항체로 western blot 분석을 시행하였다. 이 실험에서는 결과를 분명히 보기 위하여 proteinase K 처리된 시료를 5배 더 많이 SDS PAGE gel에 가하여 분리하였다. NT19 항체는 NT19 항체에 의해 침강된 두 개의 항원을 검출하였다. 이 시료는 proteinase K 처리에 의해 20과 24 kDa 크기로 변하였으며 NT19 항체는 두 개의 항원띠를 다 인식하였다 (Fig. 4). 이에 반하여 WT14 항체는 주로 24 kDa 크기의 항원만을 침강시켰다. 그러므로 NT19 항체는 같은 항원의 20 kDa과 24 kDa 형태에 같은 정도로 반응하고, WT14 항체는 24 kDa 형태에 강하게 반응함을 보이고 있었다. 이상의 결과로 두 단세포균항체에 반응하는 항원은 정상 상태에서는 주로 20 kDa 크기로 존재하며 소량의 24 kDa 크기의 형태를 포함하고 있으며, 이

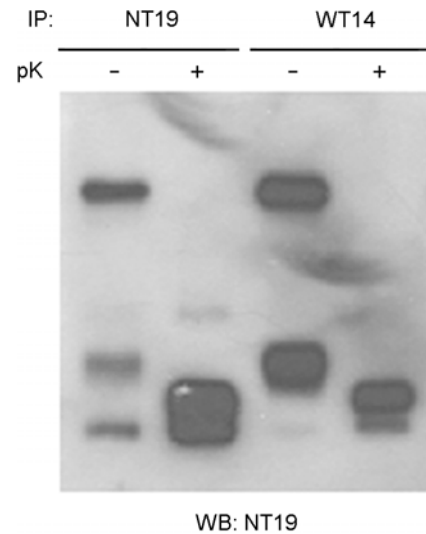


Figure 4. The effect of proteinase K treatment on the reactivity of MAb NT19. Lysates were immunoprecipitated with NT19 or WT14 before proteinase K treatment. Immunoprecipitated proteins were analyzed with western blotting with NT19.

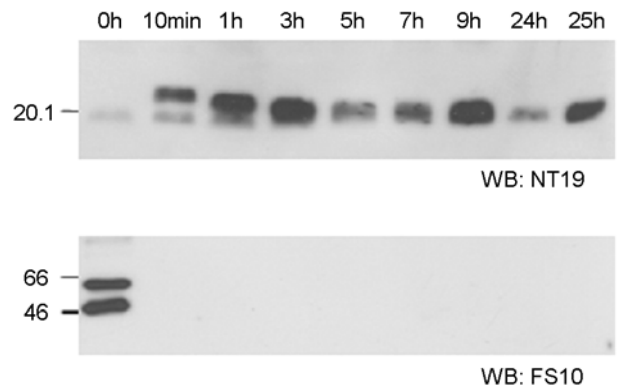


Figure 5. The change of size of antigenic bands recognized by MAb NT19 after proteinase K treatment. Lysates of ECV304 cells infected with *O. tsutsugamushi* were treated with proteinase K for the indicated times and then analyzed with western blotting with NT19 (upper) or FS10 (lower).

를 단백질 분해효소로 처리하면 24 kDa 크기의 항원이 증가되는 것으로 판단되었다 (Fig. 4).

3. 단백질 분해효소에 저항하는 크기가 다른 항원의 형태

단백질 분해효소에 저항하는 항원이 두 개의 크기를 가지고 있고 단백질 분해효소에 의해 그 크기가 변화되는 것을 확인하기 위하여, 시료를 시간대별로 proteinase K 처리를 한 후 항원의 변화를 NT19 항체를 이용한 western blot 분석으로 추적하였다. Proteinase K 처리한 후 10분에 24 kDa 항원띠가 생김을 알 수 있었고, 그 후 두

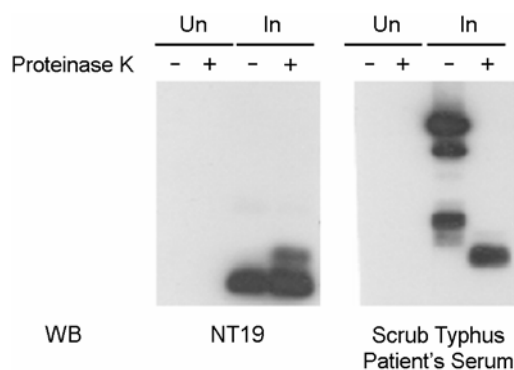


Figure 6. Scrub typhus patient's serum recognized the proteinase K-resistant antigen, which was similar to that observed by MAb NT19. Lysates of infected cell (In) or control cells (Un) were treated with proteinase K and the antigen bands were visualized with western blotting with patient's serum or NT19.

개의 항원띠는 서로 합쳐지는 소견을 보이고 있다 (Fig. 5). 그러므로 20 kDa와 24 kDa 항원띠는 같은 항원으로 크기가 다른 형태임을 확인할 수 있었다. 대조실험으로 같은 시료를 단백질 항원에 반응하는 항체 (FS10)을 사용하여 western blot 분석으로 추적하였을 때에는 아무 항원띠도 나타나지 않아 단백질 항원은 분해되었음을 확인할 수 있었다.

4. 단백질 분해효소에 저항하는 항원의 항원성

NT19와 WT14 단세포균항체로 검출되는 항원이 *O. tsutsugamushi*의 인체 감염 시 항원으로 작용할 가능성을 알아보기 위하여, 환자의 혈청과 대조 항체 NT19를 사용하여 western blot 분석을 시행하였다. 사용한 환자 혈청은 proteinase K로 처리한 시료에서 두 개의 항원 중 24 kDa 항원과 크기가 비슷한 항원에 강하게 반응하였다 (Fig. 6). 그러나 이 혈청에서는 proteinase K를 처리하지 않은 시료에서 같은 항원을 검출하지 못하였다. 이러한 결과로서 인체에서는 WT14 단세포균항체에 의해 인식되어지는 것과 같은 24 kDa 형태의 항원에만 반응하는 항체가 생겼을 가능성을 시사한다.

고 찰

본 연구에서는 *O. tsutsugamushi*가 생산하는 단백질 분해효소에 저항하는 항원을 두 개의 단세포균항체를 이용하여 동정하였다. 이 항원은 western blot 분석에서 주로 20 kDa 및 24 kDa 크기로 나타났으며, 이 항원띠는 시

료를 단백질 분해효소로 처리하여도 영향이 없었다. 비록 이 항원의 화학적 조성을 분석하지는 못하였지만, 이러한 결과는 이 항원이 다당류 항원임을 시사하고 있다.

다당류는 세균의 헤파막 또는 slime layer를 형성하여 세균의 세포 부착, 항탐식작용 등의 역할을 수행하며 biofilm을 형성하기도 한다. 그러므로 세균의 인체 내 감염 과정을 연구하는 데 다당류 항원에 대한 연구는 매우 중요하다. 현재까지 *O. tsutsugamushi*의 다당류 항원에 대한 연구는 거의 없으며, 일부 연구에서 그 가능성만이 제시된 상태이다 (2,10).

본 연구의 결과에서 확인한 항원은 western blot 분석에서 20 kDa와 24 kDa 크기의 항원띠로 나타났으며, proteinase K 처리에 의해 항원띠의 크기가 변하는 양상을 보였다. 이는 이 항원이 단백질과 결합되어 있거나 작은 펩티드를 함유하리라는 것을 시사하고 있다. 또한 크기가 큰 항원띠가 있는 것으로 보아 작은 단위의 중합체 형성도 시사하고 있다. 본 연구자들은 본 실험의 결과와 기존의 연구 결과를 참조하여, 동정된 단백질 분해효소에 저항하는 항원들은 균체 외부에서 느슨하게 부착된 slime layer와 유사한 중합체를 이루리라 추정한다. *O. tsutsugamushi*가 slime layer를 가지는지에 대한 가능성은 소수의 연구자에 의해 제시되었으나 아직 명확하지 않다 (19,20). 이는 일반적인 전자현미경 관찰에서는 전혀 그 존재가 나타나지 않으나, 항체 처리 또는 ruthenium red 처리 등의 방법을 사용하면 slime layer로 추측되는 구조가 발견된다는 보고가 한 건 있으므로 (14) 차후 확인이 필요하다.

동정된 단백질 분해효소에 저항하는 항원의 역할에 관해서는 현재로는 추정만이 가능한 상태이다. 다만 환자의 혈청 중에서 단세포균항체가 인식하는 항원띠와 유사한 항원띠를 인식한다는 것을 감안하면 이 항원도 인체에서 항원으로 작용할 가능성도 충분하다고 생각한다. 다른 역할로는 염증 유발 물질로 작용할 가능성이 있다. *O. tsutsugamushi*에는 일반 그람 음성 세균처럼 염증 유발 성분인 lipopolysaccharide가 없으므로 (3) 어떤 균체 성분이 염증을 유발하는지는 알려져 있지 않으며, 이 세균의 염증 유발 물질도 아직 모르고 있다. 다만 기존의 연구 결과에서 수종의 chemokine이나 tumor necrosis factor, interleukin-6 등의 염증성 사이토카인을 유도하는 물질이 heat-stable molecule임이 보고되었다 (7,8,12). 그러므로 *O. tsutsugamushi*의 염증 유발 성분은 열에 의해 파괴되지

않는 다당류 또는 지질 성분일 것이며, 향후 연구를 통하여 본 실험에서 동정한 항원이 염증 유발 물질로 작용할 가능성을 조사하고자 한다.

*O. tsutsugamushi*에 의한 질병을 예방 및 진단하기 위해서는 단백질 항원 외에도 다당류 항원이 중요한 역할을 하리라 예상된다. 향후 이 항원을 이용하여 찌꺼가무시증의 진단 및 백신 개발에도 이용할 가능성이 있으리라 기대된다.

참 고 문 헌

- 장우현: 한국의 찌꺼가무시병. 서흥출판사, 1994.
- Amano K, Mizushiri S, Fujii S, Fukushi K, Suto T: Immunological characterization of lipopolysaccharides from *Proteus* strains used in Weil-Felix test and reactivity with patient sera of tsutsugamushi diseases. *Microbiol Immunol* **34**: 135-145, 1990.
- Amano K, Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Kaya S, Fukushi K: Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* **55**: 2290-2292, 1987.
- Chang WH, Kang JS, LeeWK, Choi MS, Lee JH: Serological classification by monoclonal antibodies of *Rickettsia tsutsugamushi* isolated in Korea. *J Clin Microbiol* **28**: 685-688, 1990.
- Chattopadhyay S, Jiang J, Chan TC, Manetz TS, Chao CC, Ching WM, Richards AL: Scrub typhus vaccine candidate Kp r56 induces humoral and cellular immune responses in cynomolgus monkeys. *Infect Immun* **73**: 5039-5047, 2005.
- Chattopadhyay S, Richards AL: Scrub typhus vaccines: past history and recent developments. *Hum Vaccin* **3**: 73-80, 2007.
- Cho NH, Seong SY, Choi MS, Kim IS: Expression of chemokine genes in human dermal microvascular endothelial cell lines infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Infect Immun* **69**: 1265-1272, 2001.
- Cho NH, Seong SY, Huh MS, T. Han TH, Koh YS, Choi MS, Kim IS: Expression of chemokine genes in murine macrophages infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Infect Immun* **68**: 594-602, 2000.
- Hanson B: Identification and partial characterization of *Rickettsia tsutsugamushi* major protein immunogens. *Infect Immun* **50**: 603-609, 1985.
- Kaca W, Amano K, Chernyak AY, Knirel YA: Human anti-scrub typhus rickettsia and rabbit anti-*Proteus* antibodies recognize similar epitope in the O-polysaccharide part of *Proteus mirabilis* OXK lipopolysaccharide. *Microbios* **103**: 151-161, 2000.
- Kang JS, Chang WH: Antigenic relationship among the eight prototype and new serotype strains of *Orientia tsutsugamushi* revealed by monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol* **43**: 229-234, 1999.
- Kim MK, Kang JS: *Orientia tsutsugamushi* suppresses the production of inflammatory cytokines induced by its own heat-stable component in murine macrophages. *Microb Pathog* **31**: 145-150, 2001.
- Kim MK, Kee SH, Cho KA, Chung MH, Lim BU, Chang WH, Kang JS: Apoptosis of endothelial cell line ECV304 persistently infected with *Orientia tsutsugamushi*. *Microbiol Immunol* **43**: 751-757, 1999.
- Rikihisa Y, Ito S: Effect of antibody on entry of *Rickettsia tsutsugamushi* into polymorphonuclear leukocyte cytoplasm. *Infect Immun* **39**: 928-938, 1983.
- Rikihisa Y, Rota T, Lee TH, MacDonald AB, Ito S: Changes in immunoferritin labeling of *Rickettsia tsutsugamushi* after serial cultivation in 60Co-irradiated BHK cells. *Infect Immun* **26**: 638-650, 1979.
- Seong SY, Choi MS, Kim IS: *Orientia tsutsugamushi* infection: overview and immune responses. *Microbes Infect* **3**: 11-21, 2001.
- Seong SY, Huh MS, Jang WJ, Park SG, Kim JG, Woo SG, Choi MS, Kim IS, Chang WH: Induction of homologous immune response to *Rickettsia tsutsugamushi* Boryong with a partial 56-kilodalton recombinant antigen fused with the maltose-binding protein MBP-Bor56. *Infect Immun* **65**: 1541-1545, 1997.
- Seong SY, Kim MK, Lee SM, Odgerel Z, Choi MS, Han TH, Kim IS, Kang JS, Lim BU: Neutralization epitopes on the antigenic domain II of the *Orientia tsutsugamushi* 56-kDa protein revealed by monoclonal antibodies. *Vaccine* **19**: 2-9, 2000.
- Silverman DJ, Wisseman CL Jr, Waddell AD, Jones M: External layers of *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia rickettsii*: occurrence of a slime layer. *Infect Immun* **22**: 233-246, 1978.
- Tamura A: Invasion and intracellular growth of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Microbiol Sci* **5**: 228-232, 1988.
- Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Takahashi K, Oyanagi

- M:** Analysis of polypeptide composition and antigenic components of *Rickettsia tsutsugamushi* by polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting. *Infect Immun* **48**: 671-675, 1985.
- 22) **Watnick P, Kolter R:** Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675-2679, 2000.
- 23) **Urakami H, Tsuruhara T, Tamura A:** Electron microscopic studies on intracellular multiplication of *Rickettsia tsutsugamushi* in L cells. *Microbiol Immunol* **28**: 1191-1201, 1984.
-