

열성질환 환자에서 라임병균 *Borrelia burgdorferi* 감염증 진단을 위한 혈청학적인 분석

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

김 영 미* · 김 종 배

국문초록: 현재 라임병을 진단을 위해 국내에서 이루어지고 있는 연구 방법은 원인균인 *B. burgdorferi* 항원에 대한 항체를 검출하는 혈청학적인 방법이다. 하지만 대부분의 경우 항원으로 사용되는 균주가 다른 나라에서 분양받은 균주이므로 이때 얻어진 결과를 유추해석하는데 어려움이 수반되고 있다. 본 실험에서는 국내 분리균주에 대한 항체를 검출하는 조건을 확립하고, 이를 토대로 하여 불명열 환자의 항체가 항원에 반응하는 양상을 파악함으로써 국내 분리균주를 이용한 혈청학적인 분석방법으로 국내 라임병 진단에 보다 적합한 조건을 제시하고자 하였다. 본 실험 결과 병원에 의뢰된 불명열 환자의 혈청이 *B. burgdorferi sensu lato* 중 3가지 균종의 항원에 대해 평균 약 8% 정도의 양성반응을 보이는 것으로 미루어볼 때 이들 중 *B. burgdorferi*에 의한 열성질환 감염증이 존재할 것으로 사료된다. 특히 국내 분리균주 중 가장 많이 분리된 바 있는 *B. afzelii*에 대한 양성반응이 14.3%나 나타난 것으로 미루어 아직 밝혀지지 않은 국내 발생 라임병의 원인균은 주로 *B. afzelii*일 가능성이 가장 크다고 할 수 있을 것이다. 또한 효소결합면역 측정법 (ELISA)을 이용하여 양성으로 판별된 혈청에 대해 immunoblotting법을 실시한 결과 주로 41kDa (flagellin), 27kDa, 31kDa (OspA), 34kDa (OspB)에서 band가 나타났다. 본 실험의 결과 국내 열성질환 환자들 중 라임병균에 의한 감염증이 있을 것으로 사료되므로 국내 분리균주를 항원으로 사용한 효소결합면역 측정법 (ELISA), immunoblotting법과 같은 혈청학적진단이 이루어져야 한다고 사료된다.

서 론

라임병은 1975년 미국 Connecticut주 Lyme지방에서 juvenile rheumatoid arthritis에 걸린 환자가 집단적으로 발생한 것이 보고된 이후 알려지게 된 질병으로 이후 미국에서 가장 발생빈도가 높은 절지동물 매개성 질병이며, 유럽 및 아시아에서도 그 발생이 많은 것으로 보고되고 있다^{8,16,29,41,43,44}. 1982년 이 병의 원인균으로 생각되는 나선균이 *Ixodes damini*라는 진드기에서 분리되었으며¹⁰, 1983년 사람에서도 분리되어 *Borrelia burgdorferi*라고 명명되었다^{13,42}.

라임병은 다양한 임상증상을 일으키는데 초기

에는 피부병변으로 만성 유주성 홍반 (erythema chronicum migrans: ECM)이 특징적으로 나타나며, 두통, 근육통, 입파선 통증 등의 전신적 증상도 나타나다가 몇 주 또는 몇 달 후에는 뇌막뇌염 및 심근염이 생길 수도 있고, 말기에는 이행성 근골격통, 중추신경계 혹은 말초신경 장애를 일으키기도 한다^{37,38,42}.

이 질병의 원인균인 *Borrelia burgdorferi*는 그람 음성 미호기성 세균으로 20~30 μ m 길이에 직경이 0.2~0.3 μ m인 나선균으로, 참진드기의 중장 (midgut)에서 발견되며, 진드기에 의해 물릴 때 감염된 중장액 (suspension)의 역류나 배설물에 의해 전염이 되는 것으로 알려져 있다^{25,28}. 진드기는 성충으로 성장하여 산란하기 위한 과정에서 포유동물에 기생하여 흡혈함으로써 절지동물 매개 바이러스나 리케치아들의 병원체 등을 전파할 수 있다고 알려져 있다⁹. 사람은 진드기의 자연숙주는

* 논문접수 1997년 11월 1일, 수정재접수 1998년 1월 16일

† 별책요청저자

아니나 우발적으로 공격을 받을 수 있으므로 병원에 감염될 가능성이 있으며, 이 경우 교상부위에 다양한 피부병변이 생길 수 있다. 이러한 진드기는 여러 질병과 관련이 있고 질병을 전파하기도 함으로 의학적으로 진드기의 중요성이 점차 인식되어 왔다. 국내에서도 피부과에 내원하는 진드기 교상 환자들이 있음이 보고되고 있으며, 원인 진드기는 *Ixodes*종으로 동정되었다⁶⁾. 라임병을 전파하는 진드기는 나라마다 달라 미국에서는 *Ixodes damini*와 *I. pacificus*^{15,39)}, 유럽에서는 *I. ricinus*¹⁵⁾, 일본에서는 *I. ovatus*와 *I. persulcatus*가 알려져 있고³²⁾ 러시아와 중국에서는 *I. persulcatus* 등인 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 우리나라에서는 *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. nipponensis*가 존재하는 것으로 알려졌으며^{4,5)}, 특히 *I. persulcatus*가 주로 분포하는 강원도 영동지방 주민을 대상으로 *B. burgdorferi*에 대한 항체를 측정하여 항체 보유율을 측정 한 결과 항체반응을 나타내는 사람이 상당수 있음이 증명되었다¹⁷⁾. 또한 1992년에는 *I. persulcatus* 진드기에서 *B. burgdorferi*가 처음 분리되어 우리나라에서도 라임병이 존재할 가능성을 시사하였으며¹⁷⁾, 국내에서도 미국, 유럽, 일본 및 중국에서와 같이 진드기에 교상되는 환자가 있으므로 라임병에 걸린 환자가 존재할 것으로 추정된다.

라임병의 원인균인 *Borrelia* spp.가 미국, 유럽, 러시아, 일본 등의 지역에 따라 항원학적 차이가 있어 이에 대한 면역학적, 생화학적 연구로 분리군주에 따라 다양한 변이가 있다고 알려져 있다^{7,10,11,32,48)}. 세계 각지에서 보고되는 분리군주들은 단백질 염색 양상¹²⁾, 단세포균 항체반응¹⁰⁾, DNA-DNA hybridization^{27,36)}, mutiocus enzyme electrophoresis¹⁴⁾, 16S rRNA sequence분석^{7,31)}, 23S rRNA sequence분석³⁰⁾, restriction fragment length polymorphism (RFLP)^{7,12,20,22,26,36)} 등을 이용하여 분류 동정되고 있으며, 1992년 Baranton 등¹²⁾은 라임병을 일으키는 *Borrelia*를 *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*의 3종으로 나누었고, Fukunaga 등^{21,22)}은 RFLP양상을 이용하여 네 번째 또는 다섯 번째 군이 더 존재하며 여기에는 주로 일본에서 분리된 군주가 속한다고 보고하였다. 여기에 우리나라에서 분리된 바 있는 세균은 *B. afzelii* 및 *B. garinii*에 속하는 것으로 보고된 바 있다³⁵⁾.

라임병의 진단은 주로 간접면역 형광법 (indi-

rect immunofluorescent assay: IFA)이나 효소결합면역 측정법(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)을 이용하는 혈청학적 방법과 만성 유구성 홍반 같은 피부병변의 임상증상에 의존하고 있다^{19,23,46)}. IFA 및 ELISA법은 immunoblotting 분석보다 간편하나 다른 나선균에 속하는 세균과 교차반응이 있으며³⁷⁾, 또한 다른 *Borrelia* 질환이나 나선균 질환 환자의 혈청과도 교차반응을 나타내어²⁰⁾ 그 특이성에 문제가 있다. Immunoblotting 분석은 라임병의 발생률이 적은 지역에서 IFA나 ELISA에 의해서 얻어진 실험결과를 확인하기 위하여 사용되고 있다³⁶⁾.

본 실험에서는 우리나라에서도 라임병을 매개하는 진드기가 존재하고 그러한 진드기에서 라임병의 원인균인 *B. afzelii* (KK-1) 및 *B. garinii* (KW-1)가 분리가 보고된 바 있어^{2,35)}, 이에 대한 연구가 필요하다고 사료되므로, *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii* (KK-1) 및 *B. garinii* (KW-1)를 실험동물에 감염시켜 시기별로 항체가 형성되는 양상을 ELISA와 western blotting을 이용하여 분석하였다. 또한 병원에 의뢰된 열성질환 환자들의 혈청을 각각의 라임병 원인균에 대해 ELISA를 실시하여 일정수준 이상의 값을 나타내는 환자 혈청에 대하여 western blotting을 실시함으로써 이러한 열성질환의 일부는 Lyme병일 수도 있다는 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험용 토끼에 실험세균 접종

실험용 토끼에 세균을 접종하기 전에 각각의 혈액을 채혈하여 혈청을 분리하였다. Barbour-Stoener-Kelly II (BSK-II)배지에 접종하여 34℃에서 1주 동안 배양한 *B. burgdorferi* B31와 *B. afzelii* 각각의 세균수를 확인하고 이를 1×10^8 /ml로 희석하여 0.5ml을 각각의 토끼 옆구리에 피내주사하였다. 이후 5일 간격으로 채혈하였으며, 세균수를 1×10^8 /ml로 희석하여 1ml을 다시 접종하였다. 6회 접종은 면역증강제와 항원을 동량섞어 1ml을 근육주사하고, 5일 후 채혈하였다. BSK-II배지에 접종하여 34℃에서 1주 동안 배양한 *B. garinii*는 세균수를 확인하여 이를 1×10^8 /ml로 희석하여 1ml을 토끼 옆구리에 피하주사하였다. 이후 접종 1주, 2주, 4주, 6주간격으로 채혈하였다. 채혈 후 혈청을 분리하여 -70℃에 보관하였다가 효소결합

면역 측정법과 western blotting을 실시하였다.

2. 환자혈청

1996년 9월부터 1997년 10월까지 원주기독병원 임상병리과에 의뢰된 불명열을 주증으로 내원한 217명 환자의 혈청을 모아 *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii*, *B. garinii* 항원에 대한 효소결합면역 분석법 및 western blotting을 실시하였다.

3. 효소결합면역 측정법 (ELISA)을 위한 항원 제조

실험동물에 접종한 *Borrelia* spp.에 대한 항체 생성을 확인하기 위하여 *B. burgdorferi* B31와 *B. afzelii* (KK-1), *B. garinii* (KW-1)를 BSK-II배지에 접종하여 34℃에서 1주 동안 배양하였다. 배양기간 동안 매일 암시야 현미경으로 세균의 증식 정도를 관찰하였다. 충분히 증식한 각균의 배양액을 8000 RPM으로 30분 동안 원심분리한 후 그 침사를 1ml의 증류수로 재부유하였다. 이 부유액을 60W에서 15초 간격으로 10회 초음파분쇄 처리하였다.

4. 효소결합면역 측정법 (ELISA)

Microtiter plate well를 초음파분쇄 처리한 각각의 *Borrelia* spp. 단백질 항원을 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)에 1µg/ml농도로 희석하여 well당 50µl씩 분주하여 37℃에서 1시간 동안 부착시켰다. 항원을 부착시킨 plate를 PBS-0.05% Tween 20용액으로 5분간 3번 세척하고, 5% skim milk 용액을 200µl/well씩 분주하여 37℃에서 1시간 처리하여 항원이 부착되지 않은 부위를 차단시켰다. 다시 PBS-0.05% Tween 20용액으로 plate를 세척한 후 1:400으로 희석한 대조군과 실험군 혈청을 각각 50µl/well 분주하여 37℃에서 1시간 동안 항원-항체반응을 진행시켰다. 이것을 PBS-0.05% Tween 20용액으로 5분간 3번 세척한 후, 1:4000으로 희석한 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG를 50µl/well를 분주하여 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-0.05% Tween 20용액으로 두 번 세척하였다. 기질액 (0.1M phosphate-citrate buffer, pH 5.0 50ml, 30% H₂O₂ 10µl, σ-nitrophenylenediamine: OPD) 50µl/well을 분주하여 암소에서 30분간 반응시킨 후, 2.5M H₂SO₄를 25µl/well 분주하여 반응을 정지시키고 490nm에서 OD값을 측정하였다. 또한 환자 혈청에 대해서도 동일한 과정을 적

용하되 그때는 horseradish peroxidase conjugated anti-human IgG를 사용하였다.

5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 및 Immunoblotting

B. burgdorferi 항원에 대한 혈청의 반응 양상을 분석하기 위하여 Laemmli²⁵⁾의 discontinuous buffer system을 이용하여 SDS-PAGE를 한 후 본 실험에서 제조한 가토 항혈청과 불명열 환자 혈청에 대해 immunoblotting을 실시하였다. 12.5% separating gel을 이용하여 20mA에서 bromophenol blue가 running gel 하단부를 지날 때까지 전기영동한 후 gel의 일부는 단백질 염색을 하기 위하여 Coomassie blue-R 250용액으로 30분간 염색한 후 10% acetic acid로 완전히 색이 빠질때까지 탈색시켰고, 나머지는 transfer 완충액 (20mM Tris-HCl, 144mM glycine, 25% methanol, 0.01% SDS, pH 8.0)에 넣어 4℃에서 30분간 처리한 후, electrontransfer system에 넣어 140mA로 1시간 동안 transfer한 후, NC paper를 1% BSA-TBST 완충액 (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)으로 37℃에서 30분간 교반처리하여 항원이 부착되지 않은 부위를 차단하고 TBST로 세척하였다. 여기에 TBST 완충액에 1:400으로 희석한 가토 항혈청 또는 불명열 환자 혈청을 37℃에서 30분간 처리하여 항원·항체 반응을 유도하고, TBST 완충액으로 세척한 후 alkaline phosphatase conjugated anti-rabbit IgG (H+L)을 alkaline phosphatase 완충액 (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH 9.5)으로 1:7,500비율로 희석하여 37℃에서 30분간 처리하였다. TBST 완충액으로 세척한 후 기질용액을 넣어 실온에서 빛을 차단하여 10분간 효소반응을 진행시켰다. 이때 기질용액은 10ml의 AP완충액에 nitro blue tetrazolium (NBT, 50mg/ml in dimethylfluoride) 33µl와 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphatate (BCIP, 50mg/ml in 70% dimethylfluoride) 44µl를 첨가하여 제조하였다. 효소반응은 반응정지용 완충액 (20mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8.0)으로 정지시킨 후 발색반응의 정도를 확인하였다. 이러한 과정중에 불명열 환자 혈청에 대해서는 alkaline phosphatase conjugated anti-human IgG (H+L)를 사용하였다.

결 과

1. 효소결합면역 측정법 (ELISA)을 이용한 가토 혈청의 면역학적 분석

각각의 1×10^8 /ml *Borrelia* spp.를 토끼에 면역시킨 후 항혈청을 분리하여, 각 세균에 대한 시기별 항체 생성여부를 ELISA를 이용하여 조사하였다. 이때 초음파분쇄 처리한 *B. burgdorferi*와 *B. afzelii*의 단백질 항원 농도에 따른 가토 혈청의 반응 정도를 알아보기 위하여 0.1, 0.25, 0.5 μ g/ml의 농도 microtiter plate에 항원을 부착시켰다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *B. burgdorferi*에

대해서 0.1 μ g/ml농도일 경우에는 감염 2주, 4주에 얻은 가토 혈청의 평균 흡광도 (OD)가 각각 1.165, 1.594로 정상혈청의 평균 흡광도 (0.247)보다 3SD (SD: 0.034) 이상으로 측정되었고, 0.25 μ g/ml농도에서는 2.165, 2.625로 정상혈청의 평균 흡광도 (0.453)보다 역시 3SD (SD: 0.051) 이상이었으며, 0.5 μ g/ml에서는 1.792, 1.852로 정상혈청 평균 흡광도 (0.248)보다 3SD(SD: 0.015) 이상으로 측정되었다. *B. afzelii*에 대해서 0.1 μ g/ml농도에서는 1.559, 1.818와 0.274 (SD: 0.05)의 값이 나왔고, 0.25 μ g/ml농도에서는 2.238, 2.383과 0.357 (SD: 0.021)의 값이 측정되었으며, 0.5 μ g/ml농도에서는 1.77, 1.772와 0.238 (SD: 0.058)의 값이 측

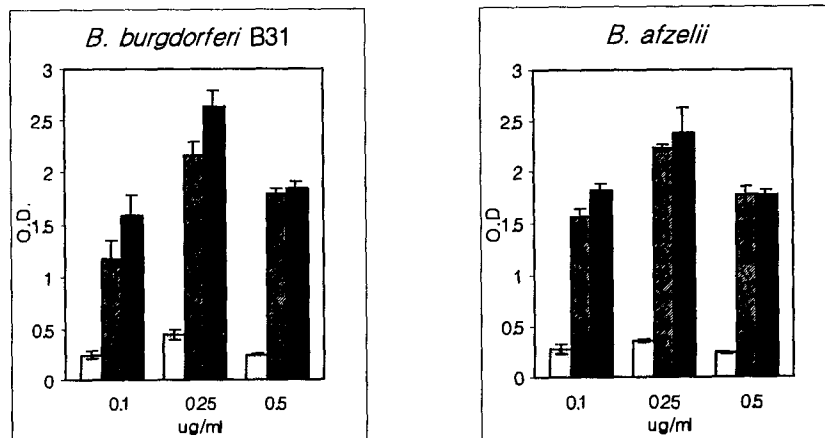


Fig. 1. Standardization (I) of ELISA according to the concentrations of coated antigen in sera from challenged animals. □; normal sera, ▨; 2 weeks after injection, ■; 4 weeks after injection.

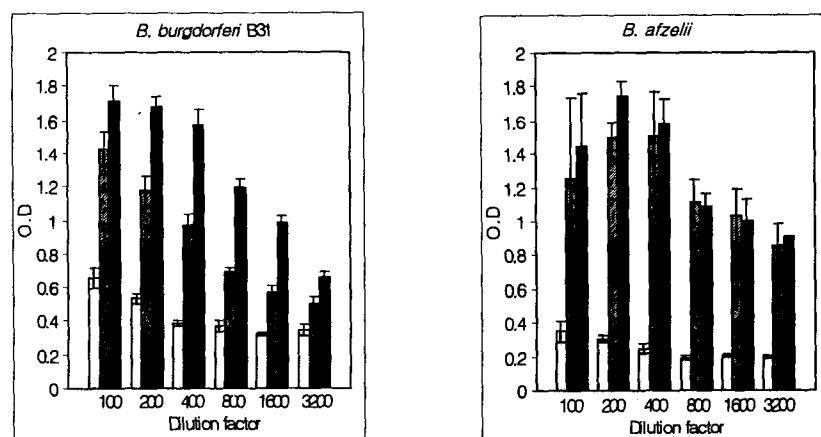


Fig. 2. Standardization (II) of ELISA according to dilution factor of sera from challenged animals. □; normal sera, ▨; 2 weeks after injection, ■; 4 weeks after injection.

정되어 모두 각각의 음성대조군에 비해 3SD 이상의 흡광도를 나타내어 통계학적으로 유의한 차이가 인정되었다 ($p < 0.05$).

또한 가토 혈청의 희석배수에 따른 반응 조건을 확인하기 위해서 2주, 4주에 얻은 가토 혈청을 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200으로 희석하여 반응시켰다. 이 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 1:400과 1:800의 희석배수가 *B. burgdorferi*와 *B. afzelii* 모두에 적용하기에 좋은 유의차를 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 조건을 기초로 *B. burgdorferi*와 *B. afzelii*에 감염된 가토 혈청의 시기별 항체가의 변화를 측정된 결과 Fig. 3에서와

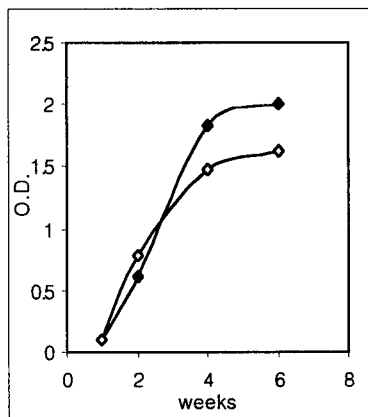


Fig. 3. Kinetics of seroconversion in ELISA according to the bleeding times in sera from challenged animals. ■; 1:400 diluted sera to *B. burgdorferi* B31, □; 1:400 diluted sera to *B. afzelii*.

같이 접종 2주까지 급속히 증가하다가 6주에서부터는 일정수준으로 유지되는 전형적인 sigmoidal curve의 형태를 나타내는 것을 볼 수 있었다.

2. *Borrelia* spp.에 대한 가토 혈청의 immunoblotting 분석

각각의 whole cell을 전기영동한 후, 각 균에 대한 가토 혈청을 이용하여 immunoblotting을 실시한 결과 Fig. 5에서 보이는 것과 마찬가지로 *B. burgdorferi* B31에서는 21kDa, 31kDa, 34kDa, 41kDa 등의 주요 단백질 항원에 대한 항체 생성을 확인하고, *B. afzelii*에서는 이외에도 41kDa에 대한 항체 형성을 확인할 수 있었다. *B. garinii*에서는 21(23)kDa, 31kDa의 단백질 항원에 대한 항체 형성을 확인할 수 있었다.

3. 불명열 환자 혈청을 이용한 효소결합면역 측정법 (ELISA)

Microplate에 초음파분쇄한 각각의 *Borrelia* spp.를 1 μ g/ml 농도로 부착시킨 후 정상인 혈청과 병원에 의뢰된 불명열 환자 혈청을 1:400으로 희석하여 반응시킨 결과 *B. burgdorferi* B31, *B. afzelii*, *B. garinii*에 대한 정상인 혈청의 평균 흡광도는 각각 0.549, 0.316, 0.385이며, 표준편차는 각각 0.173, 0.105, 0.136으로 측정되어 각각에 대한 유의성을 가진 항체값의 흡광도 기준을 각각 0.1068, 0.602, 0.794 (평균 흡광도 + 3 \times 표준편차) 이상으로 정하였다 (Fig. 4). 이에 따라 라인평균 양성으

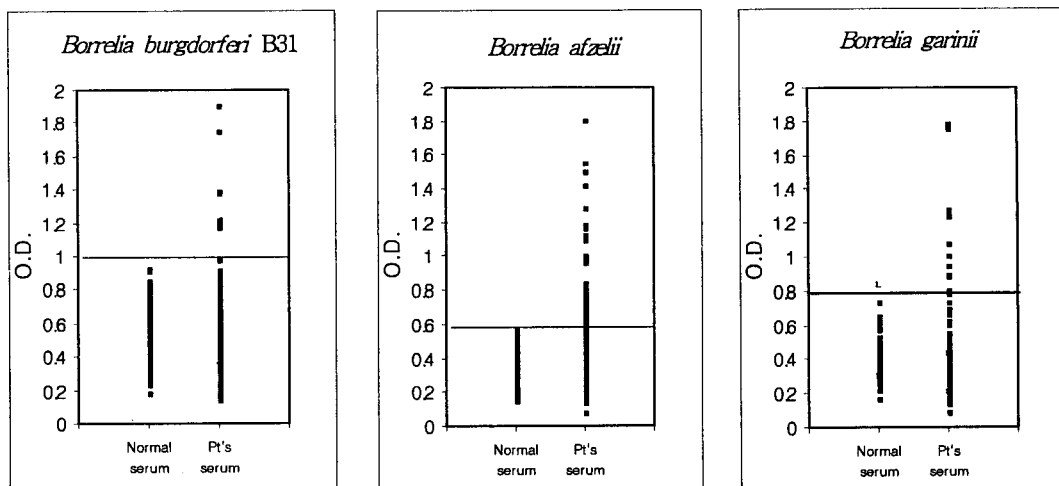


Fig. 4. Comparison of seroreactivity between normal and patient's sera with unknown fever against *B. burgdorferi*. Cut-off value (mean of normal sera + 3 \times SD) was 1.069 to *B. burgdorferi* B31, 0.602 to *B. afzelii*, 0.794 to *B. garinii*.

Table 1. Seroreactivity of unknown fever patients against *B. burgdorferi* in ELIS

	<i>B. burgdorferi</i> B31	<i>B. afzelii</i>	<i>B. garinii</i>
Positive (%)	7 (3.2%)	31 (14.3%)	14 (6.5%)
Negative	210	186	203

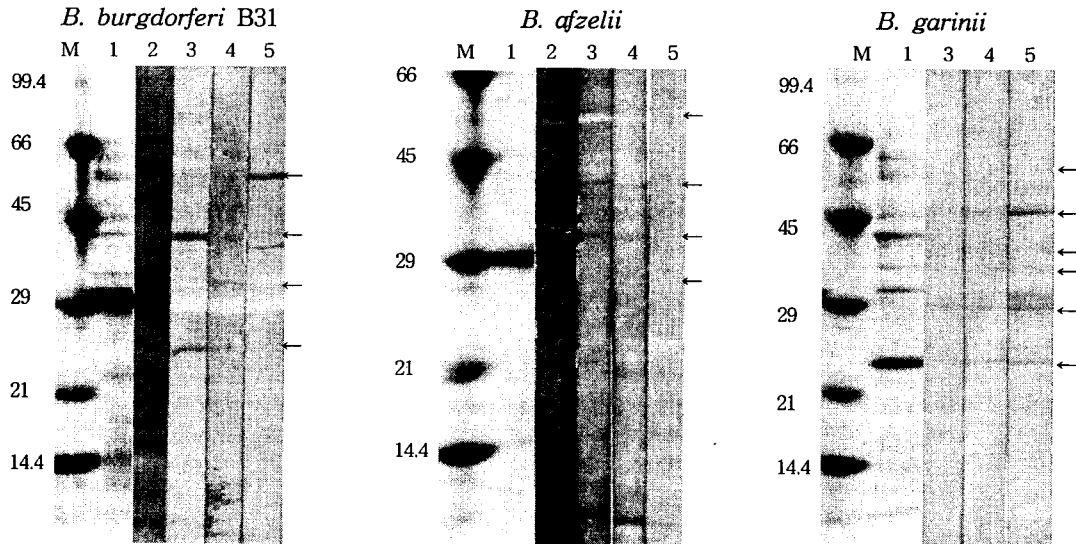


Fig. 5. Seroreactivity patterns against *B. burgdorferi* in immunoblotting assay. Major patterns of band were 23 (21)kDa, 41kDa, and 66kDa to *B. burgdorferi* B31, 34 (35)kDa to *B. afzelii*, 23 (21)kDa and 31kDa to *B. garinii*. M; maker, 1 lane; protein antigen in SDS-PAGE, 3, 4, and 5 lanes; seroreactive patterns of band in immunoblotting assay, 2 lane of *B. burgdorferi* B31 and *B. afzelii*; seroreactive patterns of band in sera from conjugate and related substances.

로 판별된 검체수는 *B. burgdorferi* B31은 7개 (3.2%), *B. afzelii*는 31개 (14.3%), *B. garinii*는 14개 (6.5%)였다 (Table 1).

4. *Borrelia* spp.에 대한 불명열 환자 혈청을 이용한 immunoblotting 분석

효소결합면역 측정법을 이용한 *Borrelia* spp.에 대한 항체가 시험에서 양성인 나온 혈청을 대상으로 immunoblotting을 실시하여 Fig. 5와 같은 결과를 얻었다. *B. burgdorferi* B31에 대해서는 41kDa (flagellin) 단백질 항원에 대해서 항체반응이 확인되었고, *B. afzelii*에 대해서는 주로 21kDa (OspC), 34kDa (OspB) 단백질 항원에 대해서 항체반응이 나타났으며 41kDa에 대해서는 항체반응이 있는 것도 있고 없는 것도 있었다. *B. garinii*에 대해서는 주로 21kDa과 31kDa (OspA) 단백질 항원에 대한 항체반응이 나타났고 34kDa과 41kDa에 대해서도 미약하기는 하지만 대부분 반응이 나타남을

확인할 수 있었다.

고 찰

현재 라임병의 진단은 역학적, 임상적 기준을 바탕으로 이루어지고 있다. Hyde 등²⁵⁾은 만성 유주성 홍반 (Erythema Chronicum Migrans: ECM)과 같은 피부병변, 진드기에 물린 과거력, 풍토병이 있는 지역으로의 여행 경력 및 간접 면역형광항체법으로 1:256 이상의 회복기 혈청 항체 역가가 있어야 한다는 점 등으로 라임병으로 확진할 수 있는 경우의 표준기준을 만들었다. 그러나 유주성 홍반과 같은 임상증상이 나타나는 경우는 라임병 환자의 60~80% 정도이며, 나머지는 발열이나 감기같은 전신적 증상을 동반한다⁴⁴⁾. 특히 발열은 라임병으로 확진된 환자의 60% 정도에서 동반되며, 신경계, 관절 등에 증상이 나타나는 전신적 감염으로 진행된 경우 빈번하게 동반된다고 한다⁴⁰⁾.

라임병에서 나타나는 발열증상은 간헐적이며 비교적 미열인 경우가 많기 때문에 우리나라와 같이 라임병에 대한 인식이 부족한 경우 봄과 가을철로 발생하는 불명열 환자들 중에 발견되지 않은 라임병 환자가 상당수 포함되어 있을 가능성이 있다고 사료되어 병원에 의뢰된 열성질환 환자들의 혈청을 대상으로 *B. burgdorferi*에 대한 항체를 측정하여 그 가능성을 제시하고자 하였다.

본 연구에서는 라임병균에 대한 불명열 환자의 항체형성 여부는 확인하기에 앞서 *B. burgdorferi* B31과 국내 분리균주인 *B. afzelii*, *B. garinii*을 실험동물에 접종시킴으로써 감염된 실험동물에서 얻은 혈청을 이용하여 효소결합면역 측정법에 필요한 항원 농도 및 혈청의 희석배수를 결정하였다. 또한 주기적인 체혈로 항체가 형성되는 양상을 관찰하였다. 그 결과 효소결합면역 측정법을 실시하기 위해서는 최소한 0.1 μ g/ml의 항원을 ELISA plate에 부착시켜야만 하는 것으로 나타났다. 비록 이때 편차값이 0.25 μ g/ml이나 0.5 μ g/ml의 경우 보다는 다소 크기는 하지만 0.25 μ g/ml농도의 항원을 부착시킬 경우 양성혈청의 흡광도가 2를 넘어가게 되므로 별 의미가 없는 것으로 판단되고, 0.5 μ g/ml을 쓸 경우에는 체혈시기별 흡광도 차이가 뚜렷하지 않았기에 최소한의 항원농도로 원하는 결과를 얻을 수 있는 0.1 μ g/ml를 ELISA의 부착 항원 농도로 정하였다. 또한 혈청을 1:100부터 2배 희석법으로 희석하여 흡광도를 측정한 결과 1:400이나 1:800 희석배수가 *B. burgdorferi* B31과 *B. afzelii*에 모두 적용하기에 적당한 유의차를 보였기에 이중 1:400 희석배수를 이후 과정에 적용하였다. 국내의 혈청학적인 연구는 대부분 간접면역 형광법 (IFA)으로 이루어졌기에 본 실험결과와 비교할 만한 연구 보고가 거의 없으며, 비록 기 등¹⁾이 10⁷/ml의 항원을 50 μ l/well로 부착시키고 항혈청을 1:100으로 희석하여 사용하였다고 하는 연구보고와 조 등¹⁸⁾이 60 μ g/ml의 항원을 50 μ l/well로 부착시켜 항혈청을 1:300으로 희석하여 사용하였다는 연구보고가 있기는 하지만 이들의 경우 환자 혈청에 대해서만 측정하였기에 본 실험결과와 직접 비교하기에는 부적당하다고 사료된다. 그리고 시기별 항체 형성 양상을 ELISA로 확인한 결과 라임병균 접종 4주까지는 증가하는 추세를 보이다가 접종 6주에 이르러서는 그 곡선이 완만해지는 양상을 보이고 있다.

효소결합면역 측정법을 이용하여 *B. burgdorferi*

에 대한 불명열 환자의 항체를 측정한 결과 *B. burgdorferi* B31에 대해서는 3.2%, *B. afzelii*에 대해서는 14.3%, *B. garinii*에 대해서는 6.5%의 양성율을 보였다. 이러한 결과는 1994년 박 등³⁾이 국내 분리균주들에 대한 항원분석 결과 국내에 주로 분포하는 *Borrelia* spp.를 *B. afzelii*라고한 보고와 비교해 볼 때 열성질환 환자의 혈청이 *B. afzelii*에 대한 항체형성율이 가장 높은 것은 당연한 결과라 할 수 있다. 또한 1993년 기 등¹⁾이 보고한 국내 열성질환 환자 중 약 9.2% 정도가 라임병균 항원에 양성이라는 연구내용과 본 연구를 바탕으로 볼 때 국내 열성질환 환자 중에는 약 9% 미만의 라임병 환자가 있을 것으로 사료된다.

*B. burgdorferi*의 주요항원으로는 18kDa, 21kDa, 23kDa의 단백질 항원 (OspC), 27kDa, 31kDa (OspA), 34kDa (OspB)의 단백질 항원과 이외에 39kDa, 41kDa, 66kDa, 75kDa, 93kDa의 단백질 항원 등이 알려져 있는데, 박 등³⁾이 *B. burgdorferi sensu lato*의 주요 단백질 항원을 SDS-PAGE상에서 비교 분석한 결과 *B. burgdorferi* B31의 경우 OspA는 31kDa, OspB는 34kDa이고, 국내 분리균주 중 *B. afzelii*에 속하는 균주에서 OspB는 35kDa, OspA는 32kDa의 단백 항원이 확인하여 보고된 바 있다. 1996년 Norman³⁴⁾은 *Borrelia* spp.에 대한 혈청학적인 분석을 통해 라임병 양성균의 주요 항원들 중에 적어도 4가지 이상에 대해서 band가 형성되어야 한다고 보고한 바 있는데, 본 연구에서는 사용한 균주들은 국내 분리균주들로서 분양받아 사용하였기에 항원구조에 있어서 앞서 박 등³⁾이 확인한 사실과 별차이는 없지만 단지 계대배양을 하면서 단백질 항원이 소실되면서 SDS-PAGE상에서 농도가 떨어지는 것으로 볼 수 있었다. 이에 효소결합면역 측정법으로 양성반응이 나온 환자 혈청을 immunoblotting법을 이용하여 어떤 항원에 대해 주로 생성되었는가를 확인한 결과 *B. burgdorferi* B31의 경우에는 41kDa (flagellin), 66kDa, 23 (21)kDa에 대해서 각기 다른 반응을 나타내기도 하고 같은 반응을 나타내기도 하였다. 이때 41kDa과 23 (21)kDa 단백질 항원에 대해 반응을 나타내는 경우는 Zoller⁴⁹⁾의 연구보고에 근거할 때 감염 초기로 유추할 수 있다. *B. afzelii*의 경우에는 주로 34 (35)kDa의 OspB 단백질 항원에 대해 반응을 보였으며, *B. garinii*의 경우 23 (21)kDa의 단백질 항원과 31kDa의 단백질 항원에 대해 반응을 나타내었다. 비록 본 연구에서 immunoblotting

법으로 확인되지는 않았으나 라임병균의 계대배양으로 소실된 항원이 있을 것을 감안할 때 라임병균 항원에 대한 보다 많은 항체가 존재할 것으로 사료되어 이에 관한 체계적인 연구 및 조사가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

또한 세계각지에서 분리되는 라임병균이 각기 다른 항원학적 차이를 나타내다는 사실을 고려하여 같은 시기에 발생하는 Leptospirosis나 유행성 출혈열에 대한 예방접종이 이루어지는 것과 마찬가지로 국내에서 발생하는 라임병의 원인균의 항원구조에 관한 연구가 지속적으로 이루어 진다면 국내 분리균주에 대한 특이 백신생산에 도움을 줄 수 있을 것이다.

결 론

우리나라에서는 봄과 가을철에 열성질환 환자가 많이 발생한다. 특히 열성질환 환자의 경우 대부분이 리케치아 혹은 바이러스 감염으로 유발되어지는 것으로 생각되어 이것들에 대한 혈청학적, 면역학적 연구가 이루어지고 있으나 그밖에 알 수 없는 원인체에 의한 열성질환이 종종 나타나고 있어 이에 대한 연구가 시급한 실정이다.

현재 라임병을 진단을 위해 국내에서 이루어지고 있는 방법은 원인균인 *B. burgdorferi* 항원에 대한 항체를 검출하는 혈청학적인 방법이다. 하지만 대부분의 경우 항원으로 사용하는 균주가 다른 나라에서 분양받은 균주이므로 이때 얻어진 결과를 유추해석하는데 어려움이 수반되고 있는 실정이다. 본 실험에서는 국내 분리균주에 대한 항체를 검출하는 조건을 확립하고, 이를 토대로 하여 불명열 환자의 항체가 항원에 반응하는 양상을 파악함으로써 국내 분리균주를 이용한 혈청학적인 분석방법으로 국내 라임병 진단에 보다 적합한 조건을 제시하고자 하였다.

본 실험 결과 병원에 의뢰된 불명열 환자의 혈청이 *B. burgdorferi sensu lato* 중 3가지 균종의 항원에 대해 평균 약 8% 정도의 양성반응을 보이는 것으로 미루어볼 때 이들 중 *B. burgdorferi*에 의한 열성질환 감염증이 존재할 것으로 사료된다. 특히 국내 분리균주 중 가장 많이 분리된 바 있는 *B. afzelii*에 대한 양성반응이 14.3%나 나타난 것으로 미루어 아직 밝혀지지 않은 국내 발생 라임병의 원인균은 주로 *B. afzelii*일 가능성이 가장 크다고 할 수 있을 것이다. 또한 효소결합면역 측

정법 (ELISA)을 이용하여 양성으로 판별된 혈청에 대해 immunoblotting에서 나타난 band형성 양상으로 미루어 볼 때 주로 41kDa (flagellin)단백질 항원에 반응하면 감염 초기로, 27kDa, 31kDa (OspA)나 34kDa (OspB)단백질 항원에 반응하면 감염 후기로 진단하는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. 기선호, 황규삼, 오희복, 박경석 (1993): 열성질환자들에서의 *Borrelia burgdorferi*에 대한 항체 분석. 대한미생물학회지, **28**: 463-471.
2. 박경희, 이승현, 원용재, 장원중, 장우현 (1992): 진드기에서 라임병의 원인균인 *Borrelia burgdorferi*의 분리. 대한미생물학회지, **27**: 307-312.
3. 박경희, 한명준, 이승현, 김중현, 심재철, 장원중, 장우현 (1994): 전국에 분포하는 진드기에서 라임병균의 분리 및 분리균주의 항원학적 동정. 대한미생물학회지, **29**: 607-617.
4. 백승철, 오영진, 김사용, 조백기, 허원 (1989): *Ixodes nipponensis*에 의한 참진드기 교상 1예. 대한피부학회지, **27**: 83-88.
5. 이순형, 채종일, 고원규, 홍성중, 정영덕 (1989): 진드기에 의한 인체 두피감염 1례. 기생충학잡지, **27**: 67-69.
6. 조백기, 이준영, 김진우 (1985): 참진드기 교상 1예. 대한피부학회지, **23**: 480-485.
7. Adam T, Gassmann GS, Rasiah C and Gopal UB (1991): Phenotypic and genotypic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates from various sources. *Infect Immun*, **59**: 2579-2585.
8. Anderson KF (1989): Epizootology of *Borrelia* in *Ixodes* tick vectors and reservoir hosts. *Rev Infect Dis*, **11**: 1451-1459.
9. Barbour AG (1984): Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*, **57**: 521-515.
10. Barbour AG, Heilant RA and Howe TR (1985): Heterogeneity of major proteins in Lyme disease borreliae: a molecular analysis of North American and European isolates. *J Infect Dis*, **152**: 478-484.
11. Barbour AG, Tessier SL and Hayes SF (1984): Variation in a major surface protein of Lyme

- disease spirochetes. *Infect Immun*, **45**: 94-100.
12. Baranton G, Postic D, Saint-Girons I, Boerlin P, Piffaretti JC, Assous M and Grimont PAD (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol*, **42**: 378-383.
 13. Benach JL, Bosler EM, Hanrahan JP, Coleman JL, HAbicht GS, Bast TF, Cameron DJ, Ziegler JL, Babour AG, Burgdorferi W, Edelman R and Kaslow RA (1983): Spirochetes isolated from the blood of two patients with Lyme disease. *N Engl J Med*, **308**: 740-742.
 14. Boerlin P, Peter O, Bretz AG, postic D, Baranton G and Piffaretti JC (1992): Population genetic analysis of *Borrelia burgdorferi* isolates by multilocus enzyme electrophoresis. *Infect Immun*, **60**: 1677-1683.
 15. Burgdorferi W (1984): Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med*, **57**: 515-520.
 16. Burgdorfer W, Barbour AG, Hayes SF, Benach JL, Grunwaldt E and Davis JP (1982): Lyme disease- a tickborne spirochetosis? *Science*, **216**: 1317-1319.
 17. Cho SN, Kim JD, Chong Y, Lee MG and Ahn EW (1990): Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease agent, among residents in Youngdong area of the Kangwon province. *J Korean Soc Microbiol*, **25**: 163-169.
 18. Cho SN, Lee TY, Lee MK, Kim DS and Kim JD (1991): Immunoblotting Analysis of antibodies against *Borrelia burgdorferi*, the Lyme Disease Agent, in Sera from the Korean Residents. *J Korean Soc Microbiol*, **26**: 263-272.
 19. Craft JE, Grodzichi RL and Steere AC (1984): The antibody response in Lyme disease: Evaluation of diagnostic tests. *J Infect Dis*, **149**: 789-795.
 20. Dekonenko EJ, Steere AC, Berardi VP and Kravchuk LN (1988): Lyme borreliosis in the Soviet Union, A cooperative US-USSR report. *J Inf Dis*, **158**: 748-753.
 21. Fukunaga M, Sohnaka M, Nakao M and Miyamoto (1993): Evaluation of genetic divergence of *Borrelial* isolates from Lyme disease patients in Hokkaido, Japan, by rRNA gene probes. *J Clin Microbiol*, **31**: 2044-2048.
 22. Fukunaga M, Sohnaka M and Yanagihara Y (1993): Analysis of *Borrelia* species associated with Lyme disease by rRNA gene restriction fragment length polymorphism. *J Gen Microbiol*, **139**: 1141-1146.
 23. Hansen K, Hindersson P and Pederson NS (1988): Measurement of antibodies to *Borrelia burgdorferi* flagellum improves serodiagnosis in Lyme disease. *J Clin Microbiol*, **26**: 338-346.
 24. Hyde FW, Johnson RC, White TJ and Shelburne CE (1989): Detection of antigens in urine of mice and humans infected with *B. burgdorferi*, etiological agent of Lyme disease. *J Clin Microbiol*, **27**: 58-61.
 25. Johnson RC, Hyde FW and Rumpel CM (1984): Taxonomy of the Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med*, **57**: 529-537.
 26. Laemmli CK (1970): Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680.
 27. LeFebvre RB, Perny GC and Johnson RC (1989): Characterization of *Borrelia burgdorferi* isolates by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization. *J Clin Microbiol*, **27**: 636-639.
 28. Lennette EH (1985): Clinical Microbiology 4th ed., American Society for Microbiology Washington.
 29. Magnarelli LA and Anderson JF (1988): Ticks and biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. *J Clin Microbiol*, **26**: 1482-1486.
 30. Maiwald M, Stockunger C, Hassler M, von Knebel Doeberitz and Sonntag HG (1995): Evaluation of the detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in urine samples by polymerase chain reaction. *Infection*, **23**: 173-179.
 31. Marconi RT, Lubke L, Hauglum W and Garon CF (1992): Species-specific identification of and distinction between *Borrelia burgdorferi* genomic group by using 16S rRNA-directed oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol*, **30**: 628-632.
 32. Masuzawa T, Okada Y, Beppu Y, Oku T, Ka-

- wamori F and Yanagihara Y (1991): Immunological properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from the *Ixodes ovatus* in Shizuoka, Japan. *Microbiol Immunol*, **35**: 913-919.
33. Nadelman, RB, Pavia CS, Magnarelli LA and Wormser GP (1990): Isolation of *Borrelia burgdorferi* from the blood of seven patients with Lyme disease. *Am J Med*, **88**: 21-26.
 34. Norman GL, Antig JM, Bigaignon G and Horgrefe WR (1996): Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii* Western Blots (Immunoblots). *J Clin Microbiol*, **34**: 1732-1738.
 35. Park KH, Chang WH and Schwan TG (1993): Identification and characterization of Lyme disease spirochetes, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, isolated in Korea. *J Clin Microbiol*, **31**: 1831-1837.
 36. Postic D, Edlinger C, Richaud C, Grimont F, Dufresne J, Perolat P, Baranton G and Grimont PAD (1990): Two genomic species in *Borreilia burgdorferi*. *Res Microbiol*, **141**: 465-475.
 37. Raoult D, Hechemy KE and Baranton G (1989): Cross-reaction with *Borrelia burgdorferi* antigen of sera from patients with human immunodeficiency virus infection, syphilis and leptospirosis. *J Clin Microbiol*, **27**: 2152-2155.
 38. Reik L, Steere AC, Barenhagen NH, Shope RE and Mamawista SE (1979): Neurologic abnormalities of Lyme disease. *Medicine (Baltimore)*, **58**: 281-294.
 39. Schmid GP (1984): The global distribution of Lyme disease. *Yale J Biol Med*, **57**: 617-618.
 40. Shrestha M, Grodzicki RL and Steere AC (1995): Diagnosing Early Lyme Disease. *Am J Med*, **78**: 235-240.
 41. Steere AC, Grodzicki RL, Kornblatt AN, Craft JE, Barbour AG, Burgdorferi W, Schmid GP, Johnson E and Malawista SE (1983): The spirochetal etiology of Lyme disease. *N Engl J Med*, **308**: 733-740.
 42. Steere AC, Taylor E, Wilson ML, Levine JF and Spielman A (1986): Longitudinal assessment of the clinical and epidemiological features of Lyme disease in a defined population. *J Inf Dis*, **154**: 295-300.
 43. Steere AC, Malawista SE, Snyderman DR, Shope RE, Andiman WA, Rosa MR and Steele FM (1977): Lyme arthritis: an epidemic of oligoarthrocellular arthritis in children and adults in three connecticut communities. *Arthritis Rheum*, **20**: 7-17.
 44. Steere AC (1989): Lyme disease. *N Engl J Med*, **321**: 586-596.
 45. Stalhammar-Carlemalm M, Jenny E, Germ L, Aeschlimann A and Meyer J (1990): Plasmid analysis and restriction fragment length polymorphism of chromosomal DNA allow a distinction between *Borrelia burgdorferi* strains. *Zbl Bakt*, **274**: 28-39.
 46. Stiernstedt GT, Grunstrom M, Hederstedt B and Skoldenberg (1985): Diagnosis of spirochetal meningitis by enzyme-linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence assay in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol*, **21**: 819-825.
 47. von Stedingk LV, Olsson I, Hanson HS, Asbrink E and Hovmark A (1995): Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in skin lesion of early and late Lyme Borreliosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **14**: 1-5.
 48. Wilske B, Preac-mursic V, Schierz S, Kuhbeck R, Babour AC and Kramer M (1988): Antigenic variability of *Borrelia burgdorferi*. *Ann N Y Acad Sci USA*, **539**: 129-143.
 49. Zoeller L, Burkard S and Schafer H (1991): Validity of Western Immunoblot Band Patterns in the Serodiagnosis of Lyme Borreliosis. *J Clin Microbiol*, **29**: 174-182.

=Abstract=

**Analysis of Antibodies Against Lyme Disease Agent, *Borrelia burgdorferi*,
in Sera from Patients with Unknown Fever**

Young-Mi Kim[†] and Jong-Bae Kim

*Department of Medical Technology, College of Health Science,
Yonsei University, Wonju, 220-710, Republic of Korea*

Currently, the laboratory diagnosis for Lyme disease have been performed with the detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi*. However there might be some difficulties in the interpretation of obtained results due to the usage of foreign isolates as an antigen in the test. Therefore the optimization of serological tests with Korean isolates of *B. burgdorferi* as an antigen would be needed to establish the standardized diagnostic method for the detection of antibodies against *B. burgdorferi* infection.

In this study, the optimization of ELISA was investigated with experimentally challenged rabbit sera and sonicated *B. burgdorferi* antigens of Korean isolates. Of 217 human patient's sera with unknown fever, the mean seropositivities in ELISA, done under the optimized conditions obtained in this study, were found to be about 8% against *B. burgdorferi sensu lato*, showing the highest seropositivity of 14.3% against *B. afzelii*. In immunoblotting assay with ELISA-positive human sera, the major reactive bands were 41kDa (flagellin) which might be the indication of early infection, and 27kDa, 31kDa (OspA), 34kDa (OspB) which are the characteristics of late infection. Obtained results in this study might strongly indicate the possibility of *B. burgdorferi* infections in Korea.

Key Words: *B. burgdorferi*, Lyme disease, ELISA, Immunoblotting (Western blotting)

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 3(2): 95-105, December, 1997]

[†] Corresponding author