

## Production of the Monoclonal Antibodies against *Bartonella henselae* Isolated from a Korean Patient

Se-Hee Kil and Jae-Seung Kang\*

Department of Microbiology, Inha University School of Medicine, Incheon, Korea

Bartonellosis is spotlighted recently as an emerging zoonosis and *Bartonella henselae* is reported to be the main infectious agent. In Korea, however, few studies have been made on the epidemiology and microbiology on bartonellosis. Thus, this study was conducted to produce a new monoclonal antibody that can be used for identifying *B. henselae*. In order to prepare monoclonal antibodies against *B. henselae*, we inoculated mice with the isolated strain from Korean patient and performed cell fusion experiment. The selected hybridoma clones produced monoclonal antibodies which showed positive immunofluorescence staining of bacteria and specific protein bands in western blot analysis. In order to examine whether these antibodies could be used for the identifying and quantifying *Bartonella*, we performed confocal microscopy and flow cytometry using the new antibodies. These monoclonal antibodies can be used as a useful tool in further researches on the biology of *Bartonella*.

**Key Words:** *Bartonella henselae*, Bartonellosis, Monoclonal antibody

### 서 론

최근 새롭게 인수공통전염병으로 주목 받고 있는 바르토넬라증(Bartonellosis)은 세계적으로 고양이 급히병(Cat-Scratch Disease)으로 가장 널리 알려져 있으며 *B. henselae*가 대표적인 원인균이다. 고양이에 기생하고 있는 벼룩이나 이 등의 매개체를 통해 고양이에서 사람으로 직접적으로 전파되는 질병으로 국소적 임파선비대증이나 불명열, 전신 불쾌감 등에서부터 뇌염, 신경염, 심내막염 등의 다양한 증상을 일으킬 수 있는 질병이다 (1, 2).

바르토넬라증은 1870년경에 페루의 안데스산맥을 리마에서 오로야까지 연결하는 철도공사 인부들에게서 처음

발병하여 알려졌다. 오로야열(Oroya fever)이라고 명명된 이 병에 약 7천명의 인부들이 감염되었고, 추후 그 원인균주가 *B. bacilliformis*임이 밝혀졌다 (3). 1885년 페루의 한 의과대학생이 자신의 몸 속에 *Bartonella*를 접종시킨 후 수 일만에 심한 빈혈로 사망하였는데 당시의 사망 원인이 오로야열이 주 원인이라고 기록되어 있다 (4). 1919년에는 *B. bacilliformis*가 동정되었고, *Bartonella*에 의한 질병은 남아메리카 지역에서만 존재하는 것으로 생각되어 왔다 (5, 6). 1983년 Stoler 등은 면역결핍증 환자에서 bacillary angiomatosis를 발견하였고 (7) 1990년 Slater 등은 원인균을 동정하였으며 (8) 이것이 *B. quintana*와 *B. henselae*로 명명되어졌다 (5, 9). *Bartonella* spp.는 원래는 Rickettsiae과 *Rochalimaea* 속에 속해 있었으나 Rickettsiae과에서 독립되었고, *Bartonella* 속과 *Grahamella* 속으로 구성된 Bartonellaceae 과로 분리되었다 (10).

*Bartonella*는 사람뿐만 아니라 개나 (11) 고양이 등 여러 동물에서도 존재하는 인수공통 전염병의 원인균이다. 고양이에서 *B. henselae*의 감염률에 대해서는 미국을 비롯한 유럽, 호주 등 다양한 국가에서 보고되고 있다 (12). 고양이 급히병은 미국에서는 한 해 평균 약 25,000건 이

Received: December 20, 2011/ Revised: February 7, 2012

Accepted: February 10, 2012

\*Corresponding author: Jae-Seung Kang, M.D. Department of Microbiology, Inha University School of Medicine, Incheon, 400-712, Korea.

Phone: +82-32-890-0952, Fax: +82-32-881-8559

e-mail: jaeskang@inha.ac.kr

\*\*This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2011-0005244).

상 발생하고 있으며, 그 중 약 2천명에 해당하는 사람들이 병원 치료를 받고 있다고 보고된 바 있다 (13). 주로 애완 동물과 접촉 기회가 많은 연령대인 어린 아이나 10대 청소년에서 주로 발생률이 높다고 알려져 있고 가을과 겨울에 집중적으로 발생한다 (14). 고양이에서 사람의 전파는 이전에는 벼룩이 사람을 물어서 전파된다고 여겨졌으나 (15) 최근에는 벼룩의 배설물 등이 고양이의 발톱을 통해 전파된다는 설이 유력하다 (16).

사람에서 바르토넬라증의 임상 증상은 감염된 사람의 면역력에 따라 다르게 나타난다. 면역력이 정상인 사람에서는 림프절이 부어오르는 림프절병증(lymphadenopathy)이 나타나며, 면역력이 저하된 사람에서는 전신성 혈관염의 일종인 세균성 혈관종증(bacillary angiomatosis)이 나타난다. 비특이적 증상으로 경도의 발열, 무기력, 두통, 식욕 부진 및 비장 종대 등의 증상이 나타나기도 한다 (1, 2).

바르토넬라증의 진단을 위해서는 혈청학적 검사와 중합효소연쇄반응검사가 가장 널리 사용되고 있다. 현재 *B. henselae* 감염을 혈청학적으로 진단하는 데는 간접형광 항체검사가 가장 널리 사용되고 있으며, 이 검사로는 *B. henselae*와 *B. quintana* 사이의 항원의 구조적 유사성 때문에 약 95%의 교차반응을 보인다. 바르토넬라 균의 배양은 일반적으로 수행되지 않고, 개나 고양이 등 환축에서 균 분리가 어려우므로 최근에는 중합효소연쇄반응검사로 균 감염을 확인하는 사례가 늘고 있는 추세이다. 중합효소연쇄반응검사를 위해서 바르토넬라 균의 유전자 중에서 가장 변이가 적은 부위인 16S나 23S ribosomal RNA를 증폭하는 방법이 가장 흔히 쓰이고 있다. 최근 중합효소연쇄반응검사 방법의 발전에 따라 최근 바르토넬라 감염의 발견이 큰 폭으로 증가하고 있다 (17). 국내에서는 원인균 분리에 관한 보고는 없지만, 2005년에 애완견을 키웠던 14세 남아에서 *B. henselae*를 간접면역형광법 및 중합효소연쇄반응검사로 확인한 사례가 있다 (18).

우리나라에서는 최근 경제, 문화적인 수준이 향상되면서 애완용 동물을 집에서 기르는 경우가 점차 늘어나고 있고, 특히 고양이와 함께 거주하는 사람들의 수가 늘어나고 있다. 국내에서 수 건의 바르토넬라 감염 환자에 대한 증례보고가 있으며 국내의 개나 고양이에서 균의 존재가 입증되었다. 그럼에도 불구하고 아직 국내에서는 이 균의 감염상태나 원인균에 대한 자세한 연구가 이루어진 적이 없어 이 세균에 대한 미생물학적 지식이 부족하다. 본 연구에서는 *B. henselae*의 항원 연구 및 진단을 위하

여, 국내에서 발생한 바르토넬라증 환자로부터 분리된 *B. henselae*에 반응하는 단세포균항체를 제작하고 이를 이용하여 *Bartonella* 감염에 대한 미생물학적 성상 연구를 수행하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### *Bartonella henselae*

인하대병원에 내원한 바르토넬라증 환자의 혈액에서 분리된 균주를 배양하여 사용하였다. 균 분리를 위하여 배양된 사람 혈관내피세포인 ECV304 세포주 단층에 균주를 접종하여 배양하고 간접면역형광항체검사를 통해 세균의 성장을 확인하였다. 균 종은 유전자 염기서열을 확인하여 동정하였으며, 16S RNA와 16S/23S rRNA intergenic spacer region의 염기서열이 모두 *B. henselae*와 가장 유사하였다.

### 세포 배양

*B. henselae* 균주를 배양하기 위하여 ECV304 세포를 56°C에서 30분간 비동화시킨 10% 우태아혈청(Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)이 포함된 M199 medium (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)으로 유지하고, *Bartonella*에 반응하는 단세포균항체를 제작하기 위하여 B cell myeloma cell인 P3x63Ag.V653 세포를 10% FBS가 포함된 RPMI medium (Gibco BRL)으로 37°C와 5% CO<sub>2</sub>를 유지하는 배양기에 배양하였다.

### 균주 배양

균주를 배양하기 위해 ECV304 세포를 56°C에서 30분간 가열하여 비동화시킨 우태아혈청이 10% 포함된 M199 medium으로 유지하여 균주를 ECV304 세포에 감염시키고 이를 세포 배양플라스크에 계대 배양하면서 유지하였다. 마우스를 면역할 항원을 확보하기 위해서는 ECV304 세포에서 성장한 균주를 혈액한천배지(Hanil Komed, Sungnam, Korea)에 도말하여 하얗고 둥근 형태의 집락이 형성될 때까지 배양하고 배양기는 37°C와 5% CO<sub>2</sub>를 유지하였다.

### 마우스 단세포균항체 제작

*Bartonella*에 반응하는 단세포균항체를 제작하기 위하여 균주를 혈액한천배지에서 대량 배양하여 균체를 확보한

후 암컷 BALB/c 마우스에 면역하였다. 면역은 균체를 75℃에서 1분간 가열하여 사멸시킨 후 마우스에 복강 내 주사하였다. 2주 후 동일 마우스에 면역을 다시 하고, 최종 면역 14일 후에 꼬리 정맥에 정맥 내 주사를 시행하였다. 3일 후 마우스의 비장을 채취하여 세포융합을 실시하였다. 비장에서 백혈구를 분리한 후 이를 B cell myeloma인 P3x63Ag.V653 세포와 섞어 Polyethylene Glycol 1500 (Roche, Nutley, NJ, USA)에 의해 세포융합을 시키고 HAT medium [DMEM, HAT media supplement 50X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)]을 가하여 배양하였다. 계속 분열하면서 항체를 생산하는 융합된 세포만을 찾아내기 위해 세포가 자라고 있는 상층액을 취하여 간접면역형광 항체검사를 시행하였다. 선택된 융합세포들은 각각의 번호를 지정해 큰 배양용기로 옮겨 HT medium [DMEM, HT media supplement 50X]을 가하여 세포 수를 증가시켜 배양하여 *Bartonella*에 반응하는 단세포군항체를 생산하는 세포를 제작하였다.

제작한 세포의 항체분자가 지닌 면역글로불린들의 항원결정기를 판별하기 위해 Pierce® Rapid ELISA mouse mAb isotyping kit (Pierce biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 면역글로불린의 class와 subclass, light chain의 판별을 하였다. 항 마우스 heavy-chain 항체인 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgA, IgM, 항 마우스 light-chain인 kappa, lambda가 각각 코팅되어 있는 ELISA strip-8 well plate에 희석한 시료를 각각의 well에 50 µl씩 넣고 Goat Anti-Mouse IgG + IgA + IgM HRP Conjugate를 모든 well에 50 µl씩 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 인산완충 식염수로 3번 세척하고 기질용액을 첨가하여 발색반응을 일으킨 후 분광계로 450 nm 파장에서 측정하였다.

#### 간접면역형광항체검사

배양된 ECV304 세포에서의 세균 성장 확인을 위한 간접면역형광항체검사는 *Bartonella* IFA IgG test kit (Focus Diagnostics, France)에 포함된 anti-*Bartonella* antiserum을 양성 대조 혈청을 사용하여 세균의 증식을 확인하였다. 혈액을 접종하고 배양된 ECV304 세포의 단층을 일부 긁어내어 유리 스팟 슬라이드에 도말한 후 아세톤과 메탄올을 동량 혼합한 고정액에 넣어주고 4℃에서 10분간 놓아두었다. *Bartonella* IFA IgG 측정 kit에 포함된 양성 대조 혈청을 일차항체로 사용하여 37℃에서 30분간 반응시켰다. 그 후 Tween 20이 0.1%가 되게 들어간 인산완충

식염수로 3회 세척 후 이차항체인 Fluorescein (FITC)-conjugated affiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA, USA)를 Tween 20이 0.1%가 되게 들어간 인산완충식염수에 1:100으로 희석하여 가하고 37℃에서 30분간 반응시켰다. 다시 인산완충식염수로 3회 세척하고 Evans blue 용액(30 µg/ml)으로 세포를 대조 염색한 후 유리 슬라이드에 anti-faint mounting media를 얹고 항체를 붙여놓은 커버슬립을 부착시켜서 형광현미경으로 감염 및 증식 양상을 관찰하였다.

#### Western blot analysis

세포를 모은 뒤 인산완충식염수로 두 번 세척한 다음 protease inhibitor [1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mg/ml Leupeptin, 10 mg/ml Pepstatin A, 2 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride)]를 포함한 lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate), 2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)]를 넣고 부유했다. 얼음에 30분 보관 후 15,000 rpm 4℃에서 30분간 원심분리한 뒤, 상층액만 회수하였다. 단백질 농도는 BCA solution (Sigma-Aldrich)과 cooper (II) sulfate (Sigma-Aldrich)를 50:1로 섞어서 사용하고 microwave plate reader를 이용하여 562 nm에서 측정하였다. 단백질을 정량 후 2X SDS sample buffer [100 mM Tris, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, 70 mM β-mercaptoethanol]로 추출 단백질과 같은 부피로 넣어 혼합하고 95℃에서 5분간 가열한 후 표지 단백질과 함께 12% SDS-PAGE에 15 µg씩 가하고 110 V로 1시간 30분간 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝나면 polyvinylidene difluoride membrane (ImmobilonP, Millipore Co., Bedford, MA, USA)에 적정 전압을 가하여 전사한 뒤 Tween 20이 0.1%가 되게 들어간 인산완충식염수로 5% 탈지분유로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 일차 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 인산완충식염수를 사용하여 5분간 3번씩 세척하였다. 이차항체로는 horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse IgG (Jackson Laboratories)로 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 인산완충식염수로 5분간 3번씩 세척하였다. 기질용액에 polyvinylidene difluoride membrane을 1분간 반응시키고 X-ray 필름에 일정시간 노출시켜 현상한 후 단백질의 특이적 반응을 관찰하였다.

### 공초점현미경(Confocal microscopy)

감염시킨 ECV304 세포에서 균주의 증식을 확인하기 위하여 배양용기에서 떨어져 나온 세포를 24 well 배양 접시에 0.01% Poly-L-lysine (Sigma-Aldrich)이 처리된 지름 13 mm의 커버슬립을 넣고 여기에 ECV304 세포를 well 당  $1 \times 10^5$ 개가 되도록 넣어 주었다. 다음 날 *B. henselae*를 감염시킨 후 정해진 시간마다 유리 커버슬립을 걷어서 인산완충식염수로 3회 세척 후 아세톤과 메탄올을 동량 혼합한 고정액에 4°C에서 10분간 놓아두었다. 인산완충식염수로 3회 세척 후 *B. henselae*의 단백질 항원에 특이적으로 반응하는 단세포균항체인 일차항체를 사용하여 37°C에서 30분간 반응시킨다. 그 후 Tween 20이 0.1%가 되게 들어간 인산완충식염수로 3회 세척 후 이차항체인 Fluorescein (FITC)-conjugated affiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Laboratories)를 인산완충식염수에 1:100으로 희석하여 가하고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 다시 인산완충식염수로 3회 세척하고 Evans blue 용액(30 µg/ml)으로 세포를 대조 염색한 후 유리 슬라이드에 anti-faint mounting media를 얹고 항체를 붙여놓은 커버슬립을 부착시켜서 laser scanning confocal microscope (LSM 510 META, Carl Zeiss, Germany)로 관찰하였다.

### 유세포 분석법(Flow cytometry assay)

ECV304 세포에 *B. henselae*를 감염시킨 후 정해진 시간마다 세포를 트립신으로 처리한 후 인산완충식염수로 세척하고 1,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 회수하였다. 얼음 위에서 70% 에탄올로 1시간 동안 고정한 후 유세포 분석 전까지 -20°C에서 보관하였다. 유세포 분석을 위하여 일차항체를 실온에서 1시간 동안 반응시키고 인산완충식염수로 세척 후, 이차항체인 fluorescein (FITC)-conjugated affiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson Laboratories)를 인산완충식염수에 1:100으로 희석하여 가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 인산완충식염수로 세척 후 Flow cytometer (FACS Calibur, BD Biosciences, Heidelberg, Germany)로 측정하였다.

## 결 과

### 마우스 단세포균항체 제작

*Bartonella*에 반응하는 단세포균항체를 제작하기 위하여,

국내 환자에서 분리된 *Bartonella henselae* 균주를 혈액한천배지에서 대량 배양하여, 균체를 확보한 후 *Bartonella* 균체를 가열하여 사멸시킨 후 이를 마우스에 면역하여 세포융합을 실시하였다. 배양 4일 후 2~3일 간격으로 HAT media를 50 µl씩 가하여 배양한지 7일 후 거의 70%의 well에서 융합세포주의 콜로니가 보이기 시작하였다. 배양 12일 후 콜로니가 점차 커져서 well 바닥의 30~50% 정도를 덮으면 광학현미경으로 세포의 상태를 조사하여 임의로 50종의 융합세포를 선별해 배양액의 상층액을 취하여 항체가 존재하는지 여부를 간접면역형광항체법으로 검사하였다. 검사 결과 50종의 융합세포 중에서 38종의 세포가 양성반응을 나타내었고 12종의 세포가 음성반응을 나타내었다. 양성반응을 나타낸 38종의 세포를 한 종류의 항체만을 만드는 순수한 세포주를 얻기 위해서 각각의 세포를 희석해서 다시 클로닝을 시행하였다. 클로닝 작업을 2회 반복하여 배양된 단일 콜로니를 형성하는 세포주를 28종을 선별해 배양하였다. 배양액은 항체 분비를 확인하기 위하여 간접면역형광항체검사를 시행하였다. *B. henselae*의 항원으로는 *Bartonella* IFA IgG 측정 kit에 포함된 균주 슬라이드를 사용하였고, 음성 대조 항원으로는 ECV304 세포와 *Orientia tsutsugamushi* 균주를 사용하였다. 간접면역형광항체검사를 시행한 결과 28종의 세포 중에서 4종의 세포를 제외한 세포주에서 *B. henselae*의 특이적인 균의 형태의 형광을 나타내는 단세포균항체의 분비를 확인하였으며, 음성 대조 항원에서는 모두 음성반응을 나타내었다(Fig. 1). 제작한 융합세포주가 분비하는 항체의 아형을 검사한 결과 IgG<sub>2a</sub> 6개, IgG<sub>2b</sub> 1개, IgG<sub>3</sub> 12개, IgM 2개가 나왔으며, light chain은 Kappa 20개, Lambda 1개가 융합세포주에서 분비되었다.

### Western blot assay에서 단세포균항체의 반응 양상

선별된 단세포균항체를 분비하는 24종의 세포를 면역학적 검사를 위한 Western blotting 결과 14, 18, 19번의 세포주를 제외한 20종의 세포에서 약 22 KDa 크기의 단백질 띠를 확인할 수 있었고, 단 1종의 세포주의 항체만이 좀더 큰 단백질에 반응하였다. 각각의 단백질 띠의 반응 정도는 항체에 따라 달랐으며 그 중 1~4번의 세포주의 항체가 강한 반응성을 보였다(Fig. 2).

### 형광염색에서 단세포균항체의 반응 양상

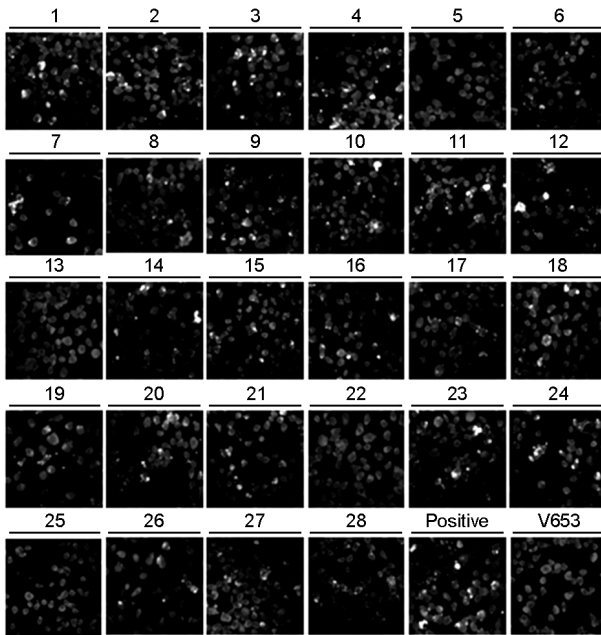
형광 염색에서 단세포균항체의 반응 양상을 보기 위해

ECV304 세포에 *B. henselae*의 균주를 감염시킨 후, 1시간, 3시간, 6시간, 24시간대에 1번 세포주의 항체를 일차항체로 사용하여 간접면역형광항체 염색을 하고 공초점현미경을 이용하여 확인하였다. 실험 결과 감염시간이 지날수록 세포 외에 산발적으로 흩어져 있던 균주가 점점 세포

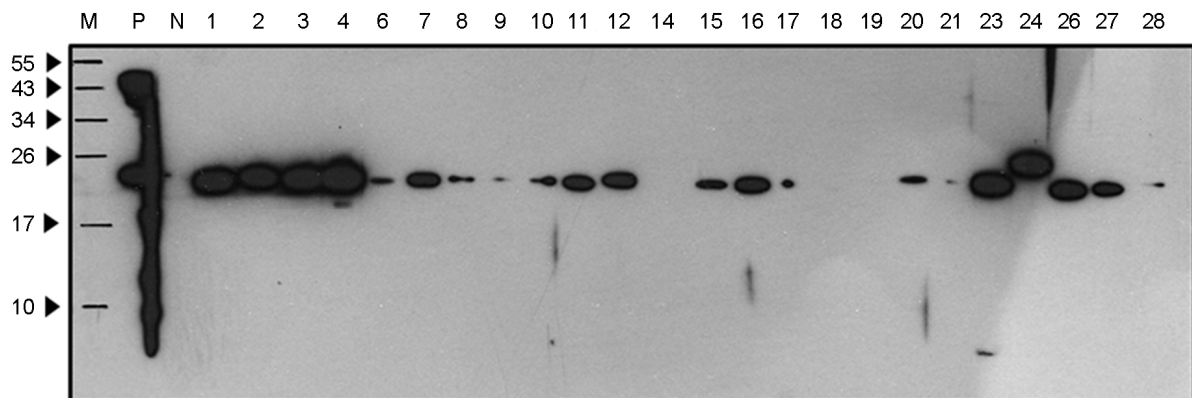
질 쪽으로 이동하여 어느 정도 세포질에 붙어있고, 감염 시간이 길어질수록 핵으로 이동하기 시작하여 감염 24시간 후에는 거의 다 핵으로 이동하여, 세포 내로 세균이 침투하고 이동하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

#### 유세포 분석에서 단세포균항체의 반응 양상

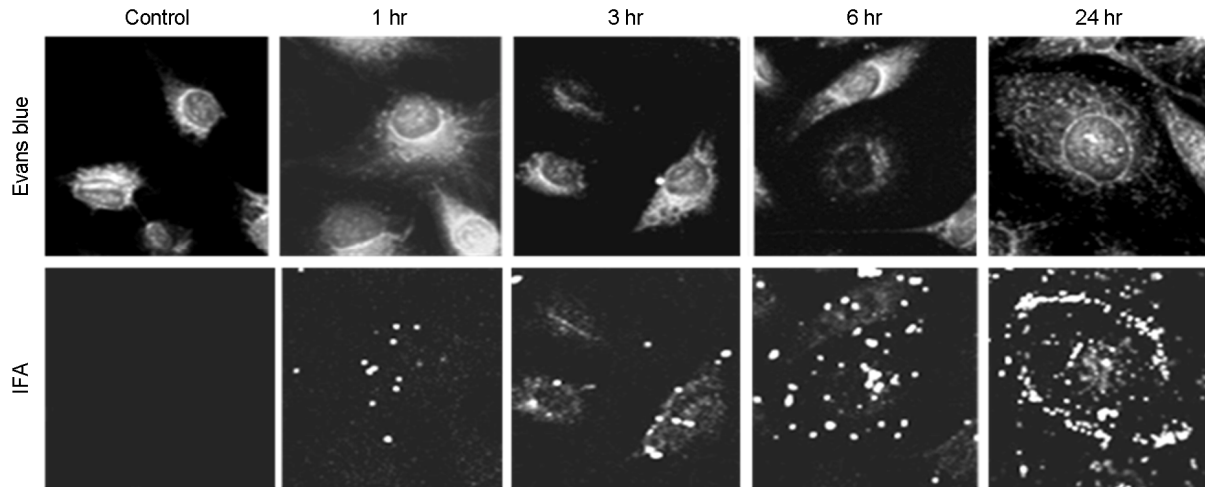
생산된 항체가 세포 내에 감염된 세포의 *B. henselae*의 양을 측정하는데 이용할 수 있는지를 알기 위하여 유세포 분석법을 시행하였다. ECV 304 세포에 *B. henselae*를 1시간, 3시간, 6시간, 24시간별로 감염시켜 1번 세포주의 항체를 일차항체로 사용하여 시간대 별로 감염이 노출된 정도에 따라 감염율을 객관적으로 표현하였다. *B. henselae*를 감염시키지 않은 ECV 304 세포를 기준으로 1시간, 3시간, 6시간, 24시간별로 감염시킨 세포의 결과 감염시간이 길어질수록 점차 최고점이 우측으로 이동하며, 양성 세포의 퍼센트가 각각 0.44%, 0.77%, 8.3%, 23.7%, 28.1%로 증가함을 보이고 있다(Fig. 4). 감염된 전체 균 수를 반영하는 성장 지수(growth index)를 구하기 위해 형광이 양성인 세포 수(Infected cell, %)에 평균 형광 정도(mean fluorescence intensity)를 곱하여 표현하였다. *B. henselae*를 24시간 동안 감염이 되었을 경우의 성장 지수를 100으로 하였을 때, 1시간 감염시켰을 때는 0.77을 나타내었다. 그리고 6시간 감염 시에는 62.84로 성장 지수가 증가함을 보였다.



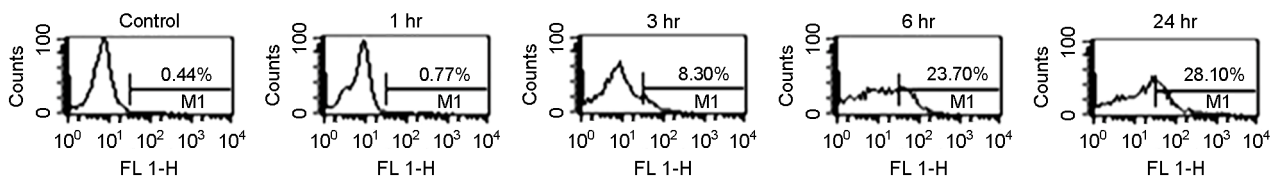
**Figure 1.** The immunofluorescence antibody test of hybridoma clones secreting the monoclonal antibodies against *Bartonella*. Culture supernatant of hybridoma clones were tested for their reactivity against *B. henselae* that was included in the commercial antibody test kit.



**Figure 2.** Western blot analysis of the 24 hybridoma clones secreting the monoclonal antibodies against *Bartonella*. The Korean isolate of *B. henselae* was grown in blood agar plate and harvested. After separation by SDS-PAGE, the antigenic bands were transferred to polyvinylidene difluoride membrane and cut into small strips. Each strip was analyzed using the supernatants of the hybridoma clones as a primary antibody. M, Protein size marker; P, positive control (*B. henselae* infected mouse serum); N, negative control (supernatant of the V653 cell cultured media); lane 1~28, the culture supernatants of each hybridoma clones.



**Figure 3.** The reactivity of a monoclonal antibody against ECV 304 cells infected with *B. henselae* was examined with the confocal microscope. The culture supernatant of a selected hybridoma clone (#1) was used as a primary antibody and the results were analyzed using the confocal laser scanning microscopy at the indicated times (0, 1, 3, 6 and 24 h after infection). ECV cell bodies were stained with Evans blue and bacterial cells were stained with IFA.



**Figure 4.** The reactivity of a monoclonal antibody against ECV 304 cells infected with *B. henselae* was examined with flow cytometry. The culture supernatant of a selected hybridoma clone (#1) was used as a primary antibody and the results were analyzed using the flow cytometer at the indicated times (0, 1, 3, 6 and 24 h after infection). The percentages of positive cells (M1) were indicated at each figure.

## 고 찰

국내에서는 수 건의 *Bartonella* 감염 환자에 대한 증례 보고가 있었고 국내의 개나 고양이에서 균의 존재가 입증되었음에도 불구하고, 아직 국내에서는 이 균의 감염 실태나 원인균에 대한 연구가 이루어진 적이 없어 이 세균에 대한 미생물학적 지식이 부족하다. 본 연구에서는 국내의 환자로부터 분리된 *B. henselae*에 반응하는 단세포균항체를 제작하고 이를 *Bartonella* 감염에 대한 미생물학적 연구에 이용하고자 하였다.

항체제작을 위하여 마우스에 사균을 면역하고 세포 융합을 수행한 결과 융합세포주 중에서 *B. henselae*에 반응하는 단세포균항체를 분비하는 21종의 세포주를 Western blotting analysis와 간접면역형광항체로 확인하였다. *Bartonella*에 반응하는 단세포균항체의 반응 양상과

특성을 확인하기 위하여 *B. henselae*를 ECV304 세포에 감염시키고 항체를 생산하는 세포의 상층액을 일차항체로 사용하여 연구를 수행하였다. 유세포 분석법과 공초점현미경을 이용하여 *B. henselae*가 시간이 경과함에 따라 ECV304 세포로 세균이 침투하여 감염된 균주의 세포 내 축적이 증가되며 감염율이 증가됨을 확인할 수 있었다.

*Bartonella* 균종에 대한 항원 연구 및 진단을 위해서는 이 균을 동정하고 확인할 수 있는 항체의 확보가 필수적이다. 이런 항체는 Western blot assay에서 단백질 띠의 확인, 배양된 균의 형광항체 염색, 환자 조직에서의 면역조직 화학염색 등 의심 환자를 확진하기 위한 실험적 진단 방법에 필수적인 시약이다. 아직 국내에서는 이런 유용한 항체의 생산이 시도된 적이 없으므로 이번 연구에서 생산한 단세포균항체는 다양한 미생물학적 연구를 수행하기에 유용한 항체라 사료된다. 그러나 이번 연구에서 Western blot assay의 결과 *B. henselae*에 반응하는 단백질

의 크기가 약 22~26 kDa으로 확인이 되었지만 기존 보고된 연구 결과에 따르면 *B. henselae*에 반응하는 항체에 대한 단백질의 크기가 35, 44, 48, 67, 90 kDa으로 주된 면역 단백질의 크기가 다르게 보고되어 있다 (19). 이런 연구 결과는 *B. henselae*에 감염된 고양이의 검체를 대상으로 항원을 연구하였고, 본 연구에서는 사멸시킨 균체를 마우스에 면역을 하여 항원을 연구하였다. 그러므로 감염된 동물의 차이나 면역 방법이나 기간 등의 차이가 이런 차이점을 나타낼 수도 있으며, 다른 가능성으로는 이 항원이 국내에서 유행하는 *B. henselae*의 또 다른 특이 항원일 수도 있다고 생각한다. 이런 가능성을 확인하기 위하여 추후 다른 연구를 통하여 추가 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

국내에는 아직 *Bartonella* 세균의 진단에 필요한 검사 방법이 확립되어 있지 않으므로, 본 연구를 통하여 제작된 단세포균항체는 국내에서 유행하는 *Bartonella*의 생물학적 특성을 파악하고, 바르토넬라증의 진단과 치료에 중요한 기본 자료를 수집하는데 도움이 될 수 있으리라 기대한다.

## 참 고 문 헌

- Chomel BB, Abbott RC, Kasten RW, Floyd-Hawkins KA, Kass PH, Glaser CA, et al. *Bartonella henselae* prevalence in domestic cats in California: risk factors and association between bacteremia and antibody titers. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2445-50.
- Kordic JE, Glaser CA, Tappero JW. *Rhochalimaea henselae* infection. A new zoonosis with the domestic cat as reservoir. *JAMA* 1994;271:531-5.
- Garcia-Caceres U, Garcia FU. Bartonellosis, An immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrión. *Am J Clin Pathol* 1991;95:S58-66.
- Schultz MG. Daniel Carrión's experiment. *N Engl J Med* 1968;278:1323-6.
- Ihler GM. *Bartonella bacilliformis*: dangerous pathogen slowly emerging from deep background. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 144:1-11.
- Bass JW, Vincent JM, Person DA. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: II. Cat-scratch disease. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:163-79.
- Stoler MH, Bonfiglio TA, Steigbigel RT, Pereira M. An atypical subcutaneous infection associated with acquired immune deficiency syndrome. *Am J Clin Pathol* 1983;80:714-8.
- Slater LN, Welch DF, Hensel D, Coody DW. A newly recognized fastidious gram-negative pathogen as a cause of fever and bacteremia. *N Engl J Med* 1990;323:1587-93.
- Welch DF, Pickett DA, Slater LN, Steigerwalt AG, Brenner DJ. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis. *J Clin Microbiol* 1992;30:275-80.
- Birtles RJ, Harrison TG, Saunders NA, Molyneux DH. Proposals to unify the genera *Grahamella* and *Bartonella*, with descriptions of *Bartonella talpae* comb. nov., *Bartonella peromysci* comb. nov., and three new species, *Bartonella grahamii* sp. nov., *Bartonella taylorii* sp. nov., and *Bartonella doshiae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45:1-8.
- Tsukahara M, Tsuneoka H, Iino H, Ohno K, Murano I. *Bartonella henselae* infection from a dog. *Lancet* 1998;352: 1682.
- Bass JW, Vincent JM, Person DA. The expanding spectrum of *Bartonella* infections: I. Bartonellosis and trench fever. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:2-10.
- Jackson LA, Perkins BA, Wenger JD. Cat scratch disease in the United States: an analysis of three national databases. *Am J Public Health* 1993;83:1707-11.
- Carithers HA. Cat-scratch disease. An overview based on a study of 1,200 patients. *Am J Dis Child* 1985;139:1124-33.
- Maurin M, Raoult D. *Bartonella* infections: Diagnostic and management issues. *Curr Opin Infect Dis* 1998;11:189-93.
- Finkelstein JL, Brown TP, O'Reilly KL, Wedincamp J Jr, Foil LD. Studies on the growth of *Bartonella henselae* in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J Med Entomol* 2002;39:915-9.
- Agan BK, Dolan MJ. Laboratory diagnosis of *Bartonella* infections. *Clin Lab Med* 2002;22:937-62.
- Chung JY, Koo JW, Kim SW, Yoo YS, Han TH, Lim SJ. A case of cat scratch disease confirmed by polymerase chain reaction for *Bartonella henselae* DNA. *Korean J Pediatr* 2005; 48:789-92.
- Chenoweth MR, Greene CE, Krause DC, Gherardini FC. Predominant outer membrane antigens of *Bartonella henselae*. *Infect Immun* 2004;72:3097-105.