

計畫編號：DOH92-DC-1003

行政院衛生署疾病管制局九十二年度科技研究發展計畫

台灣關節炎與萊姆病之關係

研究報告

執行機構：中山醫學大學免疫學研究所

計畫主持人：蔡嘉哲

研究人員：蔡嘉哲

執行期間： 92年1月1日至 92年12月30日

本研究報告僅供參考，不代表衛生署疾病管制局意見

目錄

	頁碼
中文摘要	(3)
英文摘要	(4)
一、前言	(5)
1-1 萊姆病簡介	(5)
1-2 伯氏疏螺旋菌體簡介	(7)
1-3 萊姆病之診斷標準	(7)
1-4 研究目的	(9)
二、材料與方法	(10)
2-1 血清來源	(10)
2-2 抗核抗體間接免疫螢光法	(10)
2-3 萊姆病疏螺旋菌體來源與培養	(11)
2-4 製備抗原	(11)
2-5 聚丙醯胺凝膠電泳法	(13)
2-6 蛋白質定量	(15)
三、實驗結果	(16)
四、討論	(21)

中文摘要

萊姆病是一種由節肢動物媒介傳播致病菌疏螺旋菌所造成的疾病，在台灣流行情況並不清楚，目前在台灣發現的萊姆病大多以皮膚病表現居多，而大部分萊姆病會合併關節炎，因此，我們從不同關節炎疾病研究與萊姆病之相關性。在臨床上的萊姆病診斷目前主要以血清學方法確認，我們收集各種不同關節炎病人血清，包括類風濕性關節炎和僵直性脊椎炎，及其他自體免疫疾病病人血清，包括紅斑性狼瘡和修格連式症候群，正常人及萊姆病陽性病人血清，利用 *B. burgdorferi sensu stricto* (strains B 31) 為抗原，以西方墨點法(Western Blot)了解抗體產生情形。我們以不同萃取方式，如 Lysis buffer A、高壓細胞破碎機、超音波震碎機和 sample buffer lysis 取得抗原(*B. burgdorferi sensu stricto* (strains B 31))，進一步利用西方墨點法分析萊姆病和其他疾病之相關性。經由我們的實驗結果發現，利用超音波震碎機取的部分菌體抗原是最佳的萃取方法。以西方墨點法分析萊姆病和皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人，對照其他自體免疫疾病和關節炎疾病，結果發現 84kDa、66kDa、39kDa、45kDa、34kDa 和 31kDa 是較具特異性的蛋白。我們進一步分析所產生的 IgM 和 IgG 特異性抗體的反應頻率結果發現：在 IgM 反應中，84kDa、39kDa、66kDa、34kD 和 31kDa 是具有特異性的蛋白；在 IgG 反應中，84kDa、45kDa、34kDa、31kDa 和 30kDa 為具特異性的蛋白。

英文摘要

Lyme disease is a multi-systemic disease caused by the spirochete *Borrelia burgdorferi* and transmitted by ticks. The patients with Lyme disease in Taiwan present erythema chronicum migrans. The epidemiology of Lyme disease in Taiwan is not clear. Some of the patients with Lyme disease present arthritis. Therefore, we want to study the relationship of Lyme disease and other autoimmune diseases. At present the diagnosis of Lyme disease is based on a positive immunoserologic test. We used different methods to prepare antigen from *B. burgdorferi* sensu stricto strain B31 for serological test including sample buffer lysis, Buffer A lysis, sonication and Tight-fitting glass. Based on our study, the partially purified antigen from sonicated spirochetes is better than other methods. We examined sera from 4 patients with Lyme disease, and 24 patients with erythema migrans ; 91 patients with Rheumatoid arthritis ; 48 patients ankylosign spondylitis ; 36 patients from SLE and 45 patients from Sjören's syndrome by western blot. As in our study, the 84kDa, 66kDa, 39kDa, 45kDa, 34kDa and 31kDa proteins is more specific in patients with Lyme disease. The most prominent IgM response in patients with Lyme disease in Taiwan was to 84kDa, 39kDa, 66kDa, 34kDa and 31kDa proteins and they are more specific than other diseases. The most prominent IgG response in patients with Lyme disease in Taiwan was to 84kDa, 45kDa, 34kDa, 31kDa and 30kDa proteins and they are more specific than other diseases.

一、前言

1-1 萊姆病簡介

萊姆病(Lyme disease)是一種經由蜱傳播致病菌伯氏疏螺旋體(*Borrelia burgdorferi sensu lato*)所造成的一種人畜共通傳染病，會引起人類多系統病變，症狀包括皮膚、關節、內臟器官、心血管、神經等多部位的病變，以野生啮齒類及哺乳類動物為主要之儲菌宿主(reservoir host) [1]。萊姆病早在1975年出現於美國康乃狄克州，許多小朋友出現原因不明的幼年型類風濕性關節炎，直到1982年才檢出病原菌，依Old Lyme鎮而命名為萊姆病(Lyme disease) [2]。

根據既往文獻記載顯示萊姆病疏螺旋體菌株基因種及地域分佈不同與感染人類後所表現的臨床表徵有著極大的關聯性，可因此作為致病螺旋體之流行病學指標。目前主要感染人類的致病菌株有三種基因種株：*B. burgdorferi sensu stricto* (s.s.)、*B. garnii* 和 *B. afzelii* [2]。據文獻記載顯示北美和西歐所分佈之基因種株以 *B. burgdorferi sensu stricto* 為主；*B. afzelii* 種主要分布在歐洲西部和中部地區，而 *B. farinii* 則主要分布在歐洲及北亞 [3]。而台灣地區由本土啮齒類動物所分離出之萊姆病疏螺旋體菌株為 *B. burgdorferi sensu stricto* [4]。人類萊姆病迄今幾乎已傳播全世界，在美國1999年共有16,000病例，發生率為6.0/10萬，以西海岸最多其次是東南各州 [3]。

萊姆病是一種全身性多系統性疾病，可依據所造成的症狀分為三個時期，有些病患3個時期的症狀會先後出現，而有些病患會重複出現或只出現其中1個或2個時期的症狀 [5]。

第一期為早期感染期，發生在人被病媒蜱叮咬感染後數天到數個星期，典型的症狀為被病媒蜱叮咬處出現皮膚紅疹 (skin rash)，隨後三到四週因螺旋菌增殖而逐漸擴散形成一片直徑大於五公分之慢性游走性紅斑 (erythema chronicum migrans, ECM)，游走性紅斑會在擴散後自行痊癒，而不會特別的感到疼痛。其他症狀類似感冒產生頭痛、輕微發燒、全身疲勞、寒顫、肌肉關節疼痛等[1,3]。

第二個時期為螺旋體經血液擴散時期，發生於人被病媒蜱叮咬數天或數星期後，病原體由人體內的淋巴結、血液擴散至其他器官如腦、關節、心臟、肝臟、脾臟及腎臟等，此時期的症狀包括頭痛、頸部僵硬、肌肉酸痛及身體疲勞、腦膜炎及心肌衰弱、關節炎等[1,3]，關節炎可能是單關節，不對稱的少數關節或游走性的關節炎，因此，在診斷上容易被誤診為其他關節炎疾病，有些病例可能仍會出現持續性的遊走性紅斑[1,3]。

第三個時期為持續感染期，發生在被病媒蜱叮咬後數個月至數年後，此時期的症狀會因不同基因種的螺旋體而有所不同，症狀包括了慢性關節炎、慢性萎縮性四肢皮炎及其他神經方面的疾病，若未經治療可能會引起關節炎、心臟炎、神經炎、顏面神經麻痺等症狀[3]。慢性關節炎可持續約數年之久，並且期間會伴有約數個月之久的關節腫大現象，尤其是膝關節機率最高。慢性的萊姆病關節炎有些是間歇性的，大約只有 10%經過抗生素治療的病患會進入第三階段的慢性感染[6]，這些患者的 HLA-DR4 陽性率高於一般群體，可能與人類細胞抗原有相關，這些分子擬態也許和萊姆病關節炎有關係[7]。

1-2 伯氏疏螺旋菌體簡介

萊姆病的致病菌株伯氏疏螺旋體 (*Borrelia burgdorferi sensu lato*) 屬於螺旋菌屬，為革蘭氏陰性微需氧菌，菌體之平均值徑和長度分別約為 $0.2\mu\text{m}$ 及 $10\text{-}30\mu\text{m}$ ，呈長螺旋型態，可體外培養於特殊的 BSK-H 培養基中，控制溫度在 $33\text{-}36^{\circ}\text{C}$ 且含 5% 二氧化碳濃度之生長環境。在螺旋菌體細胞壁和外膜間具有多條鞭毛以協助進行螺旋狀運動[2]。在菌體表面、外膜和細胞質具有多種能引起免疫反應的抗原，包括脂質、蛋白質、脂蛋白和醣類，這些抗原可用來作為血清免疫學的診斷標準，目前文獻中曾經探討過的重要抗原，主要為體表蛋白抗原 (outer surface protein; osp) 包括 ospA、B、C、D、E、F 和 G，41-kDa 鞭毛蛋白抗原及 58、66、66-73kDa 等多種熱休克蛋白 (heat shock protein)，其他還包括有 22、39、45、55 和 93kDa 蛋白 [2,8,9,10,11]。

萊姆病患者最早可測得的抗體是對抗 41kDa 鞭毛抗原的 IgM 抗體，通常在被蜱叮咬後 2~5 週可被測得，然後經過 2~3 個月後，專一抗體 IgM 會消失。感染 2~3 個後，抗體 IgG 開始逐漸增加；最早出現的 IgG 也是對抗鞭毛抗原的抗體；不過這些抗體無法阻止疾病的進展。[2]

1-3 萊姆病之診斷標準

目前萊姆病的診斷標準主要依據美國疾病管制局所公佈的建議標準 [1]，須包括下列兩項，第一是需經由醫師診斷病人出現游走性紅斑 (Erythema migrans)，即是在數天至數週後，紅疹逐漸漫延形成皮膚出現大

於五公分以上之慢性游走性紅疹，此紅疹呈現外圈紅而中間泛白或膚色之表徵。第二是需包括下列四項分別為臨床表徵和實驗室證據中至少其中一項成立，證明曾經受到感染。臨床表徵方面為出現神經系統、心臟血管系統或骨骼肌肉系統出現症狀。但由於臨床上部分病人不會出現早期的臨床症狀表現或是難以被診斷而容易和其他的疾病混淆，因此，大部分是依實驗室證明確立診斷[1]。

實驗室證明可以透過由萊姆病病人組織和體液中在特殊培養基中培養出螺旋菌體或經由血清學檢查兩種方式進行。由於直接由病人皮膚組織、血液、血清、腦脊髓液或關節液分離螺旋菌體費時又極為困難，因此臨床上現行主要為血清抗體檢驗，可利用間接螢光抗體免疫試驗（IFA）或酵素連結免疫分析法（ELISA）作初步檢查，再以西方墨點法（Western blot）進行確認。目前的診斷標準為 IgM 西方墨點法（western blot）3 個抗原包括：23-kDa、39-kDa、41-kDa 中出現 2 個抗原色帶為陽性；IgG 西方墨點法（western blot）為 10 個抗原包括：18-kDa、23-kDa、28-kDa、30-kDa、39-kDa、41-kDa、45-kDa、58-kDa、66-kDa 和 93-kDa 中出現 5 個抗原色帶為陽性。

[14]

1-4 研究目的

目前關於血清學檢查有許多困難產生，例如在文獻中指出血清學的免疫反應會受到其他疾病或因其他疾病產生抗體的影響，而對於螺旋體菌體抗原產生交叉反應，或當患者出現關節病變時，抗體的效價達到最高值，此後數年內都仍可測得，若患者在疾病初期及給予抗生素治療，可能會干擾抗體製造，而減低抗體效價[15]。雖然如此，相較於其他的方式，目前血清學檢測仍然是重要的診斷依據。但是，由於目前診斷的標準需考慮太多的免疫反應色帶，是否有專一性較高的抗原可代表來加以區分，以及關節炎患者中是否有萊姆病的患者，是我們想要加以區分及研究的主要原因。

因此，我們收集各種不同關節炎病人血清，包括類風濕性關節炎，僵直性脊椎炎，及其他自體免疫疾病病人血清，包括紅斑性狼瘡，修格連式症候群，和正常人及萊姆病病人血清(陰性及陽性對照組)，利用 *B. burgdorferi sensu stricto* strains B 31) 為抗原，以西方墨點法(Western Blot) 加以分析了解抗體產生情形。經由取得抗原(*B. burgdorferi sensu stricto* strains B 31)，進一步利用西方墨點法分析萊姆病和其他各類型疾病出現之特別血清免疫反應，希望藉此能幫助快速確定診斷萊姆病及關節炎之關係。

二、 材料與方法

2-1 血清來源

由台北市中山醫院皮膚科盧金坊醫師提供診斷為游走性紅斑疑似萊姆病陽性血清 24 位；行政院衛生署疾病管制局檢驗研究組提供萊姆病陽性及疑似陽性 4 位；台中市中山醫學大學附設醫院求診病患血清共 220 位，包括類風濕性關節炎 91 位、紅斑性狼瘡病人 36 位、僵直性脊椎炎病人共 48 位和修格連是症候群病人 45 位，以及梅毒檢測陽性者 8 位。另外以正常血清抗核抗體 (ANA) 檢測為陰性者之 76 位為健康捐血者，作為陰性對照組抗核抗體 (ANA) 檢測陰性作為陰性對照組，血清保存於 -70°C ，以進行各項實驗。

2-2 抗核抗體間接免疫螢光法 (ANA Indirect Immunofluorescence)

將血清以 PBS 稀釋八十倍，取稀釋後的血清 $50\mu\text{l}$ 加至一已黏附 Hep-2000 Fluorescent ANA-Ro Cell (Human Laryngeal carcinoma cell, ImmunoConcepts) 之玻片上，於潮濕箱中室溫反應 40 分鐘，之後以 PBS 沖洗並將其浸入 PBS 溶液中清洗 10 分鐘，取出玻片擦拭細胞外多餘的 PBS。接著加入一滴標幟 FITC (FITC; Fluorescein isothiocyanate conjugated secondary antibody) 螢光的山羊抗人類 Ig-G 抗體 (FITC conjugated goat anti-human IgG; ImmunoConcepts) 置於潮濕箱中室溫暗處反應 30 分鐘，

以 PBS 沖洗再浸入 PBS 溶液中清洗 10 分鐘，接著放入含 1~2 滴 EVEN BLUE（背景染色）之 PBS 溶液中，輕輕搖晃 10 分鐘後，用甘油（munting oil）封片，以螢光顯微鏡觀察之。

2-3 萊姆病疏螺旋菌體來源與培養

本實驗室所使用之萊姆病疏螺旋體菌株為美國 ATCC 標準菌株 *Borrelia burgdorferi sensu stricto* strain B31，由國防醫學院寄生蟲及熱帶醫學科師健民教授所提供。培養於特殊螺旋菌體生長培養基（BSK-H medium, Sigma Co., U.S.A）添加 6% 兔子血清（Rabbit serum, Sigma Co., U.S.A），以無菌操作方式取約含 5×10^5 螺旋菌數之菌液進行接種，置於二氧化碳細胞培養箱內，在溫控 34°C 及 5% 之二氧化碳濃度下，每 5~7 天進行繼代培養一次。接種後每隔三天取菌液於細胞計數玻片上（Petroff-Hausser counting chamber, U.S.A），於 400 倍暗視野顯微鏡或相位差顯微鏡下進行菌體計數觀察。

2-4 利用不同方法製備 *Borrelia burgdorferi sensu stricto* strain B31

菌體抗原

(1) 收集伯氏疏螺旋菌

培養並收集 500ml 螺旋菌至生長密度達 2×10^8 cell/ml 之螺旋體菌液，高速離心 10,000 rpm 10 分鐘，收集沉澱物，以 10 ml 無菌 PBS 潤洗 2 次及

離心後，保存至-20°C 冰箱備用。

(2) 利用 2x LSB Sample Buffer 萃取伯氏疏螺旋菌抗原

收集生長密度達 2×10^8 cell/ml 之螺旋體菌液，懸浮於適量等體積的 dH₂O，並測量蛋白質濃度後加入等量體積的 2x LSB sample buffer，以 100°C 乾熱器煮 10 分鐘進行細胞分解，保存於-80°C 備用以進行蛋白質電泳分析。

(3) 利用 Lysis Buffer A 萃取伯氏疏螺旋菌抗原

收集生長密度達 2×10^8 cell/ml 之螺旋體菌液，PBS 潤洗兩次經高速離心 10,000 rpm 10 分鐘後去除上層上清液，加入等體積 Lysis Buffer A(140mM NaCl、10mM Tris-base pH=7.5、1.5mM MgCl、0.5% NP-40) 並於冰上作用 10 分鐘。反應後於 4°C 離心 10000 rpm 10 分鐘，收集上清液，並測量蛋白質濃度，保存於-80°C 以進行蛋白質電泳分析。

(4) 利用超音波震盪器 (Sonicater) 萃取伯氏疏螺旋菌抗原

收集生長密度達 2×10^8 cell/ml 之螺旋體菌液，高速離心 10000 rpm，10 分鐘 PBS 潤洗兩次後去除上層上清液，懸浮於 20 ml PBS 溶液並於冰上靜置 15 分鐘，分別加入 0.1% Triton X-100 及 0.5mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 以抑制蛋白質分解酶 (protease) 的活性，以超音波震盪器 (sonicator, Heat-systemic ultrasonic W-35) 震盪每秒十次，每十秒間隔

五秒，持續震盪 30 分鐘將菌體震碎。高速離心 9000 rpm 離心 30 分鐘後，收集上清液，測定蛋白質濃度，保存於-80°C 以進行蛋白質電泳分析。

(5) 利用高壓破細胞機 (Tight-fitting glass) 萃取伯氏疏螺旋菌抗原

收集生長密度達 2×10^8 cells/ml 之螺旋體菌液，高速離心 10,000 rpm，10 分鐘 PBS 潤洗兩次後去除上層上清液，懸浮於 20 ml PBS 溶液並於冰上靜置 15 分鐘，分別加入 0.1% Triton X-100 及 0.5mM phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) 以抑制蛋白質分解酶 (protease) 的活性，以高壓破細胞機 9000 p.s.i 將菌體均質化，至少重複四次。高速離心 9000 rpm 離心 30 分鐘後，收集上清液，測定蛋白質濃度並保存於-80°C 以進行蛋白質電泳分析。

2-5 聚丙醯胺凝膠電泳法 (Soudium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

本實驗中所使用的聚丙醯胺凝膠濃度為 12.5% 及 15% (acrylamide-to-bis-acrylamide ratio 29:1)，加入 0.75 mm 及 1.0 mm 厚度的玻璃片中，以 isobutyl alcohol (2-methyl-1-propanol) 去除氣泡並壓平，水平靜置 30 分鐘即完成下層膠。待膠凝固後用蒸餾水洗去 isobutyl alcohol 並將水吸乾，再加入 5% 上層膠 (stacking solution)，立即插入齒模，水平靜置 20 分鐘，待膠凝固後拔起齒模再以蒸餾水沖洗並將水吸乾。將待測知樣品與 2x LSB sample buffer 等量混合，100°C 加熱 20 分鐘後，同 3 μ l 的蛋白質標準液 (low molecular weight marker) 分別加入不同的凝膠齒洞中，150

伏特通電 1 小時 25 分鐘直到樣品所含的染料 (Bromophenol blue) 跑到電泳槽電解液中即完成電泳。若不做轉印的膠 (SDS-PAGE gel) 繼續進行以下步驟：由電泳槽中取出膠放入染劑 (commasie blue) 中染色 30 分鐘，放入脫色液中直到膠體變透明為止，最後用玻璃紙封乾。

(1) 轉印 (Transfer)

目的是將經由 SDS-PAGE 膠電泳分離的蛋白質轉印至醋酸纖維膜 (nitrocellulose paper, BioRad) 上。SDS-PAGE 膠與醋酸纖維膜貼在一起，外覆兩層濾紙置入匣中 (chamber) 再放至含有 transfer buffer 的電泳槽中，以 250 毫安培於 4°C 通電 1 小時 30 分鐘後即可完成轉印。

(2) 西方墨點法 (Western blot)

將已轉印蛋白質次酸纖維片切割成 0.5 公分長條泡在以 PBS 為溶劑的 5% 脫脂牛奶中 30 分鐘 (Blocking)，撈起後置放於胞有石蠟膜 (Parafilm) 之玻璃板上，與病人血清、陰性對照組 (用 5% 脫脂牛奶 100 倍稀釋)，反應 3 小時，之後以 PBS-Tween buffer 洗 30 分鐘 (每 10 分鐘更換 PBS-Tween buffer)。接著將醋酸纖維膜置放於包有石蠟膜之玻璃板上，與鹼性磷酸酶標幟抗人體免疫球蛋白二次抗體 (Alkaline phosphatase (ALP) conjugated goat anti-human polyvalent immuno- globulins α , γ and μ chain specific, Sigma) 或鹼性磷酸酶標幟抗人體免疫球蛋白 IgM 或 IgG 二次抗體 (alkaline phosphatase ALP-conjugated goat antibodies to human IgM or IgG; Sigma) 或

ALP conjugated goat anti-human polyvalent immunoglobulin 以 1 : 2000 稀釋於 5% 脫脂牛奶反應中反應 1 小時，再以 PBS-Tween buffer 洗 3 小時後至入 substrate buffer 中，加入 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate, p-toluidine salt (BCIP) 和 p-nitro blue tetrazolim chloride (NBT) 進行呈色反應。

2-6 蛋白質定量

利用 Bio-Rad protein assay (dye binding assay) 方法來測定蛋白質濃度，以 1 μ g/ml 胎牛血清蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 來畫標準曲線 (standard curve)。

[C] (μ g/ml)	0	1	2	5	10	20
BSA (μ l)	0	1	2	5	10	20
PBS (μ l)	800	799	798	795	790	780
Dye (μ l)	200	200	200	200	200	200

以 BSA 各濃度作標準曲線，依上表比例加入試劑，混合均勻。Dye 一加入便會開始反應，所以須注意順序最後再加。欲測試之樣品取 10 μ l 與 PBS 790 μ l 及 dye 200 μ l 混合均勻後同標準溶液一起避光、靜置反應 30 分鐘。以 OD595 nm 比色，紀錄吸光值，最後將樣品與標準曲線對照後，計算得到蛋白質之濃度。

三、 實驗結果

3-1 以顯微鏡觀察伯氏疏螺旋菌體型態及生長情形

經繼代培養之伯氏疏螺旋菌，每隔兩天以暗視野顯微鏡或相位差顯微鏡觀察生長情形，如【圖一、(A)】為 1000 倍暗視野顯微鏡下伯氏疏螺旋菌體型態，【圖一、(B)】為 1000 倍相位差顯微鏡下伯氏疏螺旋菌體型態，可見菌體呈現長螺旋型態。

3-2 利用不同萃取抗原方式萃取伯氏疏螺旋菌體抗原結果

我們利用不同的方法，分別為 Sample buffer lysis、Buffer A lysis、超音波震盪器和高壓破細胞機震碎菌體四種方式萃取伯氏疏螺旋菌體抗原，經由定量蛋白質濃度約 $15 \mu\text{g}/\text{lane}$ ，利用 12.5% SDS-PAGE 比較四種萃取抗原法的萃取抗原效果。

經蛋白質定量結果，以 Sample buffer lysis 100ml 菌液後所測定之蛋白質濃度為 $1.08 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；以 Buffer A lysis 100ml 菌液後所測定之蛋白質濃度為 $1.51 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；以超音波震盪器萃取 500ml 菌液後所得之蛋白質濃度為 $3.80 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ；以高壓破細胞機萃取 500ml 菌液後所得之蛋白質濃度為 $0.73 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

我們利用 12.5%SDS-PAGE 並定量蛋白質濃度，經由西方墨點法比較四種萃取抗原方法，如【圖二和圖三】，結果我們發現，以超音波震盪器處

理抗原的方法較佳，因此，我們利用超音波震盪器萃取抗原，以進行接下來的實驗。

3-3 利用伯氏疏螺旋體抗原進行 Western blot 免疫反應

我們利用超音波震盪器取得伯氏疏螺旋體抗原進行西方墨點法，分析台灣地區萊姆病陽性和疑似陽性病人 4 位、台灣地區皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人 24 位、梅毒陽性 8 位及類風濕性關節炎病人 91 位、紅斑性狼瘡病人 36 位、僵直性脊椎炎病人 48 位、修格連氏病人 45 位及正常人 44 位血清與蛋白質抗原成分免疫反應的結果，並比較與蛋白質抗原之反應頻率。

經由西方墨點法比較台灣地區萊姆病及皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人，與其他關節炎及自體免疫疾病病人對菌體蛋白抗原免疫反應的結果，由【圖四】，可以發現，台灣地區萊姆病及皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人能與 10 個以上的蛋白抗原產生免疫反應，其中 84kDa、74kDa、66kDa、58kDa、48kDa、45kDa、41kDa、39kDa、34kDa、31kDa、30kDa、28kDa、23kDa 和 18kDa 蛋白抗原為主。而關節炎和其他自體免疫疾病病人對菌體抗原的免疫反應結果較弱，其中類風濕性關節炎和紅斑性狼瘡出現與萊姆病陽性及疑似陽性相似的免疫反應結果，僵直性脊椎炎和修格連氏症候群病人與蛋白抗原免疫反應主要以 41kDa 較強，其他蛋白抗原則很微弱。

我們進一步統計各類型疾病與各種蛋白質抗原反應的頻率，如【圖五】，統計結果為 4 位台灣地區萊姆病陽性病人中出現頻率最高為 84kDa、

66kDa、41kDa、39kDa、34kDa，皆為 100%；其次分別為 74kDa、58kDa 和 30kDa，出現頻率為 75%，而 24 位台灣地區皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人中出現頻率最高為 41kDa(95.8%)，其次分別為 66kDa (54.1%)、34kDa (45.8%) 及 84kDa、74kDa、58kDa 及 39kDa (41.6%)。

在其他關節炎和自體免疫疾病分面，91 位類風濕性關節炎病人出現頻率最高為 41kDa (52%)，其次分別為 58kDa (46%) 和 45kDa (44%) 之蛋白抗原；在 36 位紅斑性狼瘡病人中，出現頻率最高為 41kDa (50%)，其次為 58kDa (46.6%) 和 34kDa (38.8%)；而在 48 位僵直性脊椎炎病人中，出現比率最高為 41kDa (92%)，其次為 34kDa (65%)、30kDa (25%) 和 66kDa (19%)。

接下來我們進一步分析，出現在 4 位台灣地區萊姆病及 24 位皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人血清中，特異性 IgM 和 IgG 抗體與蛋白抗原免疫反應的結果，並分別統計這些 IgM 和 IgG 特異性抗體在其他疾病病人血清中與螺旋菌菌體之蛋白抗原的反應頻率，包括 30 位類風濕性關節炎病人、47 位紅斑性狼瘡病人和 7 位梅毒陽性病人。

利用西方墨點法分析後發現，如【圖六】中結果所示，台灣地區萊姆病特異性 IgM 和 IgG 抗體對抗菌體抗原的免疫反應強度相近，而皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人，則是在 IgG 的免疫反應結果比 IgM 的免疫反應結較明顯。

經由統計特異性 IgM 抗體出現的頻率我們發現，如【圖七】，在 4 位台灣地區萊姆病病人出現頻率最高為 84kDa、41kDa 和 39kDa，皆為 100%，其次為 74kDa、66kDa、58kDa、34kDa 和 31kDa，反應頻率為 75%；而 24 位台灣地區皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人中出現頻率最

高為 41kDa (75%)，其次為 58kDa (25%)、48kDa (25%) 和 35kDa (20.8%)。

在 30 位類風濕性關節炎病人中，主要以 35kDa 蛋白抗原出現頻率最高，為 43%，其次為 41kDa (30%) 和 48kDa (13%)。在 47 位紅斑性狼瘡病人中，主要以 41kDa (19.1%) 蛋白抗原反應最高，其次為 74kDa (17%)。

在特异性 IgG 抗體出現的頻率部分，如【圖八】統計結果，我們可以得知，4 位台灣地區萊姆病病人出現頻率最高為 84kDa、45kDa、41kDa 和 34kDa，皆為 100%，其次為 66kDa、58kDa、48kDa、39kDa 和 30kDa，反應頻率為 75%；而 24 位台灣地區皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人中出現頻率最高為 41kDa (75%)，其次為 84kDa (29.1%)、58kDa (25%) 和 48kDa (25%)。

在 30 位類風濕性關節炎病人中，主要則是以 35kDa 蛋白抗原出現頻率最高，為 66.6%，其次為 41kDa (56.6%) 和 66kDa (26%) 及 58kDa (26%)；在 47 位紅斑性狼瘡病人中，主要以 74kDa (31.9%) 蛋白抗原反應最高，其次為 41kDa (23.4%)。

3-4 抗核抗體間接免疫螢光法 (ANA Indirect Immunofluorescence)

我們利用抗核抗體檢測法偵測 4 位台灣地區萊姆病及 24 位皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人血清中出現的抗核抗體，結果如【圖九】，顯示四位台灣地區萊姆病病人血清中有兩名 (2/4) ANA 檢測具 80 倍斑點型 (speckled type) 抗核抗體，一名 (1/4) 具 1280 倍斑點型抗核抗的

萊姆病病人具有 anti-dsDNA (630U/ml) 和 Anti-cardiolipin (29.7GPL)，而 ANA 檢測為陰性反應者有一位 (1/4)。在 24 位皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人血清中有五名 (5/24) 具有 80 倍斑點型抗核抗體、一名 (1/24) 具有 160 倍斑點型抗核抗體，一名 (1/24) 同時具有 80 倍斑點型抗核抗體和 Anti-scl70 抗體，一名 (1/24) 具有 640 倍 ACA 抗體，一名 (1/24) 具 Anti-cardiolipin (21.6GPL) 和 15 名 (15/24) 為 ANA 檢測陰性反應。

四、討論

在過去的文獻中大部分是利用 Lysis Buffer 進行 whole cell 的 lysis 取的菌體抗原以進行實驗[14]，我們則是利用不同萃取抗原的方式希望能取得伯氏疏螺旋菌體部分具有特異性的抗原，以提供進行血清學試驗，期望能增加對萊姆病血清學檢驗的了解。由分析不同萃取方式我們發現，利用超音波震碎機取的部分菌體抗原是最佳的萃取方法，而萊姆病病人血清再西方墨點法實驗中所表現的反應色帶，能符合美國 CDC 所建議的診斷標準，並且沒有多餘的非特異性蛋白的干擾，此外，由於操作迅速能符合大量抗原需求的需要，因此，比較其他萃取抗原的方法我們發現超音波震碎機萃取菌體部分抗原是比較好的方式。

我們利用超音波震碎機萃取部分抗原以西方墨點法分析萊姆病和皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人，對照其他自體免疫疾病和關節炎疾病，結果發現 84kDa、66kDa、39kDa、45kDa、34kDa 和 31kDa 是較具特異性的蛋白。我們進一步分析所產生的 IgM 和 IgG 特異性抗體的反應頻率結果發現：在 IgM 反應中，84kDa、39kDa、66kDa、34kDa 和 31kDa 是具有特異性的蛋白；在 IgG 反應中，84kDa、45kDa、34kDa、31kDa 和 30kDa 為具特異性的蛋白。

在其他關節炎中，類風濕性關節炎和僵直性脊椎炎病人對 66kDa、58kDa 和 34kDa 有比較高的反應頻率，其中類風濕性關節炎為 66kDa (41%)、58kDa (46%) 和 34kDa (32%)；僵直性脊椎炎為 34kDa (65%)。而其他自體免疫疾病中，紅斑性狼瘡病人對 34kDa (38.8%)、58kDa (46.6%) 和 66kDa (30%) 具有較高的反應頻率；而修格連氏症候群病人對菌

體抗原所產生的抗體明顯比其他疾病少，較高者為 74kDa (24%)。而這些關節炎疾病和自體免疫疾病所產生的抗體與萊姆病病人所產生的抗體之間的相關性仍需進一步研究。

依據目前美國疾病管制局所建議的血清學確診標準，我們發現 24 位皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人血清中，有六位 (6/24) 是符合 IgM 陽性的結果，出現 41kDa 和 39kDa 的反應色帶。在 47 名紅斑性狼瘡病人中，有四位 (4/47) 是符合 IgM 陽性的結果，出現 41kDa 和 39kDa 的反應色帶。而 30 名類風濕性關節炎則沒有符合診斷標準陽性的結果。

而經由抗核抗體間接免疫螢光法檢查我們發現，在四名萊姆病陽性病人血清中，有一名病人血清中出現的抗體表現符合紅斑性狼瘡的標準，在過去的文獻中顯示部分慢性萊姆病關節炎疾病的病人和其他自體免疫疾病病人如類風濕性關節炎有相關性，而我們所取的的皮膚表徵出現游走性紅斑之疑似萊姆病陽性病人血清和萊姆病陽性病人的其他臨床併發症狀仍需進一步的追蹤和研究，以厘清萊姆病和其他自體免疫疾病的關係。

五、 結論與建議

目前萊姆病的診斷仍需仰賴血清學檢查，因而研究台灣萊姆病的血清學診斷標準仍需持續的進行，以建立台灣地區萊姆病的診斷標準，並增加檢出率，因此，必須持續的收集本土性的萊姆病病例血清進行分析，增加其樣本數，加以和國外的萊姆病陽性血清進行比較區別差異性，藉以得知本土型所表現的的抗原免疫反應為何，所以我們仍需要疾病管制局和其他相關單位的大力支持，提供萊姆病病例血清以幫助研究。

參考文獻

1. Steere AC : Lyme disease. *N Engl J Med* 2001 ; 345 : 115-124.
2. Sigal LH : Lyme disease : A review of aspects of its immunology and immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol* 1997 ; 15 : 63-92.
3. Reed KD : Laboratory testing for Lyme disease : possibilities and practicalities. *J Clin Micro* 2002 ; 40 : 319-324.
4. Shih CM : Genospecies identification and characterization of Lyme disease spirochetes of genospecies *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from rodents in Taiwan. *J Clin Micro* 1998 ; 36 : 3127-3132.
5. Shapiro ED : Lyme disease. *Clin Infect Dis* 2000 ; 31 : 533-42.
6. Steere AC : Autoimmune mechanism in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *J Autoimmune* 2001 ; 16 : 263-268.
7. Steere AC : Association of chronic Lyme arthritis with HLA-DR4 and HLA-DR2 alleles. *N Engl J Med* 1990 ; 323 : 219-223.
8. Barbour A, Hayes SF : Biology of *Borrelia* species. *Microbiol Rev* 1986 ; 50 : 381-400.
9. Wilske B, Preac-Mursic V, Jauris S, Hofmann A : Immunological and molecular polymorphisms of sopC, an immunodominant major outer surface protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* 1993 ; 61 : 2182-91.
10. Ramamoorthy R, Povinelli L, Phillip MT : Molecular characterization, genomic arrangement, and expression of bmpD, a new member of the bmp class of genes encoding membrane proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect*

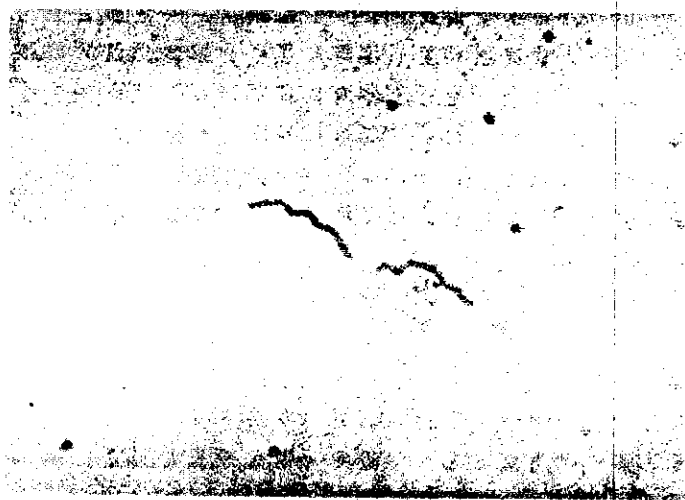
Immun 1996 ; 64 : 1259-64.

- 11.Lam T, Nguyen T-PK, Montgomery RR, Flavell RA : Outer surface proteins E and F of *Borrelia burgdorferi*, the agent of Lyme disease. *Infect Immun* 1994 ; 62 : 290-98.
- 12.Barbour, A. G.: Fall and rise of Lyme disease and other Ixodes tickborne infections in North America and Europe. *Br. Med. Bull.* 1998;54:647–658.
- 13.Recommendations for test performance and interpretation from the second national conference on serologic diagnosis of Lyme disease. *MMWR* 1995 ; 44 : 590-1.
- 14.Dressler F, Steer AC : Western blotting in the serodiagnosis of Lyme disease. *J Infect Dis* 1993 ; 67 : 392-400.
- 15.Novoa BH, Orduna A : Utility of a commercial immunoblot kit (BAG-Borrelia blot) in the diagnosis of the preliminary stages of Lyme disease. *Diag Micro Infec Dis* 2003 ; 47 : 321-329.
- 16.Centers for Disease Control and Prevention. 2001. Lyme Disease—United States 1999. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 50:181–185.

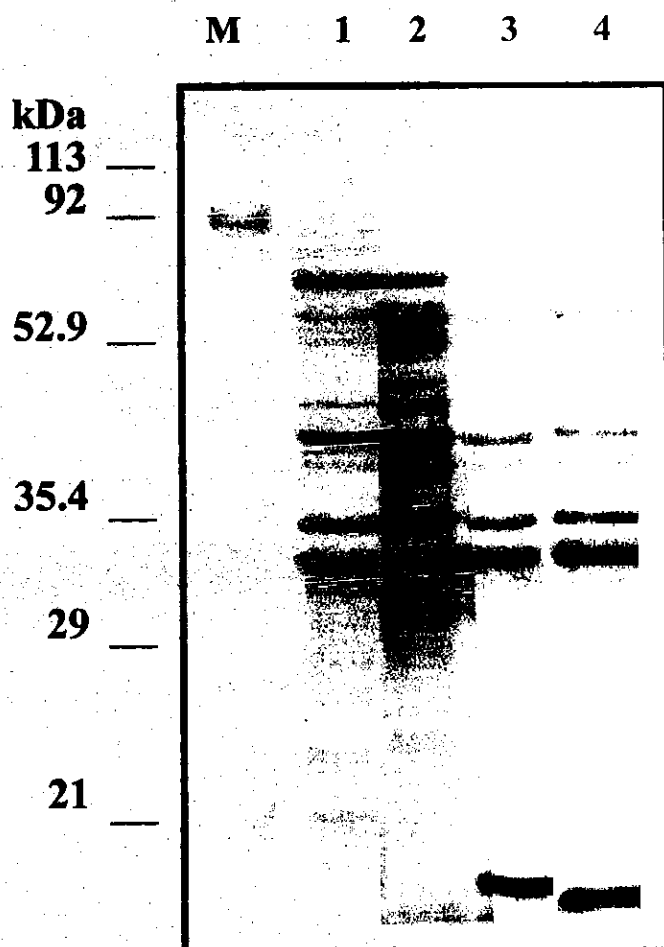
(A)



(B)

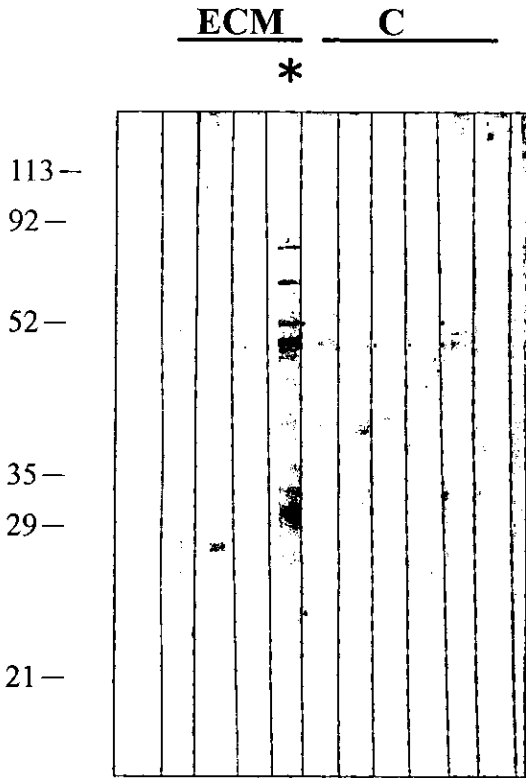


圖一、(A) 1000 倍暗視野顯微鏡下和 (B) 1000 倍相位差顯微鏡下伯氏疏螺旋菌 (*Borrelia burgdorferi sensu stricto strain B31*) 菌體型態。

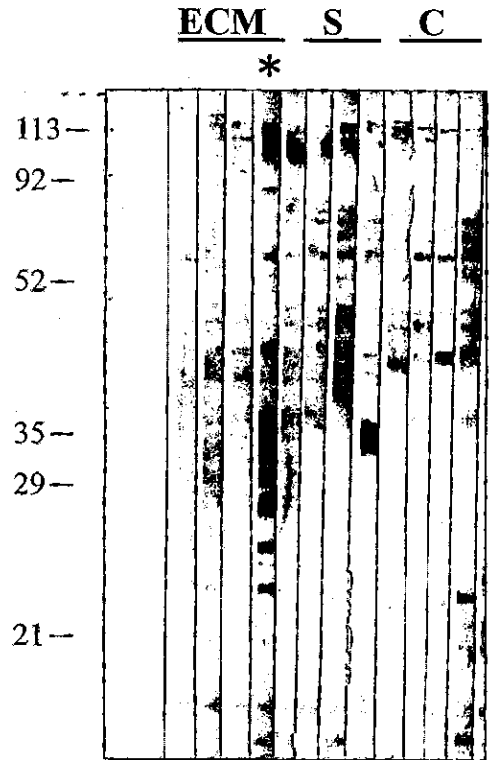


圖二、以 12.5% SDS-PAGE 分析四種不同萃取抗原方法的結果。Lane 1 : sample buffer lysis 萃取抗原；Lane 2 : Buffer A lysis 法萃取抗原；Lane 3 : 超音波震盪器 (sonication) 萃取抗原；Lane 4 : 高壓破細胞機萃取抗原。

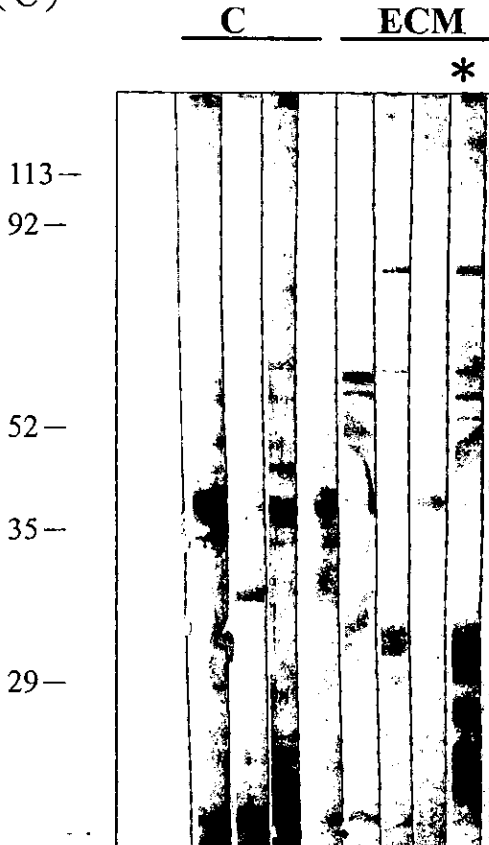
(A)



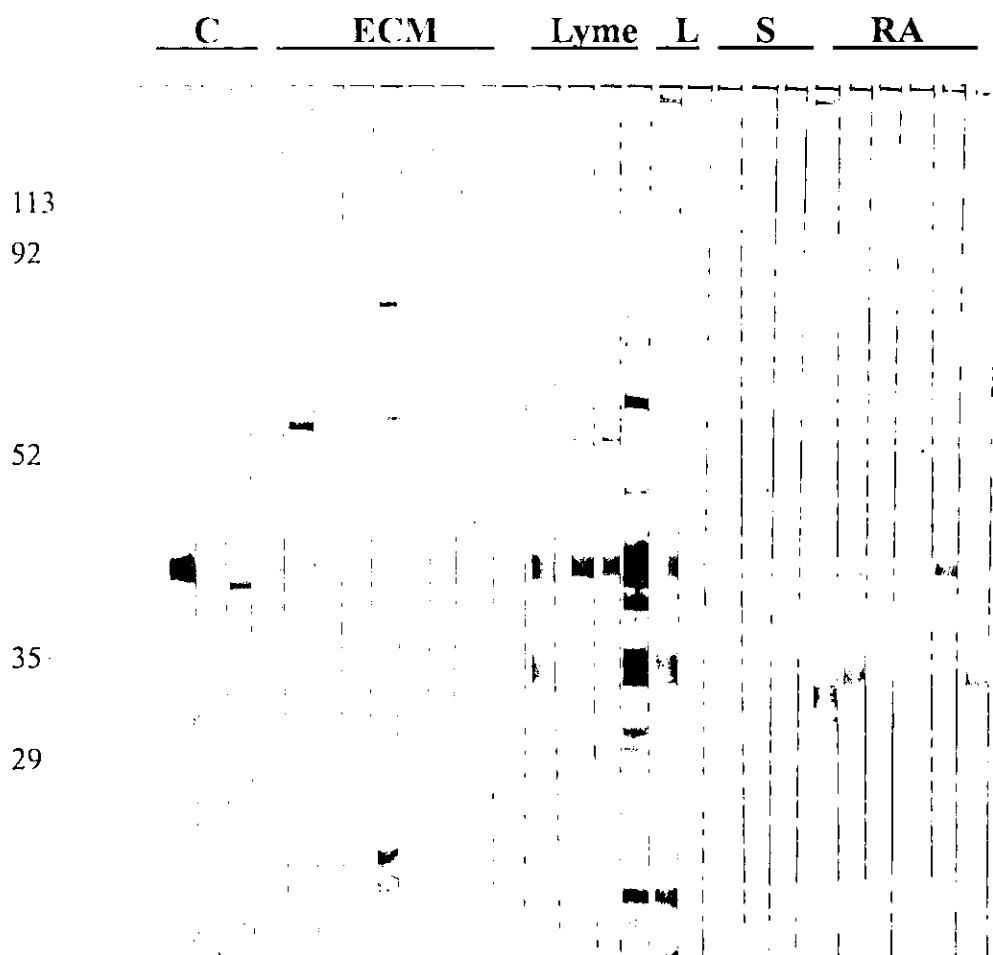
(B)



(C)



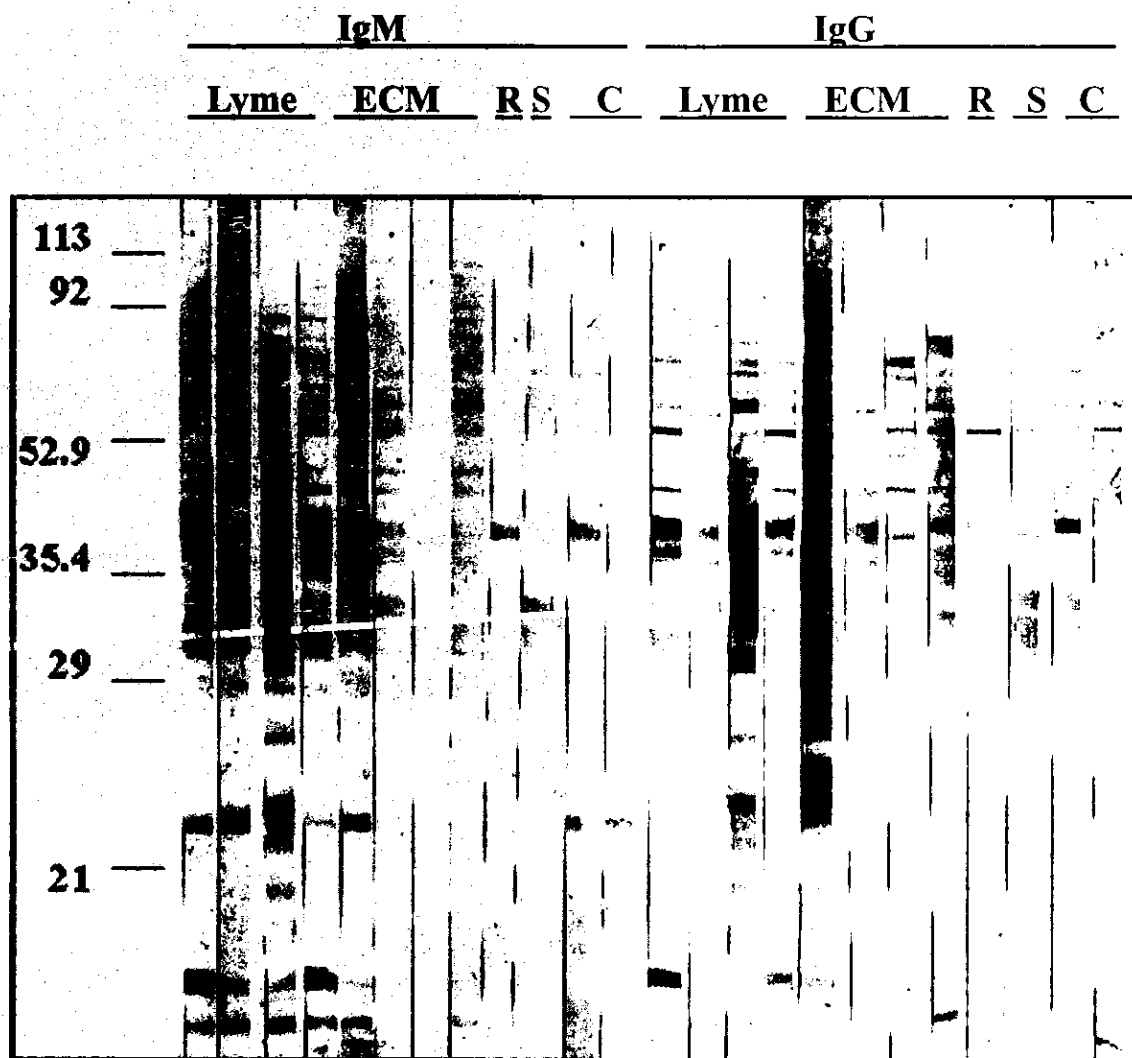
圖三、以 western blot 分析各種萃
取抗原法。(A) Buffer A lysis 萃
取抗原。(B) 高壓破細胞機萃取抗
原。(C) 超音波震碎機萃取抗原。*，
ECM 表現 Lyme western blot 反應色
帶之血清。C，正常人血清。S，梅毒
陽性血清。



圖四、以西方墨點法分析各類型疾病病人的免疫反應。C，control；S，syphilis；L，SLE。

M.W (kDa)	Lyme n=4	ECM n=24	RA n=91	SLE n=36	AS n=48	S.S. n=45	Syphilis n=8	Control n=44
84	4 (100)	10 (41.6)	19 (21)	4 (10)	1 (2)	2 (4)	3 (38)	0 (0)
74	3 (75)	10 (41.6)	11 (12)	7 (19)	3 (6.2)	11 (24)	2 (25)	3 (7)
66	4 (100)	13 (54.1)	37.3(41)	11 (30)	7 (19)	10 (22)	2 (25)	9 (20)
58	3 (75)	10 (41.6)	42 (46)	17(46.6)	8 (17)	9 (20)	1 (13)	15 (34)
48	1 (25)	8 (33.3)	15 (17)	4 (10)	0 (0)	1 (2)	0 (0)	5 (11)
45	2 (50)	8 (33.3)	40 (44)	1 (2.7)	0 (0)	3 (6)	2 (25)	1 (2.2)
41	4 (100)	23 (95.8)	47 (52)	18 (50)	44 (92)	27 (60)	6 (75)	37 (84)
39	4 (100)	10 (41.6)	4 (4.4)	3 (8.3)	6 (13)	3 (6)	0 (0)	11 (25)
34	4 (100)	11 (45.8)	29 (32)	14(38.8)	31 (65)	6 (13)	1 (13)	3 (6.8)
31	1 (25)	2 (8.3)	2 (2.2)	2 (5.5)	6 (13)	5 (11)	3 (38)	3 (6.8)
30	2 (50)	8 (33.3)	0 (0)	6 (16.6)	12 (25)	0 (0)	1 (13)	19 (43)
28	1 (25)	1 (4.16)	0 (0)	1 (2.7)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	3 (6.8)
23	0 (0)	1 (4.16)	2 (2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (2.2)
18	0 (0)	3 (12.5)	0 (0)	8 (22.2)	4 (8.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

圖五、各類型疾病與蛋白質抗原反應出現的頻率。



圖六、各類型疾病西方墨點法結果。R，RA。S，Syphilis。C，control。

IgM						
M.W. (kDa)	Lyme n=4 (%)	ECM n=24 (%)	RA n=30 (%)	SLE n=47 (%)	Syphilis n=7 (%)	Normal n=76 (%)
84	4 (100)	1 (4.1)	2 (6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
74	3 (75)	3 (12.5)	0 (0)	8 (17)	0 (0)	0 (0)
66	3 (75)	3 (12.5)	1 (3)	1 (2.1)	0 (0)	0 (0)
58	3 (75)	6 (25)	2 (6)	1 (2.1)	0 (0)	1 (0.1)
48	1 (25)	6 (25)	4 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
45	2 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
41	4 (100)	18 (75)	9 (30)	9 (19.1)	1 (14.2)	13 (17.1)
39	4 (100)	4 (16.6)	4 (13)	4 (8.5)	0 (0)	5 (6.5)
35	0 (0)	5 (20.8)	13 (43)	4 (8.5)	0 (0)	3 (3.9)
34	3 (75)	2 (8.3)	1 (3)	0 (0)	0 (0)	2 (2.6)
31	3 (75)	2 (8.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
30	1 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
28	1 (25)	1 (4.1)	0 (0)	1 (2.1)	0 (0)	0 (0)

圖七、各類疾病病人血清中各種對抗蛋白抗原之IgM抗體出現頻率比較表。

IgG						
M.W. (kDa)	Lyme n=4 (%)	ECM n=24 (%)	RA n=30 (%)	SLE n=47 (%)	Syphilis N=7 (%)	Normal n=76 (%)
84	4 (100)	7 (29.1)	0 (0)	6 (12.7)	1 (14.2)	0 (0)
74	2 (50)	3 (12.5)	5 (16)	15 (31.9)	1 (14.2)	5 (6.8)
66	3 (75)	3 (12.5)	8 (26)	8 (17.02)	3 (42.8)	4 (5.2)
58	3 (75)	6 (25)	8 (26)	3 (6.3)	0 (0)	3 (3.9)
48	3 (75)	6 (25)	6 (20)	0 (0)	3 (42.8)	8 (10.5)
45	4 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
41	4 (100)	18 (75)	17 (56.6)	11 (23.4)	5 (71.4)	32 (42.1)
39	3 (75)	4 (16.6)	4 (13.3)	2 (4.2)	0 (0)	11 (14.4)
35	0 (0)	5 (20.8)	20 (66.6)	10 (21.27)	3 (42.8)	10 (13.1)
34	4 (100)	2 (8.3)	5 (16.6)	2 (4.2)	2 (28.5)	5 (6.5)
31	2 (50)	2 (8.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
30	3 (75)	4 (16.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
28	1 (25)	1 (4.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)

圖八、各類疾病病人血清中各種對抗蛋白抗原之 IgG 抗體出現頻率比較表。

Disease (No.)	ANA	Anti-dsDNA	ENA	Anti-cardiolipin (IgG)
Lyme				
n=4				
2	80x speckled type	—	—	—
1	1280x speckled type	630U/ml	—	29.7GPL
1	—	—	—	—
ECM				
n=24				
5	80x speckled type	—	—	—
1	160x speckled type	—	—	—
1	80x speckled type	—	Anti-scl70	—
1	640x ACA	—	—	—
1	—	—	—	21.6GPL
15	—	—	—	—

圖九、抗核抗體間接免疫螢光法。