

Cross-Agglutinin Adsorption방법에 의한 렙토스피라균의 혈청학적 분석(1985)

국립보건원 미생물부, 한림대학 의학부¹

오희복 · 박경석 · 조민기¹

= Abstract =

Serological Analysis of *Leptospira Interrogans* Isolated in Korea by Cross-agglutinin Adsorption Method

Hee-Bok Oh, Kyung-Seok Park and Min-Kee Cho¹

Department of Microbiology, National Institute of Health and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hallym University¹, Cheunchun, Korea

To clarify the existing serological varieties of *Leptospira interrogans* in Korea, 15 isolates of 1985 were serologically studied by cross agglutinin adsorption test.

Fourteen cultures except HS 7 belonged to serogroup Icterohemorrhagiae. Isolate HM 3 and HV 8 were considered to belong to serotype *mwogolo* by their low residual homologous antibody(0.08 to 6.25 %) after cross adsorption with serotype *mwogolo* referene culture and antiserum.

Both residual homologous antibody of isolate HS 7 and serotype *canicola* reference culture remained 1.56%, accordingly HS 7 proved to belong to serotype *canicola*.

The agglutinogens of isolate HY2, AP3, AP4, AP7 and AP9 are considered to closely related to serotype *mwogolo*, and HM4 and HS6 to serotype *birkini*, which remained to be further studied.

The remaining 5 strains(HY1, HS5, HY10, 310-9, 310-19) could not be attached to any known serotype of Icterohemorrhagiae serogroup by cross adsorption test.

Key Words: *Leptospira interrogans*, serotyping, cross-agglutinin adsorption test

서 론

렙토스피라증의 원인균인 *Leptospira interrogans*의 동정에는 agglutinin 분석에 의한 serotype 이 기본 분류방법으로 채택되고 있으며, 최근에는 표현형 및 유전적 특징에 따라 몇가지 biological group으로 나누고 있으나 agglutinin에 따른 분류와는 일치되지 않고 있다.

감염원이 된 균주의 정확한 serotype을 밝히는 것은 렙토스피라증에 대한 예방, 진단, 백신제조 등 관리대책을 수립하기 위한 역학적 측면뿐 아니라 이 균과 관련된 병원성기작, 대사과정, 항원성분의 면역학적 특성 등 제반생물학적 성상을 파악하는데 있어 필수적이다.

혈청형의 결정은 근래에는 major agglutinin 조

성을 분석하거나, 단클론 항체생산에 의한 agglutinin 분석법 등이 제안되고 있으나 현재 통용되고 있는 WHO의 정의에 따르면¹, 두 균주(표준균주와 분리균주)로 각각의 면역혈청을 교차로 흡수하여, 흡수 후의 잔류항체가 적어도 두 항혈청중 하나에서 10% 이상인 것이 반복실험으로 증명되면 두 균주는 서로 다른 혈청형으로 나누고 있다.

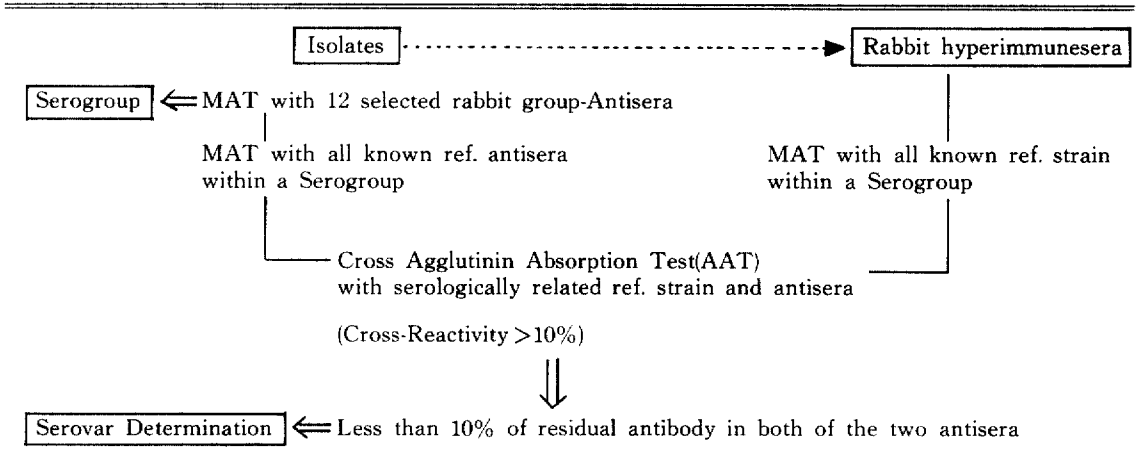
전세계적으로 분포되어 있는 렙토스피라증의 원인균인 *L. interrogans*는 현재 19 serogroup, 180여 serotype으로 나누어지고 있으나 우리나라에서는 1984년 조² 등에 의해 환자 및 동물취에서 분리된 균주들이 Icterohemorrhagiae 혈청군에 속함이 보고되어 있을뿐 보다 상세한 혈청형에 대한 보고는 아직 없는 상태이다.

이에 따라 본 연구에서는 1985년 8월에서 11월 사이에 발생한 렙토스피라증 환자 및 파주지역 들

Table 1. Reference cultures and antisera

Serogroup	Serovar	Source
Icterohemorrhagiae	icteroheorrhagiae, RGA	NIH, Japan
	copenhageni, M-20	NIH, Japan
	mankarso, mankarso	NIH, Japan
	naam	NIH, Japan
	sarmin	CDC
	ndahambukuje	CDC
	weaveri	CDC
	birkini	CDC
	smithi	CDC
	ndambari	CDC
	mwogolo	CDC
	bakoda	CDC
	gem	CDC
	bog-vere	CDC
	tonkini	CDC
	monymusk	CDC, Ehime Univ.
budapest	CDC, Ehime Univ.	
Canica	canicola	CDC
	schueffneri	Hokkaido Univ.
Hebdomadis	hebdomadis	CDC
Autumnalis	autumnalis	CDC
Bataviae	bataviae	CDC
Pyrogenes	pyrogenes	NIH, Japan
Grippotyphosa	grippotyphosa	NIH, Japan
Pomona	pomona	CDC
Australis	australis	CDC
Sejroe	wolffii	CDC
Tarassovi	tarassovi	ATCC
Ballum	ballum	CDC

Table 2. Procedure for the serovar determination by classical typing method



취로부터 분리한 원인균을 대상으로 그 혈청형을 WHO 기준에 따라 동정하여 우리나라에 존재하는 렙토스피라균의 혈청형을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 분리균주

Table 3. Determination of serogroup of the isolates by MAT

Antiserum	Cross reactivity(%) * with strain															
	HY1	HY2	HM3	HM4	HS5	HS6	HS7	HS8	HY10	310-9	310-19	AP-3	AP-4	AP-7	AP-9	
<i>L. copenhageni</i>	12.5	50	25	12.5	25	25	50	100	50	50	50	100	12.5	25	50	
<i>L. canicola</i>	25	50	12.5	12.5	25	25	100	12.5	50	50	25	25	6.25	25	25	
<i>L. ballum</i>	**															
<i>L. bataviae</i>																
<i>L. grippityphosa</i>	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	
<i>L. pyrogenes</i>																
<i>L. autummalis</i>																
<i>L. pomona</i>																
<i>L. wolffii</i>																
<i>L. australis</i>																
<i>L. tarassovi</i>																
<i>L. hebdomadis</i>																
<i>L. canicola</i>																
factor sera	3	3	3	3	3	3	50	3	3	3	3	1.5	1.5	3	3	
Serogroup	Ict	Ict	Ict	Ict	Ict	Ict	Can	Ict	Ict	Ict	Ict	Ict	Ict	Ict	Ict	

*Cross reactivity(%)=(reciprocal titre with strain/reciprocal titre with homologous strain)×100

**Blank=less than 1.5%

국립보건원에서 1985년 가을에 환자로부터 분리한 11주(HY1, HY2, HM3, HM4, HS5, HS6, HS7, HV8, HY10, 310-9, 310-19)와 과주지역 들쥐로부터 분리한 24주중 4주(AP3, AP4, AP7, AP9)의 렙토스피라균을 대상으로 하였다.

2. 참조균주 및 항혈청

미국 CDC, 일본 NIH, 일본 Ehime대학 등에서 분양받은 균주 및 항혈청들을 혈청형 동정을 위한 참조균주 및 항혈청으로 사용하였다(Table 1).

3. 분리균에 대한 항혈청제조

각 분리균을 Fletcher's semisolid배지에 4~10일간 배양한 후 균이 균일하게 자란 부위만 취해 매 5~7일 마다 생균 그대로 1ml, 2ml, 3ml, 3ml씩 4회에 걸쳐 2.5~3kg의 가토 귀정맥에 주사한 후 1일 후에 심장채혈하여 항혈청을 제조하였다.

4. Serogroup 동정

분리균들의 serogroup 동정을 위해서는 group antisera로 *copenhageni*(Icterohemorrhagiae serogroup), *conicola*, *ballum*, *bataviae*, *grippityphosa*, *pyrogenes*, *autummalis*, *pomona*, *hardjo*, *australis*, *tarassovi*, *hebdomadis* 등 12개 serotype에 대한 항혈청을 사용하였으며, 분리균들의 이들 항혈청에 대한 Microscopic agglutination test (MAT) 역가를 비교하여 serogroup을 결정하였다. 또한 Icterohemorrhagiae와 *Canicola* serogroup 간의 교차반응을 제거하기 위해서는 *L. canicola* 항혈청을 *L. copenhageni* 균주로 흡수하여 *L. canicola* factor sera를 만들어 사용하였다.

5. Serotype 동정

Serogroup이 결정된 균주는 classical typing method에¹⁾ 의하여 serotype을 동정하였다(Table 2).

해당 serogroup에 속하는 모든 serotype 참조균주와 그 항혈청, 분리균주 및 그 항혈청을 사용하여 교차로 MAT 역가를 구하고 그 교차반응 정도를 %[(이종균주에 의한 역가/동종 균주에 의한 역가)×100]로 계산하였다. 그 결과 교차반응 정도가 25% 이상인 참조균주들을 선별해 다시 cross-agglutinin adsorption test(AAT)를 실시해 두혈청 모두 흡수후의 동종균주에 대한 역가(잔류항체가)가 흡수 전 역가의 10%미만이면 해당 serotype으로 동정하였다.

6. 교차응집흡수시험(AAT)

Table 4. Reactions of hyperimmunesera of isolates within Icterohemorrhagiae serogroup

Culture		Cross reactivity(%) of hyperimmunesera													
Subgroup	Serovar	HY1	HY2	HM3	HM4	HS5	HS6	HV8	310-9	310-19	AP3	AP4	AP7	AP9	HY10
Icterohemorrhagiae	icterohemorrhagiae	50													
	copenhageni	25	25	50	50	25	25	100	100	100	50	25			25
	mankarso					25	25	50	25	25	25				
	naam					25	25	50	25	25	25				
Sarmin	sarmin	50													
	ndambukuje weavei	25		50	25	50	25	50		25	25	25	25	25	50
Smithi	birkini	100	100	100	25	100	13	100	50	100	100	50	100	100	100
	smithi	100	100	100	100	100	100	100		100	100	100	100	100	100
	ndambari	50	50	100	50	100	100	100	100	50	50	50	100	100	50
	mwogolo			50	25	100		100	25	25	25	25	50	25	
	dakoda			25		25		25							
	gem	25	25	100	50	50	25	100	50	50	25	50	100	50	25
	bog-vere			25											
	tonkini														
monymusk															

Table 5. Cross reactivity of isolates with ref. Antisera(%)

Antisera	Cultures					
	HY1	HY2	HM3	HM4	HS5	HS6
Ict.			50			
Cop.		50	25		25	25
Man.		50		25	25	25
Naam.						
Sar.						
Nd-k.	100	100	25	100	100	100
Wea						
Bir.		50			25	25
Smi.						
Nd-r.				25	25	
Mwo.	25	25	50	25	100	50
Dak.						
Gem.	100	100	25	100	100	50
Bog.	50	100	100	100	100	100
Ton.		100	100	100	100	100
Mon.						
Bud.						

교차흡수시험은 Bratislava technique에 의해 실시하였다. EMJH broth에 7~14일간 배양한 500 ml 정도의 균액을 5,000xg에서 30분간 원심하여 균

농도를 McFarland Standard No. 10으로 맞춘다음 MAT역가를 6,400~12,800으로 조정된 항혈청 25 μ l에 균액 250 μ l, 250 μ l, 100 μ l를 10분 간격으로 첨가하고 잘 섞어 실온에 하룻밤 방치한 후 micro-centrifuge로 원심하여 항원을 제거하였다.

흡수된 혈청은 원액의 25배 희석혈청으로서 흡수 균주로 다시 MAT역가를 측정하였을 때 첫번째 희석단계(1:100)에서 약하게 반응을 보이면($\leq 1+$) 적절히 흡수된 것으로 판단하였다.

성 적

1. Serogroup 동정

각 serogroup을 대표하는 12개 참조균주 항혈청에 대한 분리균주들의 교차반응도(%)를 MAT로 측정한 결과 Table 3과 같았다. 분리주들은 모두 Icterohemorrhagiae(*L. copenhageni*)와 *Canicola*(*L. canicola*) serogroup 항혈청에 12.5%이상의 교차반응도를 나타내었으며 *Canicola* serogroup 가능성을 확인하기 위해 *L. canicola* 항혈청을 *L. copenhageni*로 흡수하여 만든 *L. canicola* factor serum에 반응시켰을 때 HS-7주를 제외한 14주는 모두 교차반응도가 현저히 감소하였다. 이에 따라 HS-7주는 *Canicola* serogroup, 나머지 14주는 Icterohemorrhagiae serogroup으로 동정되었다.

Table 6. Residual antibody of absorption tests (I)

Hyperimmune Sera	Absorbing culture										
	Cop.	Sar.	Man.	Nd-k.	Naam.	Mwo.	Smi.	Bir.	Gem.	Nd-r	Mon
HY-1											
HY-2						1.56	6.25	6.25			
HM-3						0.78					
HM-4								6.25			
HS-5											
HS-6								6.25			
HV-8						3.125					
HY-10											
310-9											
310-19											
AP-3						1.56	6.25	3.125		6.25	
AP-4						3.125	6.25				
AP-7						6.25		6.25		6.25	
AP-9						1.56	3.125	3.125		3.125	

Table 7. Residual antibody of absorption tests(II)

Absorbing culture	Antisera	
	Mwogolo	Birkini
HY-1	25	25
HY-2	25	25
HM-3	6.25	50
HM-4	12.5	25
HS-5	12.5	25
HS-6	12.5	12.5
HV-8	6.25	25
HY-10	25.	25
310-9	12.5	25
310-19	12.5	25
AP-3	12.5	25
AP-4	25.	25
AP-7	25.	50
AP-9	12.5	25

2. Serotype 동정

1) Icterohemorrhagiae Serogroup

먼저 Icterohemorrhagiae serogroup 으로 분류된

14분리균주 면역혈청에 대한 교차반응도(%)를 비교한 결과 대부분의 분리균주 면역혈청은 *icterohe-morrhagiae, sarmin, weaveri, tonkini*를 제외한 나머지 참조균주들에 의해 광범위하게 높은 교차반응도를 나타내었다(Table 4).

또한 분리균주들의 참조균주 항혈청에 대한 역가를 구했을 때에는 *copenhageni, mankarso, ndambu-kuje, birkni, mwogolo, gem, bog-vere, tonkini*, 등 serotype과 비교적 높은 교차반응도를 나타내었다(Table 5).

이에 따라 비교적 교차반응도가 높은 *copenhage-ni*를 비롯한 11개 serotype 참조균주로 분리균주의 면역항혈청을 흡수하여 그 잔류항체가(%)를 측정하여 그 값이 10% 미만인 경우만 표시하면 Table 6에서와 같았다. 또한 여기에서 그 흡수율이 높아 agglutininogen이 유사할 것으로 생각되는 *mwogolo, birkini* serotype 참조 항혈청을 분리균주로 흡수한 경우 그 잔류항체가는(Table 7)과 같아 각 분리균주는 다음과 같이 그 serotype이 분류되었다.

HY1, HS5, HY-10, 310-9, 310-19: 11개 참조균주로 흡수하였을 때 모두 잔류항체가가 10%이상으로 나타나 지금까지 알려진 17개 serotype 범주에

Table 8. Residual antibody of absorption tests(III)

Antisera	Strain	Reciprocal titre with homologous strain	Reciprocal titre with strain	Residual antibody(%)
HS-7	<i>L. canicola</i>	25,600	400	1.56
<i>L. canicola</i>	HS-7	25,600	400	1.56

속하지 않았다.

HY2, AP3, AP4, AP7, AP9: *mwogolo* serotype에 의한 잔류항체가 1.56~6.25%로 가장 낮아 그 agglutinin이 *mwogolo* serotype과 가장 유사할 것으로 생각되나 *birkini* serotype에 의한 잔류항체라도 3.125~6.25%로 10% 미만으로 나타났다(Table 6). 그러나 이들 serotype 항혈청에 대한 교차흡수실험 결과는 잔류항체가 12.5~50%(>10%)로 그 흡수도가 낮게 나타나(Table 7), *mwogolo* serotype으로 확정하기 어려웠다.

HM3, HV8: 각 항혈청을 *mwogolo* serotype 균주로 흡수하였을 때의 잔류항체는 0.78%, 3.125%, *mwogolo* serotype 항혈청을 HM3, HV8 주로 흡수하였을 때의 값은 6.25%로 교차흡수실험에 의한 잔류항체가 모두 10% 미만으로 나타나 *mwogolo* serotype으로 동정되었다.

HM4, HS6: 각 항혈청을 *birkini* serotype 균주로 흡수하였을 때의 잔류항체가 6.25% 낮게 나타나 이 serotype과 가까우리라 생각되나 교차흡수실험 결과 그 잔류항체가 25%로 높게 나타났다.

2) *Canicola* serogroup

Canicola serogroup으로 분류된 HS7주의 serotype을 동정하기 위해 *Canicola* serotype 균주 및 항혈청과 교차흡수실험 결과 양쪽 모두 잔류항체가 1.56%로 낮게 나타나 HS7주는 *canicola* serotype으로 동정되었다(Table 8).

고 찰

렙토스피라균은 Noguchi에 의해 처음 발견된 이래 Borg-Peterson(1938)에 의해 agglutination에 의해 구별될 수 없는 두 strain이 adsorption에 의해 명확히 구별될 수 있다는 것이 알려졌다, Wolff(1953) 등은 이를 체계화하여 렙토스피라균을 agglutination 및 cross-agglutination adsorption 반응에 의해 20 serogroup, 36 serotype으로 분류하였고, 그후 세계 각처에서 새로운 serotype이 분리, 동정되어 현재는 19 serogroup, 180여 serotype에 이르고 있다. 또한 Borg-Peterson(1971)은 56°C에서 쉽게 파괴되는 thermolabile agglutinin이 strain Ictero I에 존재함을 보고하여 같은 strain에서의 phase variation이 가능함을 제시하였다.

렙토스피라균의 typing에는 지난 10여년간 여러 새로운 방법이 고안되어 DNA base composition, DNA: DNA hybridization 등을 이용한 여러 genetic group으로의 분류방법이 제안되고 있으나 아직 serotype을 대신하는 분류법으로 채택될 만큼 체계

화 되지는 못하고 있다. 또한 근래에는 렙토스피라 항원성분을 immunoblot법등 여러 면역화학적 방법으로 분석하려는 시도가 이루어지고 있으나 이들 항원의 chemical nature와 함께 면역화학적 특징과 혈청학적 반응 및 virulence와의 관계는 아직 밝혀지지 않고 있다.

우리나라에서의 렙토스피라균은 아직 serogroup 수준까지의 분류만 보고되어 있을뿐 어떤 serotype이 분포되어 있는지는 밝혀지지 않고 있으나, 우리나라에 존재하고 유행하는 strain의 정확한 항원구조 및 혈청형을 밝히는 것은 환자에 대한 혈청학적 진단용항원 및 백신제조용 균주의 선택범위를 결정하는데 매우 중요할 뿐만 아니라, 항원학적 다양성과 hemolysis, lipase 생성등 병원성 기작과의 관계를 연구하는데에도 그 기본이 될 것이다.

이에 본 연구에서는 1985년 분리균주중 그 면역항혈청 제조가 가능하였던 15주를 대상으로 가능한 모든 참조균주와 항혈청을 이용하여 serogroup 결정, cross-reactivity 측정, cross-agglutinin absorption의 단계적 실험을 통해 serotype 수준까지 분석하였다. 그 결과 serotype *mwogolo*(HM3, HV8)와 *canicola*(HS7)의 분리는 특징적이라 할 수 있으며, serotype이 결정되지 않은 균주중 HY1, HS5, HY-10, 310-9, 310-19 등 균주는 새로운 serotype일 가능성이 매우 높다고 생각된다.

기타 균주들은 *mwogolo* 또는 *birkini*와 그 agglutinin이 매우 유사하다고 생각되나 참조균주 항혈청에 대한 흡수도가 낮게 나타나 이들 serotype으로 동정하기 어려웠다.

이들 미확인 균주들에 대해서는, 참조균주에 대한 새로운 항혈청을 제조하여 확인시험할 필요가 있을 것이며 흡수방법에 의한 오차를 고려하여 여기서 사용한 Bratislava 방법과 Dutch 방법의 비교실험도 의미있을 것으로 기대된다. 또한 항원변이에 따른 다양성을 고려하여 thermolabile, thermostable 각각의 항원에 대한 항혈청제조와 아울러 보다 특이성이 높은 항체제조 방법이 검토되어야 할 것이다.

결 론

우리나라에 존재하는 렙토스피라균의 혈청형을 파악하여 렙토스피라증 환자의 진단 및 백신제조를 위한 기초자료를 마련하고자 1985년에 우리나라에서 분리된 15주의 렙토스피라균을 대상으로 그 serotype을 classical typing method에 의해 동정하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. HM3, HV8주는 serotype *mwogolo*와의 교차 흡수시험 결과 잔류항체가 0.78~6.25% (<10%)로 나타나 serotype *mwogolo*로 동정되었다.

2. HS7주는 serotype *canicola*와의 교차흡수시험 결과 잔류항체가 모두 1.56% (<10%)로 나타나 serotype *canicola*로 동정되었다.

3. HY2, AP3, AP4, AP7, AP9주는 Icterohemorrhagiae serogroup 중 serotype *mwogolo*와, HM4, HS6주는 serotype *birkini*와 그 agglutinin이 가장 유사하였으나 같은 serotype으로 증명되지는 못하였다.

4. HY1, HS5, HY-10, 310-9, 310-19주는 Icterohemorrhagiae serogroup에 속하였으나 17개 serotype 모두와 그 agglutinin이 다르게 나타났다.

참 고 문 헌

1) 조민기, 백승복, 오희복, 송철: 한국에서 유행한 Leptospirosis의 세균학적 연구. 한국역학회지, 6:16-35, 1984.

- 2) Cole J.R. et al: Improved microtechnique for the leptospiral microagglutination test. *Appl. Microbiol.* 25: 976-980, 1983.
- 3) Dickken H. and Kmety E.: Serological Typing Methods of Leptospire. *Methods in Microbiol.* 11, Academic Press, 1978.
- 4) Kmety E, Galton M, M, and Salzer, CG.: Future standardization of the agglutinin-adsorption test in the serology of leptospire. *Bull. WHO* 42: 733-738, 1970.
- 5) Starr MP et al(ed): The prokaryotes, chap. 51 *The Genus Leptospira*, 583-591, 1981.
- 6) Sulzer CR and WL Jones: Leptospirosis, Methods in laboratory diagnosis. HEW publ. No. (CDC) 76-8275, 1980.
- 7) Tonsil B(ed): Bergy's manual of systematic bacteriology. William and Willkins Baltimore 62-70, 1984.
- 8) World Health Organization: Technical Report Series. 380: 7, 1967.